

UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET

KLINIČKA ISTRAŽIVANJA



**UTICAJ METFORMINA NA NASTANAK
DEFICITA VITAMINA B12 KOD PACIJENATA SA
TIPOM 2 DIJABETES MELITUSA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:

Prof. dr Nikola Ćurić

Prof. dr Dragana Tomić Naglić

Kandidat:

Asist. dr Stanislava Nikolić

Novi Sad, 2018. godine

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Stanislava Nikolić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Nikola Ćurić Prof. dr Dragana Tomić Naglić
Naslov rada: NR	UTICAJ METFORMINA NA NASTANAK DEFICITA VITAMINA B12 KOD PACIJENATA SA TIPOM 2 DIJABETES MELITUSA
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2018.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Medicinski fakultet Hajduk Veljkova 3 Novi Sad

Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 7 / stranica 183/ slika 9 / grafikona 19/ tabela 40 / referenci 182)
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Patološka fiziologija Endokrinologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	dijabetes melitus tip 2; metformin; vitamin B 12; deficit vitamina B 12; folna kiselina; homocistein
UDK	616.379-008.64:615.252.06 577.164.1
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta Hajduk Veljkova 3 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Prema podacima iz 2011 godine, u Srbiji je približno 630 000 ljudi (8,6%) obolelo od dijabetes melitus-a, a procenjuje se da će taj broj porasti na 730 000 (10,2%) do 2030 godine. Preko 90% obolelih ima tip 2 dijabetes melitus (T2DM).</p> <p>Prva linija medikamentne terapije predstavljaju bigvanidi čiji je najznačajniji predstavnik metformin. Prema literaturnim podacima, u oko 10-30% slučajeva, kontinuirana upotreba metformina ima za posledicu smanjenu intestinalnu apsorpciju vitamina B12. Tačan patofiziološki mehanizam koji dovodi do metforminom indukovane malapsorpcije vitamina B12 nije u potpunosti ispitan i poznat i postoji nekoliko aktuelnih teorija s ciljem objašnjenja ovog kompleksnog problema.</p> <p>Cilj rada je bio utvrđivanje nivoa, dinamike, trenda i učestalosti promena vitamina B12, holotranskobalamina (B12 aktiv), homocisteina i folne kiseline tokom kontinuirane primene metformina tokom godinu dana. Studija praćenja je sprovedena u Centru za laboratorijsku medicinu a u saradnji sa Klinikom za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, Kliničkog centra Vojvodine. Ovom studijom je obuhvaćeno 50 ispitanika obolelih od T2DM a u momentu uvođenja metformina. Svim ispitanicima je određivana</p>

	<p>koncentracija vitamina B12, B12 aktiva, homocisteina i folne kiseline, u momentu uvođenja terapije kao i nakon 4, 8 i 12 meseci primene metformina.</p> <p>Za dvanaest meseci kontinuirane primene metformina, utvrđen je kontinuirani pad i redukcija vrednosti ukupnog vitamina B12 za 25.29 %, odnosno vrednosti B12 aktiva za 23.26 %. U toku ispitivanja, utvrđen je kontinuirani trend porasta vrednosti homocisteina u krvi, s statistički značajnim porastom vrednosti homocisteina nakon osam meseci primene metformina. Pošavši od pretpostavki da metformin istovremeno blokira apsorpciju vitamina B12 u gastrointestinalnom traktu kao i raspoloživost iz postojećih, tkivnih rezervi, zatečene količine ovog vitamina u ciljnim ćelijama se postepeno redukuju i troše, rezultujući krajnjem snižavanju nivoa metabolički aktivnih oblika kobalamina, te posledičnoj akumulaciji homocisteina kako u ćelijskom, tako i u vanćelijskom prostoru.</p> <p>Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja može se predložiti opservacija nivoa ukupnog vitamina B12 i homocisteina u krvi pre uvođenja metformina u terapiju tipa 2 dijabetes melitusa kao i dvanaest meseci nakon toga. Na osnovu nivoa jednogodišnjeg pada koncentracija ukupnog vitamina B12, porasta koncentracija homocisteina, kao i drugih kliničkih i laboratorijskih parametara, može se razmatrati opcija uvođenja supstitucione terapije vitaminom B12 ili dalja opservacija nivoa vitamin B12 u krvi i ćelijskom prostoru.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	21.06.2018.
Datum odbrane: DO	

<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>predsednik: član: član:</p>
---	--

University of Novi Sad
Faculty
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Stanislava Nikolić
Mentor: MN	Prof dr Nikola Ćurić Prof. dr Dragana Tomić Naglić
Title: TI	EFFECTS OF METFORMIN INDUCED VITAMIN B12 DEFICIENCY IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS
Language of text: LT	Serbian (latin)
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2018.
Publisher: PU	
Publication place: PP	Faculty of Medicine Hajduk Veljkova Street 3 Novi Sad

Physical description: PD	Number of chapters 7 / pages 183 / images 9 / graphs 19 / tables 40 / references 182
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Pathophysiology Endocrinology
Subject, Key words SKW	Diabetes Mellitus, Type 2; Metformin; Vitamin B 12; Vitamin B12 Deficiency; Folic Acid; Homocysteine
UC	616.379-008.64:615.252.06 577.164.1
Holding data: HD	Library of Faculty of Medicine Novi Sad Hajduk Veljkova Street 3 21000 Novi Sad, Serbia
Note: N	
Abstract: AB	<p>According to data from 2011, in Serbia, approximately 630.000 people (8.6%) were diagnosed with diabetes mellitus, and it is estimated that this number will increase to 730.000 (10.2%) by 2030. Over 90% are type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients.</p> <p>The first line of medication therapy is metformin. According to the literature data, in about 10-30% of cases, continuous use of metformin causes impaired intestinal absorption of vitamin B12. The exact pathophysiological mechanism leading to metformin induced malabsorption of vitamin B12 has not been fully known, and there are several current theories to explain this complex problem.</p> <p>The aim of this study was to determine the level, dynamics, trend and frequency of changes in blood levels of total vitamin B12, holotranscobalamin (B12 active), homocysteine and folic acid during continuous application of metformin, over a year. The study was carried out at the Center of Laboratory Medicine in cooperation with the Clinic for Endocrinology, Diabetes and Metabolic Diseases, Clinical Center of Vojvodina. This study included 50 T2DM patients at the time of the introduction of metformin therapy. Levels of vitamin B12,</p>

	<p>holotranscobalamin, homocysteine and folic acid are determined before and after 4, 8 and 12 months of metformin administration, to all subjects.</p> <p>After a year of metformin use, the level of total vitamin B12 has been reduced by 25.29%, as well as holotranscobalamin by 23.26%. During the study, a continuous elevation of homocysteine levels was determined, with statistically significant increase in homocysteine values after eight months of metformin administration. Starting from the assumption that metformin blocks the absorption of vitamin B12 in the gastrointestinal tract as well as the availability of existing tissue reserves, the amount of this vitamin in the target cells is gradually reduced, resulting in an extremely low level of metabolically active forms of this vitamin and the consequent accumulation of homocysteine in intracellular and extracellular space.</p> <p>On the basis of the obtained test results, it may suggest observation of the level of total vitamin B12 and homocysteine prior to the introduction of metformin in T2DM therapy and after one year thereafter. Based on the level of one-year decline of total vitamin B12 and the increase of homocysteine concentrations, as well as other clinical and laboratory parameters, substitution therapy with vitamin B12 or further monitoring of laboratory parameters of vitamin B12 metabolism may be proposed.</p>
Accepted on Senate on: AS	21.06.2018.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	president: member: member:

SADRŽAJ

1.UVOD	...1
1.1. TIP 2 DIJABETES MELITUS	...1
1.1.1. Etiologija i patofiziologija tipa 2 dijabetes melitusa	...1
1.1.2. Dijagnoza tipa 2 dijabetes melitusa	...5
1.1.3. Terapija tipa 2 dijabetes melitusa	...6
<i>1.1.3.1. Terapija dijabetes melitusa tip 2 METFORMINOM</i>	<i>...9</i>
<i>1.1.3.1.a. Istorijat metformina</i>	<i>...10</i>
<i>1.1.3.1.b. Indikacije</i>	<i>...11</i>
<i>1.1.3.1.c. Kontraindikacije</i>	<i>...11</i>
<i>1.1.3.1.d. Mehanizam dejstva</i>	<i>...11</i>
<i>1.1.3.1.e. Farmakokinetika metformina</i>	<i>...14</i>
<i>1.1.3.1.f. Neželjena dejstva</i>	<i>...15</i>
<i>1.1.3.1.g. Doziranje i predoziranje</i>	<i>...16</i>
1.2. VITAMIN B12	...18
1.2.1. Definicija i izvori vitamina B12	...18
1.2.2. Metabolizam vitamina B12	...19
1.2.3. Fiziološka uloga vitamina B12	...21

1.2.4. Deficit vitamina B12	...22
1.2.4.1. Epidemiologija deficita vitamina B12	...23
1.2.4.2. Uzroci deficita vitamina B12	...24
1.2.4.3. Kliničke manifestacije deficita vitamina B12	...25
1.2.4.4. Laboratorijski testovi u dijagnostici deficita vitamina B12	...26
1.2.4.4.a. Ukupni vitamin B12	...26
1.2.4.1.b. Holotranskobalamin	...27
1.2.4.1.c. Homocistein	...28
1.2.4.1.d. Metil-malonična kiselina (MMA)	...30
1.2.1.4.e. Folna kiselina	...30
1.2.4.5. Terapija deficita vitamina B12	...31
1.3. VITAMIN B12 I DIJABETES MELITUS TIP 2	...32
1.3.1. Vitamin B12 i metformin	...32
1.3.2. Suplementacija vitaminom B12 u dijabetes melitusu tip 2 lečenih metforminom	...36
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I RADNA HIPOTEZA	...37
2.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	...37
2.2. HIPOTEZE OD KOJIH SE U ISTRAŽIVANJU POLAZI	...37

3. MATERIJAL I METODE	...38
3.1. UZORAK	...38
3.2. DIZAJN ISTRAŽIVANJA	...39
3.3. METODOLOGIJA ISTRAŽIVANJA	...40
3.3.1. Laboratorijske analize	...42
3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA I PREZENTACIJA REZULTATA	...51
4. REZULTATI	...54
4.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA	...54
4.2. ANTROPOMETRIJSKI PARAMETRI I VREDNOSTI ARTERIJSKOG KRVNOG PRITISKA	...56
4.3. PARAMETRI KOMPLETNE KRVNE SLIKE	...61
4.4. BIOHEMIJSKI PARAMETRI	...66
4.5. BIOHEMIJSKI PARAMETRI GLIKOREGULACIJE	...68
4.6. BIOHEMIJSKI PARAMETRI METABOLIZMA LIPIDA (lipidni, lipoproteinski status i lipidni indeksi za procenu insulinske rezistencije)	...75
4.7. BIOHEMIJSKI PARAMETRI METABOLIZMA VITAMINA B12, HOMOCISTEIN I FOLNA KISELINA	...81

4.7.1. Trend promena koncentracija i značajnost razlika ispitivanih parametara metabolizma vitamina B12 i folne kiseline	...82
4.7.2. Razlike u procentima pada vitamina B12 i B12 aktiva	...90
4.7.3. Analiza zavisnosti promena ukupnog vitamina B12 i B12 aktiva (Hi kvadrat test)	...91
4.7.4. Analize promena nivoa parametara vitamina B12 i folne kiseline u odnosu na godine života ispitanika (Manova analiza)	...92
4.7.5. Interakcije između parametara vitamina B12, B12 aktiva, homocisteina i folne kiseline	...94
4.8. RELACIJE IZMEĐU ANALIZIRANIH PARAMETARA U SVA ČETIRI VREMENSKA TRENUTKA (P1, P2, P3 i P4)	...95
4.8.1. Ukupni vitamin B12	...95
4.8.2. Vitamin B12 aktiv	...97
4.9. UČESTALOST BROJA ISPITANIKA SA GRANIČNO SNIŽENIM I NISKIM NIVOIMA VITAMINA B12	...99
4.10. UČESTALOST BROJA ISPITANIKA SA BIOHEMIJSKIM DEFICITOM VITAMINA B12 ACTIV-a	...101
4.11. HOMOCISTEIN I FOLNA KISELINA	...103
4.11.1. Vrednosti homocisteina u odnosu na ukupni vitamin B12	...103

4.11.2. Vrednosti homocisteina u odnosu na vitamin B12 aktiv	...107
4.12. PANEL PODACI	...112
5. DISKUSIJA	...113
5.1. KONTINUIRANI PAD SREDNJIH VREDNOSTI OBA, UKUPNOG B12 I B12 AKTIVA U TOKU POSMATRANOG PERIODA	...113
5.2. UČESTALOST DEFICITA VITAMINA B12	...115
5.3. ĆELIJSKI EFEKTI VITAMINA B12 I NIVOI OVOG VITAMINA U EKSTRACELULARNOM PROSTORU	...119
5.4. ODNOS IZMEĐU UKUPNOG VITAMINA B12 I B12 AKTIVA U ISPITIVANJU STATUSA VITAMINA B12 U TOKU TERAPIJE METFORMINOM	...122
5.5. VREMENSKI ZAVISAN PAD VITAMINA B12 I B12 AKTIVA	...126
5.6. INTERAKCIJE VITAMINA B12 I B12 AKTIVA	...129
5.7. ODNOSI IZMEĐU VITAMINA B12, FOLNE KISELINE I HOMOCISTEINA	...133
5.8. POTENCIJALNI MEHANIZMI METFORMINOM INDUKOVANE REDUKCIJE VITAMINA B12	...139
5.9. METFORMIN I BIOHEMIJSKI POKAZATELJI ENERGETSKOG METABOLIZMA	...146

5.10. PREPORUKE ZA LABORATORIJSKO PRAĆENJE I SUPLEMENTACIJU DEFICITA B12 KOD PACIJENATA S T2DM LEČENIH METFORMINOM	...152
6. ZAKLJUČCI	...157
7. LITERATURA	...161

Veliku zahvalnost dugujem svojim mentorima, prof. dr Nikoli Ćuriću i prof. Dr Dragani Tomić Naglič, na ogromnoj pomoći, nesebičnoj podršci, strpljenju i razumevanju u toku izrade doktorske disertacije.

Hvala i svim zaposlenima u Centru za laboratorijsku medicinu, Kliničkog centra Vojvodine koji su mi pomogli prilikom izrade ovog rada. Posebno se zahvaljujem svom kolektivu: Odeljenju za endokrinološku dijagnostiku, bez čije tehničke podrške ne bi bilo adekvatne realizacije ovog doktorata.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj kolegici, prijateljici i kumi, dr Miroslavi Pušari na nesebičnoj pomoći tokom prikupljanja materijala za ovo istraživanje.

Zahvaljujem se svojoj porodici, suprugu i kćerki na bezuslovnoj podršci i razumevanju.

Na kraju, zahvaljujem se mojim roditeljima, majci i ocu bez čije ljubavi, podrške i požrtvovanja ne bih bila ono što danas jesam...

1. UVOD

1.1. TIP 2 DIJABETES MELITUS

Šećerna bolest (dijabetes melitus) predstavlja metabolički poremećaj koji se karakteriše stalnom hiperglikemijom. Smatra se četvrtim vodećim uzrokom mortaliteta u Evropi i Srbiji i kao takav predstavlja ozbiljan javno-zdravstveni problem. Prema podacima iz 2011. godine, u Srbiji je približno 630 000 ljudi (8.6%) obolelo od dijabetes melitus-a, a procenjuje se da će taj broj porasti na 730 000 (10.2%) do 2030 godine [1].

Preko 90% obolelih ima tip 2 dijabetes melitusa (T2DM). Simtomi i znaci ove bolesti su blagi i razvijaju se postepeno, te u momentu postavljanja dijagnoze trećinanovootkrivenih pacijenata ima ispoljenu neku od hroničnih komplikacija poput: ishemijske bolesti srca, moždanog udara, dijabetesnog stopala i/ili mikroangiopatske promene u formi dijabetesne retinopatije, nefropatije i/ili neuropatije. Težina i ozbiljnost hroničnih, i pre svega, akutnih komplikacija u šećernoj bolesti ukazuju na neophodnost kontinuirane, metaboličke kontrole jednom dijagnostikovane šećerne bolesti, naročito kod T2DM [1].

1.1.1. Etiologija i patofiziologija tipa 2 dijabetes melitusa

Etiopatogeneza tipa 2 dijabetes melitusa je kompleksna i predstavlja kombinaciju genetskih, predisponirajućih i stečenih faktora. Pripada grupi multifaktorskih i poligenetskih oboljenja, s dokazanom, značajnom ulogom nasleđa u njegovom nastanku i razvoju. Prema studijama na jednojajčanim blizancima, verovatnoća za pojavu T2DM se kreće od 70-90 %. Kod dece

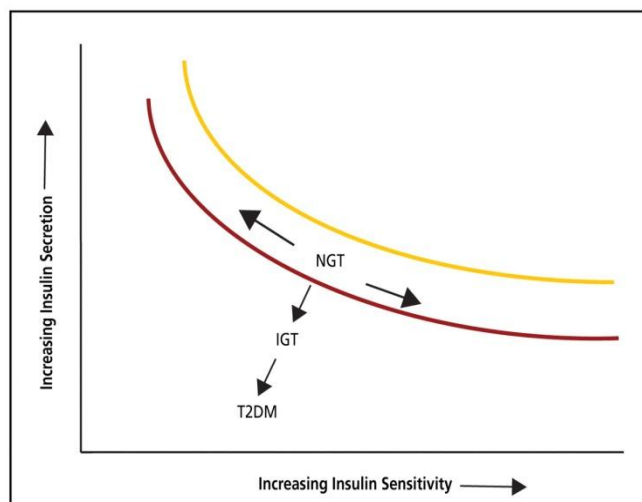
koja imaju oba obolela roditelja, utvrđen je povišen rizik obolevanja navedene bolesti od približno 40 %[2].

Geni koji su odgovorni za nastanak T2DM su nepotpuno istraženi i definisani. Do danas, utvrđeni su geni koji su nosioci relativno niskog rizika za razvoj tipa 2 dijabetes melitusa, poput gena za transkripcioni faktor 7 like 2. S druge strane, utvrđene su mutacije gena koje kodiraju sintezu PPAR- γ receptora (*peroxisome proliferators-activated receptor- γ*) odgovornog za regulaciju metabolizma glukoze i masnih kiselina. Navedene genetske abnormalnosti mogu doprineti izmenjenom režimu insulinske sekrecije te doprineti nastanku tipa 2 dijabetes melitusa[2].

Osnovne karakteristike T2DM-su insulinska rezistencija (smanjena osetljivost ili neosetljivost insulinskih receptora), izmenjeni režim rada β ćelija Langerhansovih ostrvaca pankreasa s posledičnom neadekvatnom sekrecijom i sintezom hormona insulina, povišena endogena produkcija glukoze u jetri kao i izmenjeni metabolički put masti[1, 2].

U fiziološkim uslovima relacija: insulinska osetljivost - sekrecija je opisana je eksponencijalnom funkcijom vezom (grafikon 1) [2, 3]. U situaciji kada postepeno dolazi do porasta insulinske rezistencije, β ćelije pankreasa kompenzatorno povećavaju produkciju i sekreciju insulina, s ciljem obezbeđivanja bioloških efekata insulina. U momentu kada stepen nastale insulinske rezistencije nadvlada sekretorni kapacitet β ćelija, u prvom koraku, može nastati smanjena glukozna tolerancija s kontinuirano povišenim vrednostima postprandijalne glukoze a zatim i sam tip 2 dijabetes melitus [2].

Grafikon 1: Veza između insulinske osetljivosti i sekrecije insulina [3]



Povišen stepen rezistencije insulinskih receptora na insulin, dovodi do smanjenja utilizacije glukoze od strane ciljnih ćelija tkiva i doprinosi porastu postprandijalnih vrednosti glukoze, dok istovremeno povećanje hepatske produkcije dovodi do povišenja glukoze u bazalnim uslovima. S druge strane, metabolizam glukoze nije narušen u insulin-nezavisnim tkivima.

Tačan patofiziološki mehanizam koji dovodi do nastanka insulinske rezistencije (IR) nije u potpunosti definisan i jasan. Poznato je da dolazi do smanjenja ekspresije i broja insulinskih receptora kao i aktivnosti tirozin-kinaze u skeletnim mišićima. Međutim, defekti koji nastaju na postreceptorskom nivou se smatraju predominantnim u nastanku IR. Izmenjeni režim fosfatidil inozitol-3-kinaznog (PI-3-kinaza) signalnog puta dovodi do smanjenja translokacije glukoznih transportera (GLUT4) na površinu membrane ciljne ćelije. Akumulacija lipidnih materija u skeletnim mišićima dovodi do poremećaja oksidativne fosforilacije i sinteze ATP-a u mitohondrijama, zavisne od insulina. U tim uslovima se povećano stvaraju reaktivni kiseonični radikali i drugi produkti lipidne peroksidacije. Smatra se da je insulinska rezistencija obrnuto srazmerna koncentraciji triglicerida u mišićima [4].

Masno tkivo je metabolički i endokrino veoma aktivno tkivo i kao takvo aktivno učestvuje u etiopatogenezi IR. U fiziološkim uslovima, insulin inhibiše lipolizu, međutim u uslovima postojanja insulinske rezistencije, povišena je aktivnost dva enzima: hormon senzitivne lipaze i trigliceridne lipaze. Zajedno, odgovorni su za oko 95 % hidrolize triglicerida u adipocitima te posledičnog povišenja koncentracija slobodnih masnih kiselina (SMK) u cirkulaciji [5]. Međutim, ne samo da IR dovodi do porasta slobodnih masnih kiselina, već i SMK doprinose razvoju insulinske rezistencije, naročito pri porastu procenta visceralnog masnog tkiva. Smatra se da su visceralni adipociti osetljiviji na kateholamin senzitivnu lipazu. Kako visceralno masno tkivo pripada portnom sistemu, prema ovoj teoriji, jetra je prezasićena SMK-a i postaje rezistentna na biološko dejstvo insulina. U uslovima IR, povećana je biosinteza, intrahepatička akumulacija i sekrecija triglicerida u formi VLDL čestica. Takođe, povišena koncentracija slobodnih masnih kiselina povećava produkciju glukoze u jetri, doprinosi redukciji utilizacije glukoze u mišićima i narušava funkciju β ćelija pankreasa [6].

S druge strane, u T2DM je smanjena produkcija adiponektina, odgovornog za insulinsku senzitivnost. Pitanje koje se javlja jeste da li je hipoadiponektinemija (niski cirkulišući nivoi adiponektina) rezultat insulinske rezistencije i/ili T2DM-a je pak uzrok ovog poremećaja. Adiponektin predstavlja jedan od najznačajnijih i dobro proučavanih adipokina koji je impliciran kao glavni zaštitni faktor protiv štetnih metaboličkih i kardiovaskularnih posledica u gojaznosti. Glavni insulin-senzibilišući efekat, adiponektin ostvaruje mehanizmom smanjenja glukoneogeneze u jetri, povećanjem transporta glukoze u mišiće i povećanjem oksidacije masnih kiselina u perifernim tkivima s ciljem povećanja proizvodnje ATP-a. Osim

ovih učinaka, istraživana je i potencijalna uloga adiponektina na regulaciju sekretorne aktivnosti β ćelija pankreasa, kao i na potrošnju energije kroz centralno delovanje [7].

Doprinoseći faktor razvoju i daljem toku T2DM-a je i smanjenje sekretornog kapaciteta β ćelija pankreasa. Amilin (*amiloidni peptid ostrvaca*) predstavlja peptidnu strukturu sekretovanu od strane samih β ćelija, koji svojim taloženjem doprinosi degeneraciji i smanjivanju funkcionog kapaciteta istih [2].

1.1.2. Dijagnoza tipa 2 dijabetes melitusa

Prema kriterijumu koji je predložila Svetska Zdravstvena Organizacija (SZO), dijagnoza dijabetes melitusa se postavlja na osnovu bazalnih vrednosti glukoze, vrednosti glukoze u plazmi nakon dvočasovnog oralnog glukoza tolerans testa (OGTT) i/ili vrednosti gliciranog hemoglobina A1c (HbA1c) [8]. Stepeni poremećaja glikoregulacije su klasifikovani u tri kategorije: povišena glikemija našte (*FPG- fasting plasma glucose*), smanjena glikozna tolerancija (*IGT- impaired glucose tolerance*) i dijabetes melitus. Osobe koje imaju prvi ili drugi poremećaj glikoregulacije se definišu kao pre-dijabetesno stanje i prema podacima kojim ADA (*American Diabetes Association*) raspolaže imaju povišen (25-40 %) rizik za nastanak dijabetes melitusa unutar pet godina [9].

Tabela 1: Procena stepena poremećaja glikoregulacije[8]

2h OGTT	Glu 0'	Glu 120'	HbA1c
Fiziološka glikoregulacija	< 6.1mmol/L		
Povišena glikemija našte (FPG)	> 6.1 mmol/L < 7.0 mmol/L	< 7.8 mmol/L	
Smanjena glikozna tolerancija (IGT)	> 6.1 mmol/L < 7.0 mmol/L	>7.8 mmol/L <11.1 mmol/L	
Dijabetes melitus (DM)	> 7.0 mmol/L Bilo koja glikemija u toku dana > 11.1 mmol/L	> 11.1 mmol/L	> 6.5 % (> 48.0 mmol/mol)

Legenda: 2h OGTT- dvočasovni oralni glukoza tolerans test; glu 0'- glikemija u nultom minutu OGTT testa; glu 120'- glikemija u 120' minutu OGTT testa;

1.1.3. Terapija tipa 2 dijabetes melitusa

Prvi korak u započinjanju terapije T2DM podrazumeva promene u načinu života koje pre svega, podrazumevaju: korekciju nezdravih navika u ishrani, kontrolu telesne mase kao i povećanje svakodnevne fizičke aktivnosti [9].

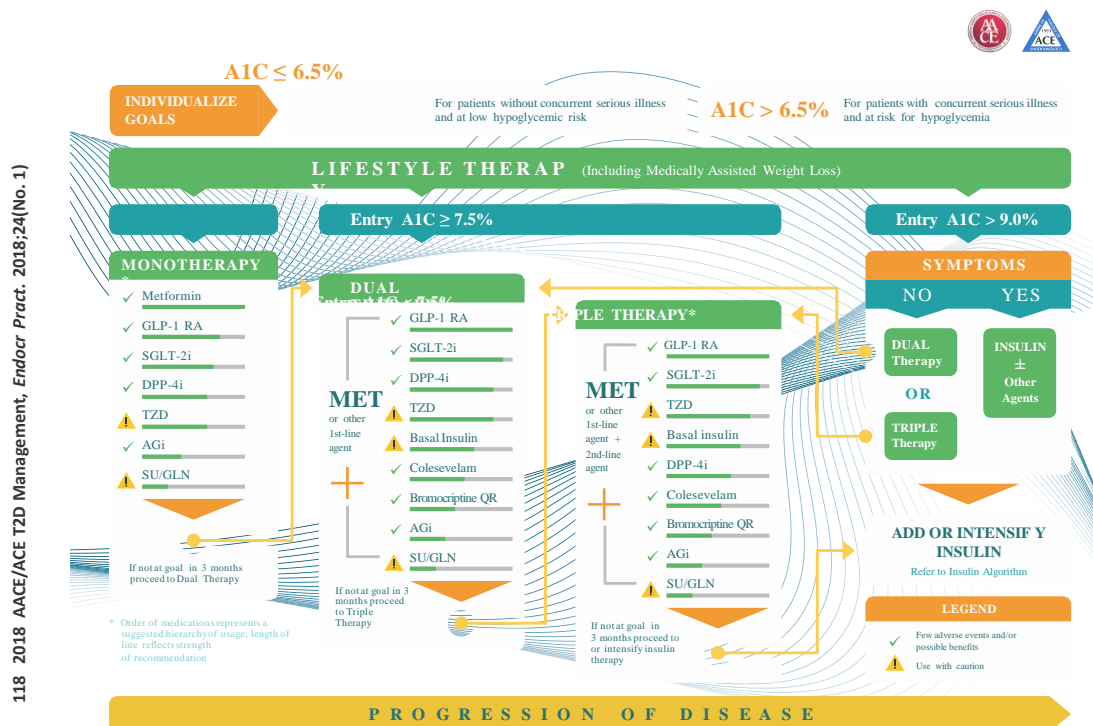
Sledeći korak u terapijskom pristupu T2DM predstavlja uvođenje medikamentne terapije. Medikamentna terapija obuhvata individualizovanu i sekvencijalnu primenu farmakološkog agensa u četiri osnovna nivoa (tabela 2). U svakom od koraka, uvođenje monoterapije ili odgovarajuće kombinacije farmakoloških agenasa, određuje se individualno u zavisnosti od: efikasnosti u postizanju ciljnih vrednosti HbA1c-a, sklonosti ka hipoglikemijskim krizama, promeni u telesnoj težini, pojavi neželjenih dejstava ali i troškova primenjenih terapijskih sredstava [10].

Prvi lek izbora u započinjanju medikamente terapije predstavlja metformin [9, 10]. Ako su, na samom početku dijagnostikovanog T2DM, vrednosti HbA1c jednake ili više od 7.5 % (58.5 mmol/mol) preporuka je uvođenje dvojne, kombinovane medikamentne terapije. Međutim, ukoliko su vrednosti glukoze u krvi visoke i prevazilaze graničnih 16.7 mmol/L i/ili vrednosti HbA1c iznad 9.0 % (74.9 mmol/mol) preporučuje se uvođenje injektabilne (insulinske) terapije, koja može biti privremena.

Ukoliko se nakon tri do šest meseci ne postigne ciljna vrednost HbA1c, preporučuje se prelazak, s prvog, na sledeći korak u medikamentnoj terapiji T2DM-a koja podrazumeva kombinovanu terapiju s uvođenjem jednog ili dva agensa, oralnih ili injektabilnih [10].

Na kraju, velikom broju pacijenata obolelih od T2DM-a jeste neophodna insulinska terapija, samostalno ili u kombinaciji s drugim farmakološkim sredstvima. Insulinska terapija se najčešće započinje primenom bazalnog insulina i to pojedinačnom dnevnom dozom od 0.1-0.2 j/kgTT. Kod pacijenata s višim hiperglikemijskim epizodama (HbA1c >9.0 %), pored bazalnog insulina, mogu se uvesti i bifazni ili prandijalni insulini pred obrok u pojedinačnim, individualnim dozama u zavisnosti od dnevnog profila glikemija [10].

Tabela 2: Uvođenje terapije antihiperглиkemijskim agensima u T2DM [10]



Legenda: SU- preparat sulfonilureje; TZD- tiazolidindion; DPP4-i- inhibitori dipeptidil-peptidaze; SGLT2-I - inhibitori natrijum-glukoznog kotransportera 2 ; GLP-1 RA - glukagon lajk peptid-1 agonisti receptora;

Inicijalno, uz promenu životnih navika i načina ishrane, monoterapija metforminom predstavlja optimalnu farmakološku opciju kod pacijenata s T2DM-om. Nakon određenog vremena metformin postaje nedovoljno efikasan farmakološki agens u glikoregulatornim procesima. Svi opcioni, oralni farmakološki agensi kombinovani s optimalnom dozom metformina imaju približno jednak terapijski učinak, redukujući u proseku vrednosti HbA1c za oko 0.8-2.2 % (~ 2 mmol/mol) ali s različitim implikacijama na promenu u telesnoj masi kao i sklonosti ka hipoglikemijskim krizama [10, 11].

Kombinacija dvojne terapije metformina i preparata sulfonilureje predstavlja jednu od najčešćih kombinacija. Zajedno, doprinose efikasnijoj metaboličkoj kontroli i redukciji HbA1c od 0.8-1.5 %. Rezultati kliničkih ispitivanja ukazuju da navedena dvojna terapija dovodi do značajnog smanjenja opšte stope mortaliteta kod pacijenata s T2DM [12].

Kombinacija metformina i nekog od agenasa iz grupe tiazolidindiona dovodi do značajnog pada vrednosti HbA1c, porasta stepena insulinske senzitivnosti te posledičnog poboljšanja sekretorne uloge β ćelija pankreasa [13].

Prema mehanizmima dejstva, metformin i inhibitor DPP-4 (inhibitor dipeptidil-peptidaze 4) u terapiji T2DM-a predstavljaju komplementarnu kombinaciju. Inhibicijom enzima DPP-4, povećana je plazmatska koncentracija i dejstvo GLP-1 na β ćelije pankreasa. S druge strane, agonisti GLP-1 receptora takođe pripadaju grupi farmakoloških sredstava zasnovanih na regulaciji inkretinske osovine. Klinička studija iz 2012. godine je pokazala značajniji pad HbA1c i efikasniju metaboličku kontrolu primenom dugo-delujućeg agoniste GLP-1 receptora i metformina u odnosu na kombinaciju metformin- inhibitor DPP-4 [14].

1.1.3.1. Terapija dijabetes melitusa tip 2 METFORMINOM

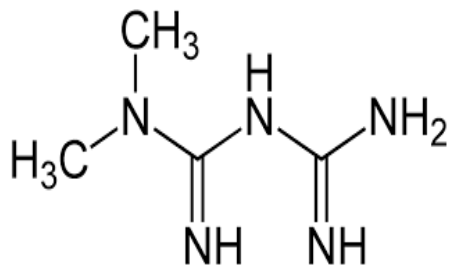
Metformin je prvi lek izbora u medikamentnoj terapiji T2DM-a i kao takav predstavlja najčešće prepisivan lek na nivou svetske populacije (~ 120 miliona) [15]. Prema prospektivnoj studiji iz 1998. godine sprovedene u Velikoj Britaniji (*United Kingdom Prospective Diabetes Study-UKPDS*), kontinuirana primena metformina u dužem vremenskom periodu značajno smanjuje smrtnost usled dijabetesa i/ili komplikacija same bolesti, povećavajući insulinsku osetljivost, istovremeno redukujući telesnu masu kao i

učestalost hipoglikemijskih kriza u odnosu na pacijente koji su lečeni drugim terapijskim agensima [16].

1.1.3.1.a. Istorijat metformina

Prvobitna interesovanja za farmakološka svojstva bigvanidnih jedinjenja vezana su narodnu medicinu i upotrebu biljke ždraljevine (*Galega officinalis*) [17]. Navedena biljka je bila osnova za ekstrakciju alkaloida galegina koji ima bigvanidnu strukturu (*izoamilengvanidin*) [17].

Međutim, u naučnim krugovima, metformin (*1,1-dimetilgvanidin*) je, kao sintetski bigvanidin, prvi put opisan 1922. godine od strane Wenera i Bella [18] (shema 1). Metformin je imao najjače hipoglikemijsko dejstvo u odnosu na sve do tada poznate oblike bigvanida, ispitivan na eksperimentalnim životinjama (pacovi). Zahvaljujući filipinskom lekaru (Eusebio Y. Garcia), 1950.g, metformin je po prvi put upotrebljen kod ljudi obolelih od influence. Tom prilikom je ustanovljeno da metformin dovodi do značajnog snižavanja nivoa glukoze u krvi [19].



Shema 1: Hemijska formula 1,1- dimetilgvanidin

Konačno, francuski dijabetolog je prvi put 1957. godine primenio metformin u terapiji šećerne bolesti i utemeljio naziv „glucofage“ (onaj koji jede glukozu) [20]. Ipak, širu upotrebu metformin doživljava sedamdesetih godina prošlog veka. Američka Asocijacija za hranu i lekove (FDA) zvanično odobrava metformin u terapiju T2DM tek 1994. godine [21].

1.1.3.1.b. Indikacije

Ukoliko ne postoje ograničenja, metformin predstavlja lek prvog izbora u medikamentnoj terapiji T2DM. Zbog svojih farmakoloških svojstava koristi se i u terapiji predijabetesnog stanja, gestacijskog dijabetesa, kao i sindroma policističnih jajnika [22]. Pored toga, rađena su klinička ispitivanja u kojima je ispitivana efikasnost upotrebe metformina u terapiji nealkoholne bolesti jetre, maligniteta, preranog puberteta ali i kao deo anti-aging programa [23, 24].

1.1.3.1.c. Kontraindikacije

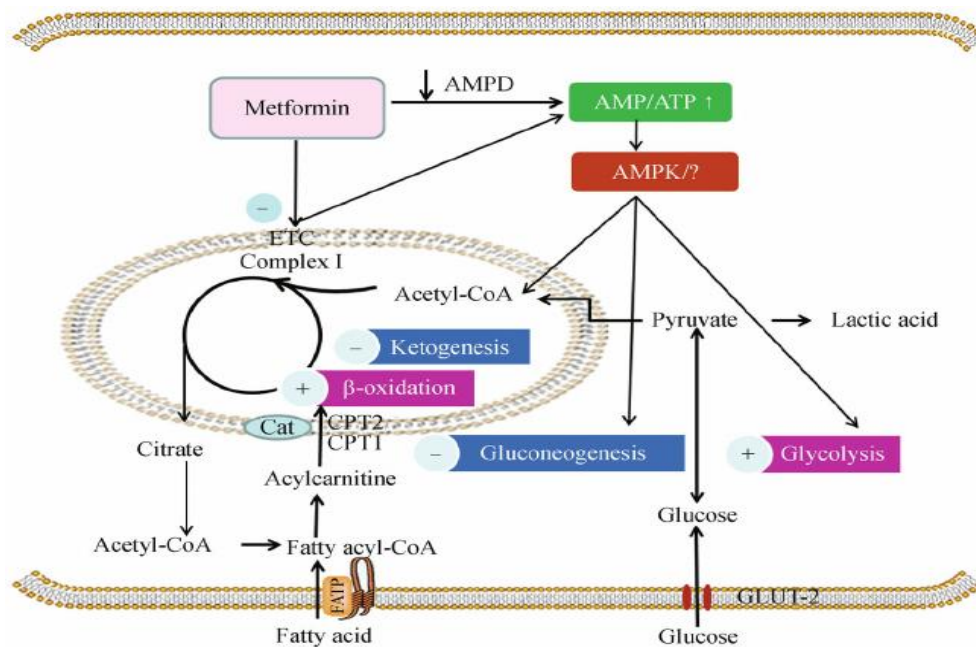
Metformin ima nekoliko kontraindikacija koje se odnose, pre svega, na stanja s povišenim rizikom od nastajanja laktatne acidoze, bubrežne i jetrene insuficijencije [25]. Međutim, mnogo češće se navode privremene kontraindikacije poput: vremenskog perioda nakon izvođenja neke radiološke dijagnostičke procedure koja podrazumeva upotrebu jodnih kontrastnih sredstava (PET-CT, angiogram) [26], akutne alkoholne intoksikacije, akutnog infarkta miokarda kao i laktacije porodilja [11].

1.1.3.1.d. Mehanizam dejstva

Osnovni mehanizam dejstva metformina je inhibicija glukoneogeneze u jetri. Istovremeno, metformin stimuliše glikolizu i β - oksidaciju masnih kiselina, dok inhibiše ketogenezu [15].

Tačan molekularni mehanizam dejstva ovog leka nije dovoljno detaljno objašnjen i jasan, ali je poznato da metformin vrši inhibiciju elektron-transportnog lanca mitohondrija (kompleks I), kao i aktivaciju AMP-zavisnu protein kinazu (AMPK). Takođe, poznato je da su u uslovima kontinuirane metforminske terapije, inhibisani i sledeći enzimi poput: adenilne

ciklaze (redukujući sintezu cAMP), glicerofosfat dehidrogenaza ili i fruktoza 1,6-difosfataze, centralnog enzima u procesu glukoneogeneze [27] (shema 2).



Shema 2: Molekularni mehanizam dejstva metformina [27]

Smatra se da metformin primarno ima za cilj inhibiciju kompleksa I elektron-transportnog lanca mitohondrija (NADH: ubiquinon oksidoreduktaza). Ova prolazna inhibicija dovodi do značajne redukcije energetske stanja ćelije, koja je izražena matematičkim iskazom $([ATP]+0.5*[ADP])/([ATP]+[ADP]+[AMP])$, s posledičnom smanjenom produkcijom ATP molekula te povećanjem ADP/ATP i AMP/ATP odnosa. Porast nivoa citosolnog ADP i AMP-a je okidač za aktivaciju AMPK, koja onda dalje koordiniše razgranatu signalnu mrežu i reguliše ćelijski energetske metabolizam [28]. Aktivacija AMPK dovodi do inhibicije glukoneogeneze, najefikasnijeg antihiperглиkemijskog efekta metformina. Aktivacija LKB1/AMPK (*hepatična kinaza B1/AMP-zavisna kinaza*) enzimskog puta odgovorna je za regulaciju i ekspresiju gena koji regulišu proces glukoneogeneze. Taj put regulacije je

posredovan direktnom koordinacijom transkripcionim koaktivatorom CRTC2 (*CREB regulišući transkripcioni koaktivator 2*) odgovornim za održavanje homeostaze glukoze u periodima između obroka [29]. Novija istraživanja ukazuju i na mogućnost posrednog uticaja metformina na CRTC2 aktivnost preko povećanja aktivnosti hepatičnog enzima, NAD⁺ zavisne deacetilaze sirtuin 1 (SIRT-1) [30].

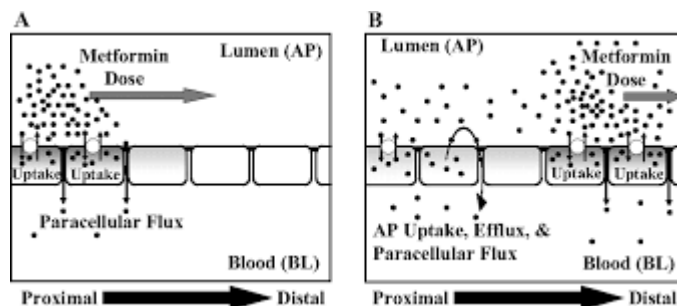
Metformin dovodi do povećanja insulinske osetljivosti na nivou skeletnih mišića. Povećana aktivnost AMPK stimulisana metforminom doprinosi povećanoj aktivnosti GLUT 4 transportera. Povećanje insulinske osetljivosti može biti i AMPK nezavisno i podrazumeva učešće p38 MAPK (*p38 mitogen aktivišuća protein kinaza*) i PKC (*protein kinaza C*) signalnog sistema [19]. Povećano preuzimanje glukoze od strane perifernih ćelija (nezavisno od insulina) može doprineti kvalitetnijem vezivanju insulina za svoje insulinske receptore, što je kliničkom studijom kod pacijenata s T2DM i pokazano [31].

Takođe, postoje dokazi koji govore u prilog mehanizma dejstva metformina na nivou gastrointestinalnog trakta. Smatra se da metformin ima višestruku modulatornu ulogu na određene komponente inkretinske osovine [32]. Maida i saradnici su utvrdili da metformin doprinosi značajnom povišenju plazmatskih koncentracija GLP-1 (*glukagon like peptid-1*) [33]. Potencijalni mehanizmi koji objašnjavaju povećanje nivoa ovog, insulinotropnog hormona mogu biti direktni i indirektni. Direktni uticaj, metformin ostvaruje povećanjem ekspresije prekursora glukagona (preproglukagona i proglukagona). Posredan uticaj, metformin ostvaruje AMPK-zavisnom redukcijom apsorpcije žučnih kiselina u gastrointestinalnom traktu. Povišena, intraluminalna koncentracija žučnih kiselina predstavlja okidač za stimulisanu aktivnost L ćelija i sekreciju GLP-1 [34, 35].

Metforminska terapija ima povoljan učinak na metabolizam masti, redukujući stepen steatoze hepatocita ali i nivo cirkulišućih VLDL čestica bogatih trigliceridima [15]. Mehanizam kojim se objašnjava ovaj povoljan hipolipemijski efekat metformina je takođe, AMPK zavisan i odvija se, pre svega, posredstvom aktivacije enzima Acetil-CoA karboksilaze (ACC).

1.1.3.1.e. Farmakokinetika metformina

Primenjivan oralno, metformin ima bioraspoloživost između 50 % i 60 % [36]. Maksimalne koncentracije u krvi se postižu nakon nekoliko časova (jedan do tri časa za brzo-oslobađajuće oblike, odnosno četiri do osam časova za sporo-oslobađajuće forme ovog leka). U cirkulaciji, u najvišem procentu je zastupljen u jonizovanom obliku, kao katjon (a svega oko 0.01 % u nejonizovanoj formi). Ova osobina metformina određuje i njegovu lipofilnost, te je dominantni mehanizam njegovog transporta kroz ćelijske membrane posredovan aktivnošću i raspoloživošću odgovarajućih transportnih proteina poput: familije transportnih proteina za organske katjone (OCT), zajedničkih antiportera za lekove i toksične materije (MATE) kao i plazma-membranskih monoaminskih transportera (PMAT) [37]. Pored toga, postoje rezultati eksperimentalnih studija koje dokazuju i mogućnost pasivne apsorpcije metformina, (paracelularno) kao i bidirekcionog transporta na luminalnoj strani membrane enterocita, distalnije duž gastrointestinalnog trakta.



Shema 3: Transport metformina u gastro-intestinumu prema Proktoru i autorima [37]

Najvećim delom, metformin se apsorbuje na nivou enterocita tankog creva, zahvaljujući odgovarajućim transportnim proteinima, na luminalnoj strani citoplazmatskog membranskog transportnog proteina SLC29A4 kao i OCT-1 na bazolateralnoj strani. Primarni način transporta metformina u hepatocite je, takođe, posredovana povećanom ekspresijom i aktivnošću transportnih proteina, OCT-1 (SLC22A1) i OCT-3 (SLC22A3) [38].

Metformin se elimiše iz organizma u nepromenjenom (nemetabolisanom) obliku putem aktivne tubulske sekrecije, bubrežima ($> 90\%$). Na bazolateralnoj strani metformin preuzimaju OCT-2 (SLC 22A2), dok je konačna urinarna eliminacija posredovana aktivnošću dve vrste transportnih proteina: SLC47A1 (MATE-1) i SLC47A2 (MATE-2) [38]. Vreme polueliminacije za metformin iznosi 6.2 časa [39].

1.1.3.1.f. Neželjena dejstva

Najčešće opisivana neželjena dejstva metformina vezana su za gastrointestinalne smetnje poput: dijareje, mučnine, povraćanja, nadutosti i grčeva. Navedena neželjena dejstva se, u najvećem procentu, javljaju u prvim danima započete terapije višim, pojedinačnim, dnevnim dozama metformina. Postepenim povećanjem do optimalne dnevne doze, značajno se redukuje učestalost gastrointestinalnih smetnji [15, 25].

Najteže neželjeno dejstvo metformina predstavlja laktatna acidoza (metforminom indukovana laktatna acidoza – MALA), čija incidenca iznosi 3 na 100 000 osoba u toku godinu dana [15]. Naime, metformin svojim mehanizmom dejstva inhibiše glukoneogenezu u jetri. Kako je i laktat supstrat za glukoneogenezu, kontinuiranom upotrebom metforminskog preparata, smanjeno je preuzimanje laktata od strane jetre. Zboga toga, sva pridružena stanja i/ili oboljenja koja imaju za posledicu povećanu produkciju i retenciju laktata, nose sa sobom povišen rizik za razvoj MALA. S druge strane, postoje dokazi koji govore u prilog produkcije laktata u debelom crevu, zavisne od metformina [40, 41].

Kontinuirana upotreba metformina tokom dužeg vremenskog intervala može rezultirati izmenjenom apsorpcijom vitamina B12, povišenim rizikom ka nastanku deficita vitamina B12 te posledičnim povišenim vrednostima koncentracije homocisteina i metil-malonične kiseline u krvi [42].

1.1.3.1.g. Doziranje i predoziranje

Inicijalna dnevna doza brzo-oslobađajućeg metformina iznosi 500 mg, dva puta ili 850 mg jedamput u toku dana. U cilju postizanja optimalne, individualne doze, vrši se postepeno titriranje s 500 mg na nedeljnom, odnosno 850 mg u toku dvo-nedeljnog intervala. Maksimalna dnevna doza iznosi 2250 mg.

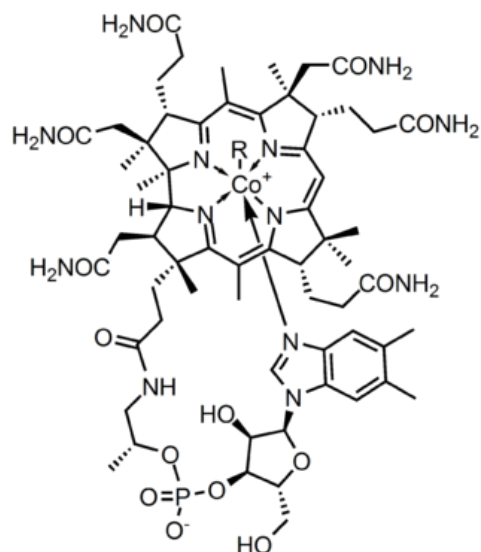
Početna dnevna doza sporo-oslobađajućeg metformina iznosi 500 ili 1000 mg jednom u toku dana. U cilju postizanja optimalne, individualne doze, vrši se postepeno titriranje pomoću 500 mg ovog leka na nedeljnom nivou, ukoliko nema izraženih neželjih dejstava leka, pre svega na nivou gastrointestinalnog trakta. Maksimalna dnevna doza iznosi 2500 mg [43].

Predoziranje metforminom je stanje koje ima veoma retku učestalost. Smara se da oralna primena metformina u dozi višoj od 5000 mg dovodi do ozbiljnih kliničkih simptoma poput: povraćanja, dijareje, tahikardije, hipo ili hiperglikemijskih epizoda [44]. Potencijalno, životno-ugrožavajuća komplikacija nastaje kao posledica akumulacije laktata i razvoja laktatne acidoze pa i same kome. Kod postojanja sumnje na predoziranje ovim lekom, postoji mogućnost laboratorijskog određivanja koncentracije metformina u krvi metodom tečne hromatografije. Pod normalnim okolnostima plazmatska koncentracija metformina se kreće između 1 i 4 mg/L, dok vrednosti koje ukazuju na stanje akutne predoziranosti su deset do trideset puta više (40-120 mg/L) [45]. Specifičnog antidota nema, a s obzirom na malu molekulsku masu metformina, preporučuje se neka od ekstrakorporalnih metoda prečišćavanja krvi (u slučajevima težih oblika predoziranosti).

1.2. VITAMIN B12

1.2.1. Definicija i izvori vitamina B12

Vitamin B12 (kobalamin, cijanokobalamin) pripada grupi hidrosolubilnih vitamina B kompleksa. Ovaj vitamin je veoma značajan u replikaciji DNK lanaca kao i u procesu eritrocitopoeze i mijelinizacije nervnih vlakana. Po svojoj hemijskoj strukturi, predstavlja jedan od najsloženijih vitamina (shema 4). Sastoji se iz 4 redukovana pirolska prstena (gradeći korin) u čijem centru se nalazi kobalt, vezan za četiri atoma azota. Kobaltno jezgro je odgovorno za biološku aktivnost ovog vitamina. U svom sastavu sadrži i odgovarajući nukleotidni ostatak, poput baze, šećera ili fosfata. U zavisnosti od pridružene složene grupe, razlikuje se nekoliko metaboličkih oblika vitamina B12: metilkobalamin, adenzilkobalamin, hidroksikobalamin i deoksiadenozilkobalamin [46].



R = 5'-deoxyadenosyl, Me, OH, CN

Shema 4: Strukturna formula vitamina B12

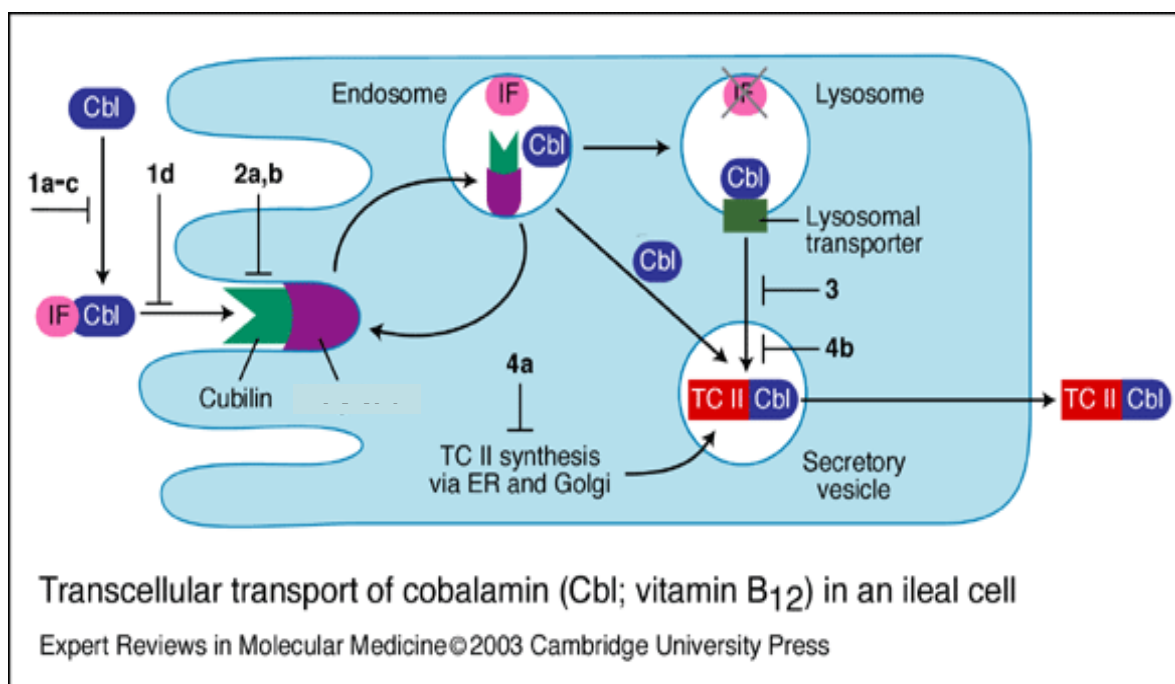
U ljudski organizam, vitamin B12 se unosi putem namirnica životinskog porekla, obogaćenih namirnica ili komercijalnih suplemenata. Vitamin B12 sintetišu mikroorganizmi (alge, cijanobakterije) koje se veoma često nalaze u simbiozi sa višim organizmima. Glavni izvori ovog vitamina su: morski plodovi, džigerica, jaja, mleko kao i fermentisani sirevi [47].

1.2.2. Metabolizam vitamina B12

U fiziološkim uslovima, alimentarno unešen vitamin B12 se absorbuje, najvećim delom, na nivou terminalnog ileuma. Osnovni preduslov za njegovu apsorpciju je intaktna želudačna sluznica i očuvana sekretorna aktivnost parietalnih ćelija. Hlorovodonična kiselina i pepsin želuca su neophodni za odvajanje kobalamina od belančevina hrane i formiranje kompleksa kobalamina sa haptokorinom iz pljuvačke. Pasažom želudačnog sadržaja u dvanaestopalačno crevo, ovaj kompleks dolazi u kontakt sa proteoliznim enzimima pankreasa pri čemu se izdvajakobalamin iz kompleksa sa haptokorinom. Nakon toga slobodni se vezuje za unutrašnji činilac (*intrinsic factor-IF*), koga u želudačni sadržaj sekretuju parijetalne ćelije želuca i stvara se novi kompleks: B12-IF. Ovaj kompleks je neophodan za apsorpciju vitamina B12 u terminalnom ileumu, ali je veoma značajan i u protekciji kobalamina pri transportu crevnog sadržaja od duodenuma do terminalnog ileuma [48]. Ovaj kompleksan sistem interakcija kobalamina i transportnih proteina u digestivnoj cevi omogućava da se apsorbuje oko 60 % od ukupne količine vitamina B12 unetog oralnim putem.

Ovaj proces apsorpcije vitamina B12 je složen i zahteva učešće nekoliko transportnih proteina i receptora, poput: kubilin-a (CUBM), amnionless-a (AMN) kao i receptoravezanog proteina (PAR). Kompleks vitamin B12-IF se vezuje za kubilin čime započinje Ca^{2+} zavisna endocitoza navedenog kompleksa. Proces internalizacije kompleksa

vitamin B₁₂-IF posredovan je aktivnošću AMN-a, transmembranskog proteina, koji sa kubilinom na citoplazmatskoj membrani enterocita formira funkcionalnu celinu CUBAM. U endozomu započinje odvajanje CUBAM kompleksa od B₁₂-IF, pri čemu se receptorski kompleks CUBAM translocira na citoplazmatsku membranu, a nosač kobalamina, IF biva destruisan (shema 5). Nakon toga, oslobođeni B₁₂ se vezuje za transkobalamin II (ApoTC, TC II) u sekretornim vezikulama. S druge strane, smatra se da se između 1 i 5 % kobalamina apsorbuje pasivnim procesom, difuzijom duž celog gastrointestinalnog trakta [49].



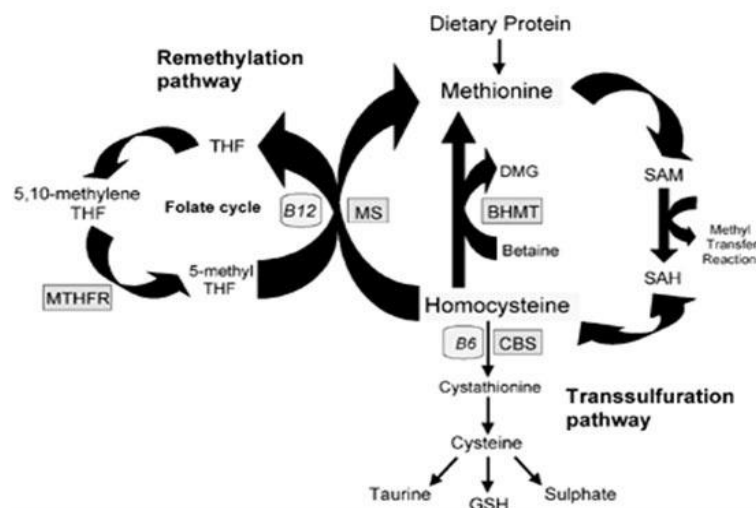
Shema 5: Apsorpcija vitamina B₁₂ na nivou terminalnog ileuma prema Seetharam-u i autorima [50]

U cirkulaciji, vitamin B₁₂ je najzastupljeniji u vezanoj formi za glikoziliranu, belančevinu haptokorin (Transkobalamin I, Transkobalamin III ili R-protein) koji kao takav nije dostupan ciljnim tkivima [51, 52]. Samo kompleks B-12-TC II je biološki raspoloživ ciljnim ćelijama koje imaju eksprimovane, membranske receptore za navedeni kompleks [53]. Nakon

specifične veze ligand-receptor, vezani kompleks B12-TC II endocitozom ulazi u citoplazmu ciljane ćelije, gde se naknadno lizozomalnom obradom, odvaja slobodni B12. Neophodan preduslov za posredovanu endocitozu vitamina B12 je prisustvo AMN-a i TC II receptora.

1.2.3. Fiziološka uloga vitamina B12

Vitamin B12 jeste esencijalan u tri enzimska procesa: u procesu remetilacije homocisteina (Hcy) i transformacije u esencijalnu amino-kiselinu metionin, transformaciji L-metilmalonil koenzima A u sukcinil koenzim A, kao i prelasku 5-metiltetrahydrofolata u tetrahydrofolat koji je neophodan za proces sinteze DNK [54]. Biološki aktivni oblici vitamina B12, metilkobalamin i adenzilkobalamin predstavljaju kofaktore u aktivnosti dva enzima: metionin sintaze i metil-malonil-koenzim A mutaze (shema 6).



Shema 6: Vitamin B12 u metaboličkim procesima [49]

Metionin sintaza pripada grupi metiltransferaza i katališe reakciju remetilacije amino kiseline homocisteina, s ciljem nastanka metionina. Metabolički aktivna forma vitamina B12 koja posreduje u navedenoj biohemijskoj reakciji jeste metilkobalamin. U ovoj reakciji kao donor

metil grupe služi 5-metiltetrahidrofolat koji tokom reakcije prelazi u tetrahidrofolat. Drugi metabolički aktivan oblik ovog vitamina je adenzilkobalamin koji učestvuje u reakciji transformacije L-metilmalonil koenzima A u sukcinil-koenzim A, značajnog u metabolizmu masti i ciklusu trikarbonskih kiselina.

Takođe, vitamin B12 ima esencijalnu ulogu u procesu sinteze mijelinskih struktura. U nedostatku ovog vitamina dolazi do intraćelijske akumulacije metilmalonične kiseline (MMA) koja doprinosi neadekvatnoj sintezi mijelina, neposrednim i posrednim mehanizmima [55]. MMA se umesto malonične kiseline inkorporiše u mijelinsku strukturu čineći je nedovoljno otpornom i fragilnom. S druge strane, nedovoljna obnova metionina, zavisna od vitamina B12, može dovesti do nepotpune sinteze mijelina (metilacija mijelina uz učešće S-adenozil metionina).

1.2.4. Deficit vitamina B12

U literaturi, definicija deficita vitamina B12 se menjala i modifikovala u zavisnosti od laboratorijskih performansi, senzitivnosti i specifičnosti laboratorijskih testova za procenu statusa vitamina B12. U poslednje dve decenije, definisani su visoko-senzitivni, laboratorijski testovi, koji su omogućili tačniju i precizniju dozažu koncentracije vitamina B12 u vanćelijskim telesnim tečnostima. Navedenim laboratorijskim priborom i danas se pokušava bliže definisati stanje subkliničkog i kliničkog deficita kobalamina [56].

Prema definiciji, subklinički deficit B12 se karakteriše odsustvom kliničkih simptoma i znakova karakterističnih za nedostatak ovog vitamina, isključivo se oslanjajući na laboratorijsku, biohemijsku potvrdu. Pojam subkliničkog deficita isključivo zavisi od načina interpretacije i postavke cut-off vrednosti, odnosno ni danas ne postoji jedinstven kriterijum

kojim se potvrđuje ovaj poremećaj, jer se granične vrednosti u odnosu na subklinički deficit vitamina B12 postavljaju arbitrarno, prema rezultatima pojedinih istraživanja.

Dijagnoza kliničkog deficita B12, prema rezultatima laboratorijskih testova, postavlja se na osnovu sledećih kriterijuma:

- Ako su vrednosti vitamina B12 (ukupnog) u serumu < 150.0 pmol/L, uz odgovarajuće kliničke i hematološke manifestacije karakteristične za deficit ovog vitamina;
- Ako su vrednosti vitamina B12 (ukupnog) u serumu < 150.0 pmol/L i vrednosti homocisteina u plazmi > 13 $\mu\text{mol/L}$ ili MMA > 0.4 $\mu\text{mol/L}$ (u odsustvu hronične bubrežne bolesti, izolovanog deficita folne kiseline i/ili vitamina B6).

1.2.4.1. Epidemiologija deficita vitamina B12

Prema rezultatima epidemioloških studija, prevalenca deficita vitamina B12 iznosi oko 20 %. (5- 60 %, u zavisnosti od kriterijuma za postavljanje dijagnoze deficita vitamina B12 kao i starosne dobi ispitanika). Učestalost deficita vitamina B12 je najniža u pedijatrijskom uzrastu, između 1% i 3 %, s nešto većom učestalošću kod dece starosti od jedne do tri godine [48]. Prevalenca deficita vitamina B12 u grupi ispitanika starosti od 20-39 godina iznosi oko 3%, dok je ona neznatno viša u starosnoj grupi između 40-59 (4 %) [48]. Kod ispitanika starijih od šezdeset godina, prevalenca deficita ovog vitamina značajno raste i kreće u rasponu između visokih, 10% i 43 % [57]. Ukoliko se dijagnoza deficita vitamina B12 postavlja isključivo na osnovu donje cut off vrednosti ukupnog vitamina B12 (< 150.0 pmol/L) ona je prisutna u intervalu od 10 % do 15 %, dok istovremenim određivanjem

jednog od direktnih metaboličkih produkata koji se stvaraju u nedostatku vitamina B12 (homocistein i/ili MMA), prevalenca značajno raste na vrednost iznad 40 % [58].

1.2.4.2. Uzroci deficita vitamina B12

Deficit vitamina B12 može nastati kao posledica različitih patofizioloških mehanizama. U tabeli 3 su navedeni mogući uzoci nastanka deficita ovog vitamina.

Tabela 3: Uzroci deficita vitamina B12

Uzroci deficita vitamina B12	
Neadekvatan unos kroz namirnice bogate B12 (malnutricija)	Vegeterijanci Hronični alkoholizam Starija populacija (neadekvatna ishrana)
Smanjena raspoloživost i apsorpcija (malapsorpcija)	Hronični atrofični gastritis (tip B) Perniciozna anemija (Atrofični gastritis tip A) Gastrektomija Malapsorpcija B12 iz hrane Hronične inflamatorne bolesti creva (Kronova bolest) Glutenska enteropatija Parazitarna infestacija (Riblja pantljičara) Resekcija ileuma
Genetski uzroci	Deficit transkobalamina II
Prolongirana upotreba odgovarajućih farmakoloških agenasa	Blokatori histaminskih H2 receptora Inhibitori protonske pumpe Bigvanidi (Metformin)

Najčešći uzrok deficita vitamina B12 kod starijih, odraslih osoba predstavlja smanjena raspoloživost vitamina B12 iz namirnica, kao posledica hipohloridije te smanjenog odvajanja samog vitamina iz hrane (do 60 %) [49]. Mehanizam ovog tipa „maldigestije“ nije jedinstven i može obuhvatiti: atrofiju želudačne sluznice (atrofični gastritis), hroničnu *helicobacter pylori* infekciju i bujanje bakterijske flore u gastrointestinalnom traktu [49, 59]. Na drugom mestu, kao mogući uzrok deficita vitamina B12 je perniciozna anemija, s učestalošću između

15 % i 25 % [60]. Značajno ređe, uzrok deficita ovog vitamina su neadekvatan unos namirnica udružen s malnutricijom (2 %) kao i hiruške intervencije na nivou želuca i/ili ileuma (1 %). U oko 10 % slučajeva, primarni uzrok deficita vitamina B12 nije poznat [61].

1.2.4.3. Kliničke manifestacije deficita vitamina B12

U približno 30 % slučajeva, pacijenti s postavljenom dijagnozom deficita vitamina B12 imaju slabo ispoljene ili potpuno odsutne kliničke simptome i znake karakteristične za deficit ovog vitamina [62]. Megaloblasna, makrocitna anemija, s porastom MCV-a i prisutnom dominacijom anizocitoze, poikilocitoze kao i hipersegmentiranosti neutrofilnih granulocita u razmazu periferne krvi, predstavljaju karakterističnu hematološku manifestaciju navedenog poremećaja. Međutim, u momentu postavljanja dijagnoze, u 28 % slučajeva vrednosti koncentracija hemoglobina su u granici referentnog intervala, dok je MCV u fiziološkom opsegu u 17 % slučajeva [54]. U tabeli 4 se nalaze najčešći znaci deficita vitamina B12.

Tabela 4: Kliničke manifestacije deficita vitamina B12

Kliničke manifestacije deficita B12	
Kožne	Hiperpigmentacija Vitiligo Bledilo
Gastrointestinalne	Mučnina Glositis (Hanterov) Žutica
Hematološke	Anemija (Megaloblasna) Trombocitopenija Pancitopenija
Kardio-vaskularne	Tahikardija Palpitacije
Neuro-psihijatrijske	Periferna neuropatija Smanjenje kognitivnih sposobnosti Poremećaji hoda Slabost

1.2.4.4. Laboratorijski testovi u dijagnostici deficita vitamina B12

1.2.4.4.a. Ukupni vitamin B12

Osnovna laboratorijska dijagnostika deficita ovog vitamina obuhvata, uz određivanje parametara kompletne krvne slike (broj eritrocita, hemoglobin, MCV), ukupni vitamin B12. Danas su u upotrebi imunoeseji za automatizovano određivanje koncentracije ukupnog vitamina B12. U zavisnosti od primenjene metode, rezultati se mogu značajno razlikovati od laboratorije do laboratorije. S obzirom da imunometrijski principi ovih testova podrazumevaju primenu unutrašnjeg činioaca kao analit-vezujućeg proteina, prisusutna antitela, usmerena ka unutrašnjem činioacu u serumu ispitanika, mogu značajno interferirati i dovesti do netačnih laboratorijskih rezultata (lažno pozitivni ili lažno negativni) [63]. S druge strane, ukupni B12 odražava ukupnu koncentraciju ovog vitamina, obuhvatajući obe vezane forme ovog vitamina u krvi (značajno veći deo vezan za haptokorine i značajno manji za transkobalamin II,) [62]. Frakcija B12 vitamina vezana za haptokorine nije dostupna ciljnim ćelijama tkiva, tako da se navedenim testom, najvećim delom, određuje biološki neaktivna forma ovog vitamina koja se u funkcionom pogledu može smatrati depoom vitamina B12 u vaskulnom koritu. U zavisnosti od pridruženih patofizioloških stanja, u određenim situacijama se sreću lažno snižene vrednosti ukupnog vitamina B12 poput: upotrebe oralnih kontraceptiva, trudnoće, multiplog mijeloma kao i koegzistirajućeg deficita folne kiseline. Pored toga, kod pacijenata obolelih od mijeloproliferativnih bolesti, bolesti jetre i bubrega registrovane su lažno povišene vrednosti ukupnog B12.

Određivanje ukupnog B12 u krvi ima visoku senzitivnost, između 95 i 97 % i nižu specifičnost od 60-75 % u dijagnostici kliničkog deficita, dok u postavljanju dijagnoze subkliničkog deficita, senzitivnost je značajno niža i iznosi od 33 do 73 % [56].

U zavisnosti od laboratorijskih performansi testova za određivanje ukupnog vitamina B12, najčešće je za donju cut-off vrednost postavljena vrednost niža od 150.0 pmol/L [64]. Međutim, cut-off vrednost je, u većem broju preduzetih istraživanja, značajno varirala od 110.6 pmol/L pa i do 258.0 pmol/L. U zavisnosti od postojanja pridruženih kliničkih manifestacija deficita, dijagnostički postupak je zahtevao dodatne laboratorijske analize [64]. Odsustvo kliničke simptomatologije karakteristične za deficit vitamina B12 podrazumeva istovremeno laboratorijsko određivanje koncentracije MMA i/ili Hcy u krvi, naročito pri detekciji subkliničkog deficita. Kod pacijenata sa nisko-normalnim vrednostima ukupnog vitamina B12 i prisutnim kliničkim znacima, preporučeno je istovremeno određivanje jednog od navedena dva parametra, u cilju procene vitamin B12 zavisnog intracelularnog metabolizma.

1.2.4.1.b. Holotranskobalamin

Predstavlja biološki raspoloživu frakciju vitamina B12, vezanu u kompleks s TC II. S obzirom na svoju bioraspoloživost, dobijene rezultate kliničkih i laboratorijskih ispitivanja kao i njihovu interpretaciju, neki od istraživača (naročito u ranijem periodu) smatrali su da je holotranskobalamin (HoloTC) kao precizniji i senzitivniji biohemijski marker, naročito u situaciji odsustva ili nedovoljne ispoljenosti kliničke simptomatologije deficita vitamina B12 (subklinički deficit) [65, 66]. Prema spomenutim ispitivanjima, u postavljanju dijagnoze

subkliničkog deficita senzitivnost HoloTC-a je viša u odnosu na senzitivnost ukupnog B12 i iznosi 55-89 %, s približno istim vrednostima specifičnosti (28-77 %) [56, 67].

U laboratorijskoj praksi je zastupljeno nekoliko različitih mernih principa određivanja HoloTC, koji daju rezultate veoma sličnih vrednosti. Prva metoda zasnovana je na jon-zavisnoj precipitaciji transkobalamina i njegovoj kvantifikaciji u precipitatu. Navedena metoda je unapređena primenom specifičnih antitela u procesu separacije transkobalamina [68]. U svom laboratorijskom radu, Refsum i saradnici su primenjivali mikrobilošku metodu [66]. Danas se široko primenjuju imunometrijski principi određivanja HoloTC-a, počevši od radio-imunometrijskih (*RIA*), ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) do CMIA (*Chemiluminescence immunoassay*) postavljenih na automatizovane imunohemijske platforme.

U zavisnosti od primenjivane metode, menjale su se donje cut-off vrednosti između 20 i 50 pmol/L. U literaturi, najčešće se koristi vrednost niža od 35 pmol/L [64].

1.2.4.1.c. Homocistein

Homocistein (Hcy) predstavlja aminokiselinu, produkt intraćelijskog metabolizma esencijalne aminokiseline metionina. Procesom remetilacije, uz prisustvo dovoljnih koncentracija vitamina B12 i folne kiseline, homocistein se ponovo metaboliše u metionin. Transulfuracijom se u prisustvu vitamina B6 metaboliše u cistationin. U situaciji sniženih, unutarćelijskih koncentracija jednog i/ili više vitamina, dolazi do povećane produkcije i akumulacije homocisteina [69]. Od ukupne dnevne, unutarćelijske produkcije, približno 10 % se nalazi u cirkulaciji i predstavlja frakciju dostupnu za laboratorijsko određivanje. Hcy se u krvi nalazi u slobodnoj (20 %), i većim delom, u vezanoj formi za transportne belančevine

(80 %, najviše albumine). Laboratorijski se određuje koncentracija ukupnog Hcy u uzorcima krvi (seruma ili plazme).

S obzirom da Hcy predstavlja unutarćelijski, metabolički produkt zavisen od prisustva i aktivnosti i vitamina B12, povišene vrednosti u plazmi mogu ukazati na nedostatak i ovog vitamina, mnogo ranije od samih koncentracija ukupnog B12 i HoloTC (subklinički deficit). Senzitivnost Hcy testa je veoma visoka i iznosi iznad 95 %. Budući da, unutarćelijska, pa samim tim i cirkulišuća koncentracija Hcy, ne zavisi samo od vitamina B12, već i od raspoloživosti folne kiseline (B9) i/ili vitamina B6, navedeni test ima relativno nižu specifičnost. U metaboličkom putu homocisteina, veoma značajnu ulogu imaju bubrezi, tako da u slučajevima hronične bubrežne insuficijencije, hiperhomocisteinemija može biti posledica navedenog stanja (oboljenja). Takođe, stanja poput: porodične hiperhomocisteinemije, izolovanog deficita folne kiseline i terapije levodopom mogu dovesti do izolovanog porasta ukupnog Hcy, nezavisno od statusa vitamina B12. Više vrednosti su prisutne kod osoba muškog pola. Porastom godina starosti, rastu koncentracije ukupnog Hcy u krvi [69].

Ukupni Hcy se može određivati nekom od hromatografskim metoda, poput HPLC-om (*highperformance liquid chromatography*) ili u novije vreme, LC-MS/MS (*tečna hromatografija-masena spektrometrija*). U rutinskom radu, kliničkih laboratorija, Hcy se meri primenom nekih od imunometrijskih metoda (FPIA, ELISA, CMIA, CLIA) [70].

U zavisnosti od primenjivane laboratorijske metode, kao gornje cut-off vrednost su uzimane vrednosti od 10.0 do 21.6 $\mu\text{mol/L}$ [70]. U kliničkoj praksi, najčešće je primenjivana gornja granična vrednost od 15.4 $\mu\text{mol/L}$. Vrednosti plazmatskih koncentracija Hcy između 15.0 i

30.0 $\mu\text{mol/L}$ odgovaraju umerenoj hiperhomocisteinemiji, a raspon od 30.0 do 100.0 $\mu\text{mol/L}$ srednje teškoj hiperhomocisteinemiji. Vrednosti više od 100.0 $\mu\text{mol/L}$ ukazuju na tešku hiperhomocisteinemiju [70].

1.2.4.1.d. Metil-malonična kiselina (MMA)

MMA predstavlja metabolički produkt, nastao kao posledica nedovoljnih koncentracija i raspoloživosti vitamina B12 u ćelijama [71]. Zbog jedinstvene kofaktorske uloge koju kobalamin ima u biohemijskoj reakciji sinteze sukcinil-CoA iz metil-malonil-CoA, laboratorijsko određivanje MMA u krvi predstavlja istovremeno najsenzitivniji (95-98 %) i najspecifičniji test (> 80 %) u proceni deficita vitamina B12. Nezavisno od statusa kobalamina, lažno povišene vrednosti MMA se mogu detektovati u slučajevima odmaklih stadijuma hronične bubrežne bolesti, bolestima štitaste žlede kao i u stanjima smanjenog volumena ekstracelularne tečnosti (hemokoncentracioni efekat) [72].

MMA se određuje metodom tačne hromatografije-masene spektrometrije (LC/MC). U zavisnosti od primenjivane laboratorijske metode, gornja cut-off vrednost se nalazi u intervalu između 0.21-0.47 $\mu\text{mol/L}$ [64].

Takođe, sukcesivno, laboratorijsko određivanje ukupnog Hcy i/ili MMA u plazmi se preporučuje u praćenju terapijskog odgovora i uspešnosti sprovedene supstitucione terapije vitaminom B12.

1.2.1.4.e. Folna kiselina

Folna kiselina (vitamin B9) pripada grupi esencijalnih, vitamina B-kompleksa [73]. Prisustvo folne kiseline je neophodno za ćelijsku deobu, sintezu i reparaciju DNK molekula kao i

metabolizam aminokiselina [74]. S obzirom na zajedničku metaboličku funkciju folne kiselinei vitamina B12, potrebno je utvrditi nivo folne kiseline u krvi zbog pouzdanije detekcije uzroka megaloblastne anemije (najčešće hematološke manifestacije deficita vitamina B12), kao i u slučaju subkliničkog deficita vitamina B12, kada su vrednosti homocisteina više od graničnih 15.4 $\mu\text{mol/L}$.

Većina kliničkih laboratorija, određuje nivo folne kiseline u serumu, nekom od automatizovanih, imunometrijskih metoda (CMIA, CLIA).

Smatra se da vrednosti $<7.0 \text{ nmol/l}$ ($<3 \mu\text{g/L}$) ukazuju na deficit folne kiseline, dok su vrednosti u rasponu od 7.0-10.0 nmol/L unutar sive zone [75].

1.2.4.5. Terapija deficita vitamina B12

Terapija kliničkog deficita vitamina B12 se zasniva na kontinuiranoj supstituciji kristalnim oblikom ovog vitamina (cijanokobalamin ili hidrosikobalamin), intramuskularno, u dozi od 1 mg svakog drugog dana, tokom prvih 10 dana. Nakon toga, prelazi se na terapiju održavanja, koja podrazumeva, u zavisnosti od vrste preparata, pojedinačnu dozu jednom mesečno (cijanokobalamin) ili jednom u četiri meseca (hidrosikobalamin) [76].

S obzirom na prisustvo apsorpcije vitamina B12 i pasivnim putem, kroz sluznicu gastrointestinalnog trakta, supstituciona terapija se može sprovoditi primenom peroralnih preparata (per os ili sublingvalno) u visokim, dnevnim dozama (125-1000 μg) [54].

1.3. VITAMIN B12 I TIP 2 DIJABETES MELITUS

Prema studiji sprovedenoj u velikoj Britaniji, 2004. godine, 20 % osoba muškog i 27 % ženskog pola, starosti od 19 do 64 godine, imale su vrednosti ukupnog vitamina B12 niže od 200.0 pmol/L [77]. Pored toga prema rezultatima EPIC (*European prospective Investigation into Nutrition and Cancer*) studije, 5 % odrasle populacije, mlađe od 60 godina ima vrednosti ukupnog B12 vitamina u krvi niže od 175.0 pmol/L [78]. S obzirom da su to vrednosti koje pripadaju intervalu graničnih vrednosti (150.0-220.0 pmol/L, subklinički deficit), relativno visok procenat Evropske populacije se nalazi u povišenom riziku za razvoj deficita vitamina B12. Oboleli od T2DM pripadaju navedenoj starosnoj kategoriji u visokom procentu, noseći, takođe povišen, opšti rizik za nastanak i razvoj deficita vitamina B12.

1.3.1. Vitamin B12 i metformin

Relacija između metforminske terapije i nivoa vitamina B12 u krvi, poznata je, i prvi put opisana još sedamdesetih godina prošlog veka [79].

Prema literaturnim podacima, u oko 10-30% slučajeva, kontinuirana upotreba metformina, tokom određenog vremenskog intervala, može dovesti do poremećaja apsorpcije na nivou intestinalnog trakta te posledičnog, snižavanja nivoa vitamina B12 u krvi [80]. U zavisnosti od primenjivane dnevne doze kao i dužine trajanja terapije metforminom, utvrđena je redukcija nivoa vitamina B12 koja se kretala u rasponu od 14 do 30 % [81].

Prema rezultatima epidemiološke studije iz 2006. godine utvrđena je značajna zavisna veza između pada vitamina B12 i doze, kao i dužine trajanja metforminske terapije [82]. S druge

strane, objavljeni su rezultati u kojima se isključivo navodi postojanje dozne zavisnosti u, metforminom indukovanom padu vitamina B12, gde porast od 10 g kumulativne doze metformina na dan doprinosi redukciji serumskog nivoa vitamina B12 za 7 % [83].

Tačan patofiziološki mehanizam koji dovodi do metforminom indukovane redukcije kobalaminu krvi nije u potpunosti ispitan i postoji nekoliko aktuelnih teorija koje pokušavaju dati odgovor na ovo kompleksno pitanje.

Poznato je da osobe obolele od T2DM-a imaju usporen motilitet tankog creva. Promena motiliteta, uz metforminom indukovanu usporenu apsorpciju glukoze, može doprineti bujanju bakterijske flore i posledičnog smanjenja raspoloživog vitamina B12 za apsorpciju u terminalnom ileumu [84]. Novija istraživanja ne idu u prilog ovoj teoriji, s obzirom da je dokazano da metformin ne dovodi do značajne promene u vremenu tranzita hrane duž gastrointestinalnog trakta (usna duplja-cekum) [85]. Takođe, utvrđeno je odsustvo bujanja bakterijske flore u crevnom traktu kod obolelih od T2DM lečenih metforminom [80].

Jedna, od novijih teorija, zasnovana je na samom mehanizmu apsorpcije kobalamina, zajedno u kompleksu sa unutrašnjim činiocem. Apsorpcija navedenog kompleksa zavisna je od intraluminalne koncentracije kalcijumovih jona (endocitoza zavisna od Ca^{2+}). S obzirom da je intraluminalno i metformin nosilac dvostrukog pozitivnog naelektrisanja, kompeticijom za kalcijum vezujuća mesta, metformin narušava sam mehanizam kalcijum posredovane apsorpcije [82]. Studija iz 2000. godine govori u prilog ovoj teoriji, jer je utvrđeno da oralna suplementacija sa 1.2 g kalcijum-karbonata, dovodi do poboljšanja procesa apsorpcije B12 vitamina [80].

Prema navedenoj teoriji, nastala malapsorpcija vitamina B12 može dovesti do razvoja deficita ovog vitamina. S obzirom na postojanje odgovarajućih rezervi navedenog vitamina, potreban je duži vremenski period do momenta ispoljavanja prvih kliničkih manifestacija B12, te pojave megaloblastne anemije i/ili razvoja periferne neuropatije. Međutim, rezultati kliničkih studija ukazuju na pad serumskih koncentracija kobalamina i u kraćim vremenskim intervalima [80, 86]. Turska grupa autora je utvrdila pad nivoa ukupnog vitamina nakon samo 1.5 meseca, od momenta uvođenja metformina [86]. Studija iz 2000. godine registruje statistički značajan pad koncentracija ukupnog vitamina B12 kao i holoTC, već nakon tri meseca od momenta uvođenja metformina u terapiju T2DM-a [80]. Suprotno tome, Leung i saradnici nisu utvrdili statistički značajan pad koncentracije ukupnog vitamina B12 i Holo TC nakon 3 meseca od uvođenja metformina [87]. Prema objavljenim rezultatima meta-analize iz 2016. godine, kod pacijenata sa T2DM-a utvrđen je pad nivoa ukupnog vitamina B12 za 53 pmol/L nakon samo 4 meseca primene metformina [88]. Slični rezultati su objavljeni i 2015. godine, u kojim je utvrđena prosečno, redukcija ukupnog B12 za 66 pmol/L [89].

Mnogo je manje kliničkih studija koje su pratile promene laboratorijskih parametara metabolizma kobalamina tokom terapijske primene metformina u T2DM, tokom dužih vremenskih intervala. Rezultati jedne, prospektivne studije pokazali su značajnu redukciju ukupnog vitamina B12 za 19 %, u toku dužeg vremenskog intervala od preko 4 godine (4 godine i 4 meseca) [42].

Vitamin B12, folna kiselina i neki drugi činioci imaju značajnu fiziološku ulogu u unutarćelijskom metabolizmu homocisteina, aminokiseline čije povišene serumske koncentracije predstavljaju nezavisan faktor rizika za nastanak koronarne, cerebrovaskularne

i periferne arterijske bolesti kao i duboku vensku trombozu [90, 91]. Demetilacijom, uz prisustvo vitamina B12 i folne kiseline, homocistein se metaboliše do esencijalne aminokiseline metionina. Smatra se da, prisustvo vitamina B12 i folne kiseline najvećim delom determiniše koncentracije ukupnog Hcy u bazalnim uslovima, dok su za postprandijalne vrednosti involvirani i neki drugi činioci [92]. Tačan patofiziološki mehanizam koji dovodi do porasta koncentracije Hcy, indukovano metforminom nije u potpunosti poznat i definisan. Porast nivoa Hcy se dovodi u direktnu relaciju s istovremenim padom nivoa vitamina B12 i/ili folne kiseline [86]. Studija je pratila promene metabolizma vitamina B12 tokom primene metforminske terapije u T2DM, i utvrdila porast plazmatskih koncentracija ukupnog Hcy za 24 % [86]. Međutim, u istoj studiji, nije potvrđena značajna interakcija između porasta ukupnog Hcy, s jedne i vitamina B12 i folne kiseline, s druge strane [86]. U velikoj studiji koja je inicijalno obuhvatila preko 1600 ispitanika, nisu utvrđene značajno više koncentracije ukupnog homocisteina u grupi T2DM lečenih metforminom [93]. Istom studijom su utvrđene značajno niže vrednosti ukupnog vitamina B12 u krvi u istoj grupi, dok su svi ispitanici imali zadovoljavajuće vrednosti folne kiseline u krvi (~ 40.0 nmol/L) [93]. Pored jasnog pada nivoa kobalamina u krvi, suprotno od očekivanog, nije došlo do porasta vrednosti homocisteina. Prema rezultatima prospektivne studije koja je pratila kratkoročni efekat metforminske terapije tokom 6 nedelja, utvrđen je porast ukupnog homocisteina za 24.4 % u odnosu na vrednosti pre momenta uvođenja samog leka [86]. Takođe, klinička studija koja je pratila efekat metforminske terapije tokom dužeg vremenskog perioda, utvrdila je pad koncentracije Hcy, ali bez statističke značajnosti [90].

Poznato je da svojim mehanizmom dejstva, metformin doprinosi povećanju stepena insulinske osetljivosti [19]. U uslovima poboljšane insulinske senzitivnosti, registrovan je

porast nivoa Hcy u krvi u grupi nedijabetičnih ispitanika [94]. Međutim, sam mehanizam koji bi objasnio direktnu relaciju: homocistein - insulinska senzitivnost, nije dovoljno ispitan i poznat. Sahin i autori su sugerisali da, zbog odsustva inverzne relacije homocistein - B12 i folne kiselina, porast ukupne senzitivnosti na insulin može biti odgovoran za porast homocisteina [86].

1.3.2. Suplementacija vitaminom B12 u dijabetes melitusu tip 2 lečenih metforminom

Na osnovu rezultata pojedinačnih kliničkih studija, postoje izvedeni zaključci o neophodnosti određivanja nivoa vitamina B12 kod pacijenata obolelih od T2DM-a lečenih višim dnevnim dozama metformina, tokom dužeg vremenskog perioda [82, 95, 96]. Međutim, do danas, ne postoji ujednačen stav, te zvanične preporuke o laboratorijskom praćenju parametara statusa vitamina B12, eventualnoj supstitucionoj terapiji i primeni preparata vitamina B12 kod T2DM pacijenata lečenih metforminom.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I RADNA HIPOTEZA

2.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Utvrditi nivoe, dinamiku, trendove i učestalost promena ukupnog vitamina B12 (kobalamina), holotranskobalamina (HoloTC), homocisteina (Hcy) i folne kiseline u toku ispitivanja kod pacijenata s tipom 2 dijabetes melitusa.
2. Utvrditi stepen inverzne korelacije između serumskih koncentracija ukupnog vitamina B12, holotranskobalamina i homocisteina u toku ispitivanja kod pacijenata s tipom 2 dijabetes melitusa.
3. Ispitati uticaj dužine ekspozicije metforminu na intenzitet pada ukupnog vitamina B12 i holotranskobalamina u toku ispitivanja kod pacijenata s tipom 2 dijabetes melitusa.

2.2. HIPOTEZE OD KOJIH SE U ISTRAŽIVANJU POLAZI

1. Primena metformina u terapiji dijabetes melitus-a tip 2 dovodi do statistički značajnog pada serumske koncentracije vitamina B12 (kobalamina) i holotranskobalamina (HoloTC).
2. Pri primeni metformina u terapiji dijabetes melitus-a tip 2 značajan porast koncentracije homocisteina je u korelaciji sa padom koncentracija ukupnog vitamina B12 i holotranskobalamina.
3. Dužina primene terapije metformina statistički značajno utiče na pad serumske koncentracije ukupnog vitamina B12 i holotranskobalamina.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. UZORAK

U istraživanje je uključeno 50 ispitanika, oba pola, sa dijagnozom dijabetes melitus tip 2 postavljenom na osnovu klasičnih laboratorijskih i kliničkih kriterijuma a u trenutku uvođenja leka metformina u terapiju (metformin naivni).

U cilju eliminacije mogućeg nepovoljnog uticaja pridruženih stanja na status vitamina B12, istraživanjem su obuhvaćeni isključivo: nepušači; ispitanici s vrednošću indeksa telesne mase (ITM) u rasponu od 19.5-35.0 kg/m² (normalno uhranjeni, predgojazni i prvi stepen gojaznosti); kao i ispitanici koji su imali uravnoteženu ishranu sa sadržanim namirnicama životinskog porekla.

U istraživanje nisu uključivani ispitanici s postavljenom dijagnozom dijabetes melitus tip 1 i gestacionog dijabetesa. Kriterijum za isključivanje iz istraživanja su bila prethodno dijagnostikovana oboljenja koja kompromituju apsorpciju vitamina B12 i/ili utiču na njegov nivo u krvi, poput: hroničnog atrofičnog gastritisa, hronične inflamatorne bolesti creva, hroničnog alkoholizma kao i dijarealnog sindroma. Takođe, nisu uključivani ispitanici kod kojih je verifikovana: megaloblastna anemija i primarna hipofunkcija štitaste žlezde (hipotireoza) kao i ispitanici koji uzimaju komercijalne multivitaminske preparate kalcijuma, vitamina B12 i/ili folne kiseline, inhibitore protonske pumpe, antagoniste H₂ receptora kao i antibiotike.

3.2. DIZAJN ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je dizajnirano kao prospektivna studija praćenja trenda kretanja koncentracija ukupnog vitamina B12, holotranskobalamina, folne kiseline i homocisteina u krvi kod ispitanika s tipom 2 dijabetes melitusa, od momenta uvođenja metforminske terapije u toku narednih godinu dana. Studija je sprovedena u periodu od januara 2015. godine do decembra 2017. godine, u skladu sa pravilima Helsinške deklaracije, odobrena od strane Etičkog komiteta Kliničkog Centra Vojvodine kao i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu.

Svakom ispitaniku je pre samog uključivanja u ispitivanje detaljno objašnjen cilj istraživanja, proces dijagnostičke obrade i njegovo učešće u njemu. Saglasnost za učešće u studiji bolesnici su potvrdili svojeručnim potpisom nakon pročitaneog teksta za informisanje pacijenta.

Tokom trajanja studije, ispitanici su imali četiri pregleda: prilikom uključivanja u istraživanje (uvođenje metformina u terapiju), potom posle četiri, osam i dvanaest meseci od početka istraživanja.

Svi ispitanici (50) koji su započeli istraživanje su ga i završili, u predviđenom vremenskom intervalu od godinu dana.

3.3. METODOLOGIJA ISTRAŽIVANJA

Na početku istraživanja izvršen je uvid u raniju medicinsku dokumentaciju, a od ispitanika su uzimani anamnestički podaci: sadašnja bolest (dijabetes melitus tip 2) s osvrtom na trajanje kao i eventualno postojanje neke dosadašnje komplikacije, iste. Takođe, uzimani su podaci o ranijim i pridruženim bolestima kao i drugim farmakološkim sredstvima koje ispitanik uzima.

Fizikalnim pregledom je procenjivano opšte stanje ispitanika. Tom prilikom, svim ispitanicima su izvršena osnovna antropometrijska merenja i određivana:

- telesna visina (TV);
- telesna masa (TM);
- obim struka (OS);
- obim kukova (OK).

Telesna visina merena je antropometrom po Martinu, u stojećem stavu sastavljenih peta i odmaknutih prstiju, ruku opuštenih uz telo. Dobijene vrednosti izražene su u centimetrima (cm). Za merenje telesne mase korišćena je medicinska decimalna vaga, a vrednosti su izražene u kilogramima (kg). Merenje obima struka vršeno je fleksibilnom mernom trakom u stojećem stavu, na središnjoj liniji između najniže tačke rebarnog luka i prednje gornje bedrene bodlje karlične kosti. Abdominalna gojaznost definisana je prema NCEP ATP III preporukama, (OS > 102 cm muškarci, OS > 88 cm žene) [97]. Merenje obima kukova vršeno je fleksibilnom mernom trakom u stojećem stavu, u nivou postojećeg najšireg obima.

Na osnovu izmerenih antropometrijskih parametara, svim ispitanicima je izračunat:

- index telesne mase (ITM);

- odnos struk-kuk (weist to hip ratio-WHR);
- odnos struk-visina (weist to stature ratio-WSR).

Iz dobijenih vrednosti izmerenih antropometrijskih parametara izračunavan je ITM kao odnos telesne mase i kvadrata telesne visine izražene u metrima: **ITM (kg/m²) = TM (kg) / TV (m²).**

Stepen uhranjenosti definisan je prema preporukama Svetske zdravstvene organizacije (SZO) na normalnu uhranjenost (ITM 18.5-24.9), prekomernu uhranjenost (ITM 25.0-29.9) i gojaznost (ITM \geq 30.0) [98]. Odnos obima struka i visine izračunat je prema formuli $WHR = OS \text{ (cm)} / TV \text{ (cm)}$, a abdominalna gojaznost je definisana vrednostima $WHR > 0,5$ [99]. Odnos struk- kuk je računat kao odnos vrednosti izmerenih obima struka i kukova po formuli: **WSR=OS(cm)/TV(cm).**

U svrhu procene jačine glomerulske filtracije, svim ispitanicima je izračunavana vrednost iste primenom prediktivne jednačine MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) koja se izračunava na osnovu vrednosti kreatinina u krvi, broja godina života kao i polne pripadnosti.

MDRD jednačina (S_{cr} – serumski kreatinin izražen u $\mu\text{mol/L}$):

$$GFR \text{ (ml/min/1.73 m}^2\text{)} = 32.788 * (S_{cr})^{-1.154} * (\text{godine})^{-0.203} * (0.742 \text{ ako je žena})$$

Vrednosti krvnog pritiska merene su sfingomanometrom, metodom po Riva Rocciju, dva puta nakon petominutnog mirovanja. Dobijene vrednosti izražene su u milimetrima živinog stuba (mmHg).

U toku studije izvršena su četiri pregleda (P) i to:

P1: uključivanje bolesnika u ispitivanje i uvođenje metformina u terapiju tip 2 dijabetes melitusa;

P2: pregled nakon četiri meseca od početka primene metformina u terapiju tip 2 dijabetes melitusa;

P3: pregled nakon osam meseci od početka primene metformina u terapiju tip 2 dijabetes melitusa;

P4: pregled nakon dvanaest meseci od početka primene metformina u terapiju tip 2 dijabetes melitusa.

U sva četiri pregleda izvođene su standardne laboratorijske analize na osnovu kojih je procenjavano stanje glikoregulacije kao i nivoi ukupnog vitamina B12, B12-aktiva (holotranskobalamina), folne kiseline i homocisteina u krvi.

3.3.1. Laboratorijske analize

Nakon adekvatne pripreme u vidu dvanaestočasovnog prekonoćnog gladovanja, u jutarnjim časovima (između 7-7.30 h), svim ispitanicima je prilikom svakog od četiri pregleda, izvršeno uzimanje uzoraka venske krvi iz kubitalne vene. Krv je uzorkovana u bazalnim uslovima, nakon polučasovnog mirovanja. Uzorkovanje je vršeno u četiri plastične vakuum epruvete. Jedan uzorak je sakupljan u vakuum epruvetu sa antikoagulansom K2EDTA, drugi u epruvetu sa 0,11M tri-Na-citratom kao antikoagulansom u finalnoj koncentraciji 1:10, a treći u vakuum epruvetu sa Li-heparinom. Četvrti uzorak krvi uzorkovan je u vakuum epruvetu bez antikoagulansa sa serum separator gelom i aktivatorom koagulacije. Serum je

izdvajan iz epruvete bez antikoagulansa nakon postupka centrifugiranja na 1000g (2500rpm) u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Svi uzorci su analizirani u roku od 3h od momenta uzorkovanja. Sve laboratorijski parametri su određivani u Centru za laboratorijsku medicinu, Kliničkog centra Vojvodine.

U cilju laboratorijske analize parametara inflamacije svim ispitanicima su urađene sledeće laboratorijske analize:

1. Kompletna krvna slika (KKS) sa diferencijalnom krvnom slikom određivana je na aparatu Cell Dyn Sapphire (Abbott), metodom protočne citometrije uz korišćenje komercijalnih setova istog proizvođača.
2. Visoko senzitivni C reaktivni protein (hsCRP), je meren lateks pojačanom imunoturbidimetrijskom metodom na automatskom biohemijskom analizatoru ADVIA® 1800 Chemistry, SiemensHealthcare Diagnostics, Nemačka, komercijalnim setovima istog proizvođača. Analitička senzitivnost testa iznosi 0.16 mg/L. Referentni interval je 0-5.0 mg/L.
3. Određivanje koncentracije fibrinogena u citratnoj plazmi je vršeno koagulacionom metodom po Klausu (Clauss), na koagulometru SIEMENS BCSxp, Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Nemačka, uz korišćenje Multifibren*U komercijalnog seta istog proizvođača. Referentni opseg je 1.86-4.86 g/L.

U cilju laboratorijske analize parametara glikoregulacije svim ispitanicima su urađene sledeće laboratorijske analize:

1. Glukoza u plazmi je određivana standardnom enzim-specifičnom GOD-PAP metodom na biohemijskom analizatoru u Abbott Architect c 8000. Preporučeni

- referentni interval iznosi: 3.9-6.1 mmol/L.
2. Glicirani hemoglobin A1c (HbA1c) je određivan dvostepenim imunološkim testom zakvantitativno određivanje koncentracije HbA1c u uzorcima pune krvi hemiluminescentnom metodom sa mikropartikulama (*chemiluminescent microparticle immunoassay - CMIA*) sa fleksibilnim protokolima testa (Chemiflex) na automatizovanom analizatoru ARCHITECT ci4100, Abbott Laboratories, USA, komercijalnim setovima istog proizvođača. Referentne vrednosti za HbA1c prema Međunarodnoj federaciji za kliničku hemiju (International Federation of Clinical Chemistry – IFCC) su 20-42 mmol/mol. Prema ADA kriterijumu, vrednost HbA1c \geq 48 mmol/mol (\geq 6.5 %) predstavlja vrednost na osnovu koje se postavlja dijagnoza dijabetes melitusa (6).
 3. Imunoreaktivni insulin u plazmi je određivan metodom direktne Chemiluminescentne tehnologije (CLIA) na automatizovanom sistemu Advia Centaur XP. Referentni opseg za vrednosti insulina u bazalnim uslovima je: 3.0-25.0 mIU/L.
 4. Na osnovu izmerenih koncentracija glukoze i insulina u bazalnim uslovima, izračunati su indeksi za procenu insulinske rezistencije (HOMA-IR), insulinske senzitivnosti (HOMA-S) kao i indeksa za procenu sekretorne sposobnosti β ćelija pankreasa (HOMA-B). Navedeni indeksi se izračunavaju pomoću HOMA2 kalkulatora preuzetog sa zvaničnog sajta Oksfordskog Univerziteta, Oksfordskog centra za dijabetes, endokrinologiju i metabolizam [100]. Insulinska rezistencija je definisana kao vrednost indeksa insulinske rezistencije, HOMA-IR 2.0 [101].

U cilju laboratorijske analize parametara metabolizma lipida svim ispitanicima su urađene laboratorijske analize za procenu lipidnog i lipoproteinskog statusa:

1. Ukupni holesterol određivan je u serumu standardnim enzimskim postupkom uz enzim holesterolesterazu, a trigliceridi standardnim enzimskim postupkom uz enzim lipazu. Preporučeni interval referentnih vrednosti za ukupni holesterol je: 2.60-5.20 mmol/L. Vrednosti ukupnog holesterola između 5.20 i 6.19 mmol/L se smatraju granično, rizično povišenim, dok su vrednosti više od 6.20 mmol/L visoko rizično povišene. Preporučeni referentni opseg za trigliceride iznosi: 0.10-1.70 mmol/L. Vrednosti triglicerida u rasponu od 1.70 do 2.29 mmol/L se smatraju granično rizično povišenim, a vrednosti iznad 2.30 mmol/L visoko rizično povišenim.

Određivanje holesterola u HDL frakciji vršeno je u serumu direktnom enzimskom metodom za kvantitativno određivanje HDL holesterola. Preporučeni referentni opseg za HDL holesterol iznosi: 1.60-3.88 mmol/L. Vrednosti HDL u rasponu 1.00-1.60 mmol/L se smatra granično sniženim, dok se vrednosti ≤ 1.00 mmol/L definišu kao hipo-HDL holesterolemija. Vrednosti LDL holesterola (Friedewald i saradnici), kao i indeks ateroskleroze (LDL holesterol / HDL holesterol) i aterogeni odnos (ukupni holesterol / HDL holesterol) dobijeni su računskim putem. Vrednosti LDL holesterola < 3.40 mmol/L se definišu kao poželjne vrednosti. LDL u rasponu između 3.40 i 4.09 mmol/L su granično rizično povišene, dok su vrednosti ≥ 4.10 mmol/L visoko rizično povišene. Indeks ateroskleroze manji ili jednak vrednosti 3.00 se smatra poželjnom vrednošću, dok su vrednosti više ili jednake od 3.50 visoko rizično povišen. Aterogeni odnos ukupni holesterol / HDL holesterol niži od 4.50 pripada kategoriji poželjnih vrednosti. Vrednost navedenog indeksa ≥ 5.00 se definiše kao visoko

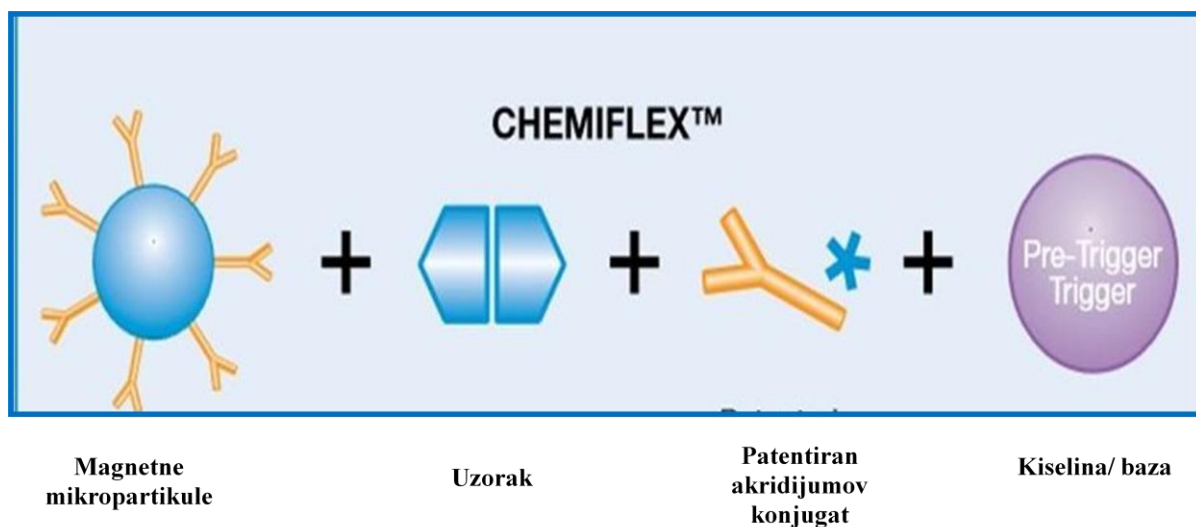
rizično proaterogeno povišen. Izgled seruma je procenjivan Frižiderskim testom, stajanjem seruma na +4°C 24 časa. Parametri lipidskog statusa su određivani na automatizovanom biohemijском analizatoru uz korišćenje reagenasa firme Abbott Architect ci 4100.

2. Serumske koncentracije apolipoproteina A-I i B, određivane su imunoturbidimetrijski na aparatu Abbott Architect ci 4100, korićenjem komercijalnih testova iste firme. Preporučene referentne vrednosti za ApoA-I su: 1.20-2.23 g/L, dok za ApoB: 0.5-1.0 g/L
3. Na osnovu izmerenih vrednosti antropometrijskih i laboratorijskih parametara (trigliceridi, HDL holesterol, insulin i glukoza našte), svim ispitanicima su izračunavani su odgovarajući indeksi:
 - a). LBM (lean body mass - bezmasni udeo) je procenjivan merenjem visine (TV), telesne mase (TM) i računanjem Berovom jednačinom koja je specifična za pol: muškarci: $LBM: 0.407 \times TM(kg) + 26.7 \times TV(m) - 19.2$; žene: $LBM: 0.252 \times TM(kg) + 47.3 \times TV(m) - 48.3$ [102].
 - b). Procentualni udeo masti je približno određivan izrazom $1 - [LBM/težina(kg)]$ [103].
 - c). Indeks visceralne adipoznosti – VAI, je izračunavan pomoću formula specifičnih za pol: Muškarci $[(obim\ struka\ (OS))/(39.68 + (1.88 \times ITM))] \times (TG/1.03) \times (1.31/HDL)$; žene: $[OS/36.58 + (1.89 \times ITM)] \times (TG/0.81) \times (1.52/HDL)$ [103].
 - d). LAP (Lipid accumulation product) indeks je izračunavan po formuli specifičnoj za pol: muškarci: $(OS-65) \times (TG)$; žene: $(OS-58) \times (TG)$ [104].
 - e). Mc Auley indeks: $EXP(2.63-0.28 \times \ln(\text{insulinemija našte})-0.31 \times \ln(TG))$ [105].

U cilju laboratorijske analize parametara metabolizma vitamina B12 svim ispitanicima su urađene sledeće laboratorijske analize:

Ukupni vitamin B12, B12-aktiv (holotranskobalamin-HoloTC) i folna kiselina u serumu određivani su hemiluminescentnom tehnikom (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay-CMIA) na automatizovanom aparatu Abbott Architect ci 4100 korišćenjem komercijalnih testova istog proizvođača (shema 7).

Shema 7: Princip Chemiluminiscentne (CMIA) tehnologije



Ukupni vitamin B12 predstavlja dvostepeni hemiluminiscentni test za kvantitativno određivanje vitamina B12 u humanom serumu ili plazmi, s automatizovanim postupkom pretretmana uzoraka.

U prvom koraku, uzorak seruma ili plazme se kombinuje s odgovarajućim rastvorima za pretretman (Pre-tretman reagens 1, 2 i 3). U sledećem koraku, pretretirani uzorak i diluent interaguju s unutrašnjim činiocem koji oblažu paramagnetne čestice. Nakon postupka ispiranja, u drugom koraku se dodaje akridijumom obeleženi vitamin B-12 konjugat. Sledi drugo ispiranje, nakon čega se dodaju prereaktivirajući (pre-trigger) i aktivirajući rastvor

(trigger). Nastala hemiluminiscentna reakcija se meri relativnim svetlosnim jedinicama (RLUs). Koncentracija ukupnog vitamina B12 je obrnuto proporcionalna vrednosti RLU, detektovana optičkim sistemom analizatora Architect *i*. Opseg linearnosti testa je od 111 do 1476 pmol/L. Preporučeni referentni interval od strane proizvođača je od 138.0-652.0 pmol/L. Hemolizirani uzorci seruma ili plazme se smatraju neprihvatljivim, za rezultat daju signifikantnu, negativnu interferenciju (lažno snižene vrednosti ukupnog vitamina B12).

Architect Activ-B12 je dvostepeni hemiluminiscentni imunotest za kvantitativno određivanje holotranskobalamina u humanom serumu, primenom hemiluminiscentne tehnologije (CMIA) s fleksibilnim protokolimatesta (Chemiflex) (shema 7). U prvom koraku, dolazi do reakcije između holotranskobalamina u uzorku i anti-holotranskobalaminska antitela koja oblažu paramagnetne mikročestice. Nakon postupka ispiranja, u drugom koraku se dodaje akridijumom obeleženi anti-transkobalamin konjugat. Sledi drugo ispiranje, nakon čega se dodaju prerekativirajući (pre-trigger) i aktivirajući rastvor (trigger). Nastala hemiluminiscentna reakcija se meri relativnim svetlosnim jedinicama (RLUs). Koncentracija holotranskobalamina u serumu je direktno proporcionalna vrednosti RLU detektovana optičkim sistemom analizatora Architect *i*. Opseg linearnosti testa je: 5.0-128.0 pmol/L, a granica senzitivnosti iznosi 5 nmol/L. Preporučeni referentni interval od strane proizvođača za HoloTC je od 25.1 do 165.0 pmol/L.

Architect folatni test predstavlja dvostepeni imunotest za kvantitativno određivanje koncentracije folata u humanom serumu, plazmi i/ili eritrocitima primenom hemiluminiscentne tehnologije (CMIA) s fleksibilnim protokolimatesta (Chemiflex) (shema 7). Metoda podrazumeva dva zasebna pre-tretmana koja imaju za cilj odvajanje folata od endogenog, vezujućeg proteina. U prvom koraku reakcije, folati iz uzorka krvi reaguju s folat-vezujućim proteinima koji oblažu paramagnetne čestice. Nakon inkubacionog perioda,

sledi korak ispiranja. Zatim se dodaje akridijumom obeležen pteroidnom kiselinom konjugat koji se vezuje za preostala, slobodna mesta na paramagnetnim česticama. Sledi drugo ispiranje, nakon čega se dodaju prerekativirajući (pre-trigger) i aktivirajući rastvor (trigger). Nastala hemiluminiscentna reakcija se meri relativnim svetlosnim jedinicama (RLUs). Koncentracija folata u serumu i/ili plazmi je obrnuto proporcionalna vrednosti RLU, detektovana optičkim sistemom analizatora Architect *i*. Donji detekcioni limit za test iznosi 3.6 nmol/L. Preporučeni opseg referentnih vrednosti, od strane proizvođača, iznosi: 7.0-46.4 nmol/L.

Architect Homocistein test je jednostepeni imunotest za kvantitativno određivanje ukunog L-homocisteina u uzorcima humane plazme i/ili seruma primenom hemiluminiscentne tehnike (*Chemiluminescent Microparticle Immunoassay-CMIA*) na automatizovanom aparatu Abbott Architect ci 4100 korišćenjem komercijalnih testova istog proizvođača. Vezani ili dimerizovani homocistein se, u prvom koraku, redukuje u slobodni, a zatim, dejstvom enzima S-adenozil homocistein hidrolaze, prelazi u s-adenozil homocistein (SAH). SAH se takmiči s akridijumom obeleženim s-adenozil cisteinom za vezujuća mesta na monoklonskim antitelima. Nakon koraka ispiranja i separacije paramagnetnih partikula, dodaju prerekativirajući (pre-trigger) i aktivirajući rastvor (trigger). Nastala hemiluminiscentna reakcija se meri relativnim svetlosnim jedinicama (RLUs). Koncentracija ukupnog homocisteina u plazmi i/ili serumu je obrnuto proporcionalna vrednosti RLU, detektovana optičkim sistemom analizatora Architect *i*. Donja granica detekcije (prag senzitivnosti) za navedenu metodu iznosi 1 $\mu\text{mol/L}$. Preporučena referentna vrednost za navedenu analizu iznosi: 5.1-15.4 $\mu\text{mol/L}$.

U cilju laboratorijske procene funkcije oboljenja jetre i bubrega, određivane su serumske koncentracije aspartat-aminotransferaze (AST, ref.opseg: 5-37 U/L), alanin-aminotransferaze (ALT, ref.opseg: 5-48 U/L), gama glutamil-transferaze (γ GT, ref.opseg: 1-38 U/L), ureje (ref. opseg: 2.5-7.5 mmol/L), kreatinina (ref.opseg: 44-98 μ mol/L) i mokraćne kiseline (ref.opseg: 154-357 μ mol/L) na automatizovanom, biohemijskom analizatoru Abbott Architect c8000, uz korišćenje komercijalnih setova istog proizvođača. Svim ispitanicima određivane su vrednosti: ukupnog kalcijuma i anorganskog fosfora i tom prilikom mereni fotometrijskom metodom na automatizovanom sistemu Abbott Architect c 8000, dok je jonizovani kalcijum određivan metodom jon senzitivne elektrode na aparatu Ilyte. Preporučene referentne vrednosti za ukupni kalcijum iznose: 2.10-2.60 mmol/L; za anorganski fosfor: 0.74-1.52 mmol/L, dok za jonizovani kalcijum od 1.00-1.3 mmol/L.

3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA I PREZENTACIJA REZULTATA

Nakon sprovedenog ispitivanja izvršena je sistematizacija i kategorizacija podataka i formirana odgovarajuća baza podataka u programu Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA).

Analiza prikupljenih podataka je sprovedena odgovarajućim parametarskim i neparametarskim statističkim metodama u zavisnosti od tipa varijabli. Za ispitivanje pretpostavke o normalnoj raspodeli varijabli upotrebljen je D'Agostino-Pearson test. Prikupljeni podaci su prikazani na standardni deskriptivni način: apsolutni i relativni brojevi za opisne varijable, srednje vrednosti sa standardnom devijacijom za numeričke varijable sa normalnom raspodelom (D'Agostino-Pearsonov test), odnosno sa medijanom i 25% i 75% percentilima za ostale.

Za ispitivanje statistički značajnih razlika između 4 nivoa merenja primenjene su multivarijantna i univarijantna analiza varijanse za ponovljena merenja (MANOVA i ANOVA). Uticaj vremena merenja je i testiran Vilkosovim pokazateljem lamda (λ). Veličina uticaja vremena merenja je koeficijentom Partial Eta Squared ($\text{partial}\eta^2$), čija vrednost može biti od 0 do 1. Rezultati su interpretirani prema Cohenom kriterijumu za utvrđivanje veličine uticaja (0.01 mali uticaj, 0.06 umeren uticaji a 0.14 veliki uticaj).

Za ispitivanje postojanja linearne veze između varijabli upotrebljeni su Pirsonov i Sprirmanov koeficijent korelacije. Pirsonov koeficijent korelacije je primenjen na varijable koje imaju normalnu raspodelu, dok je Spirmanov koeficijent primenjen za ispitivanje veze između kategorijalnih varijabli. Vrednosti oba koeficijenta mogu da se kreću u intervalu od -1 do 1. Gruba klasifikacija apsolutnih vrednosti koeficijenta korelacije je: od 0 do 0.1 ne

postoji korelaciona veza, od 0.1 do 0.3 korelaciona veza slabe jačine, od 0.3 do 0.6 korelaciona veze srednje jačine, od 0.6 do 1.0 jaka pozitivna veza.

Za ispitivanje zavisnosti između dve kategorijalne varijable korišćen je Hi kvadrat test nezavisnosti. Hi-kvadrat test upotrebljen je za utvrđivanje razlika u frekvencijama odgovora ukrštanjem kategorijalnih varijabli.

Pod panel podacima podrazumevaju se podaci koji za određene varijable sadrže i vremensku i prostornu komponentu. Odnosno, panel podaci su ponovljena merenja subjekata kroz vreme i na taj način objašnjavaju ponašanje različitih subjekata u više vremenskih perioda. U okviru ove studije, ispitivalo se ponašanje 50 različitih subjekata u 4 vremenska perioda. Panel podaci koji uključuju mali broj vremenskih perioda i veći broj subjekata, kao što je ovde slučaj nazivaju se: kratki panel podaci.

Primena klasičnih regresionih podataka na panel podacima nije adekvatna. U cilju modeliranja na panel podacima razvijeni su posebni modeli. Opšti oblik regresionog modela na panel podacima dat je jednačinom:

$$y_{it} = \alpha_{it} + x'_{it}\beta_{it} + u_{it}, \quad i = 1, \dots, N, t = 1, \dots, T,$$

gde je y_{it} zavisna varijabla, x'_{it} vektor nezavisnih varijabli, u_{it} greška stohastičke prirode, N ukupan broj ispitanika, a T ukupan broj vremenskih perioda koji se posmatraju. U opštem obliku i odsečak α_{it} i nagib β_{it} regresije zavise i od ispitanika i od vremenskih perioda. Takav model nije moguće oceniti, pa se uvode pretpostavke na zavisnost parametara od i i t, i greška. Ukoliko se odsečak član menja u zavisnosti od subjekata ali ostaje konstantan u vremenu, modeli su sa efektima specifičnim po subjektima (individual-specific effects model):

$$y_{it} = \alpha_i + x'_{it}\beta + \varepsilon_{it},$$

gde su ε_{it} nezavisne i jednako raspodeljene varijable. U zavisnosti od korelacije varijabli α_i i varijabli x'_{it} razlikuju se dva panel modela: model sa fiksnim i model sa slučajnim efektima. Ukoliko su varijable nezavisne, tada se model naziva model sa slučajnim efektima što je primenjivano u ovoj studiji (potvrđeno Hausmanovim testom).

Sva testiranja sprovedena su na nivou statističke značajnosti 0.05.

Rezultati su prikazani tekstualno, tabelarno i grafički. Za obradu teksta korišćen je Microsoft Word verzija 2010 (Microsoft Corp., Redmond, WA).

Kompletna statistička analiza je urađena primenom IBM SPSS 20 Statistics i MedCalc 12.1.4.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) statističkim softverom, dok za grafički prikaz je korišten Exel (Microsoft Corp., Redmond, WA).

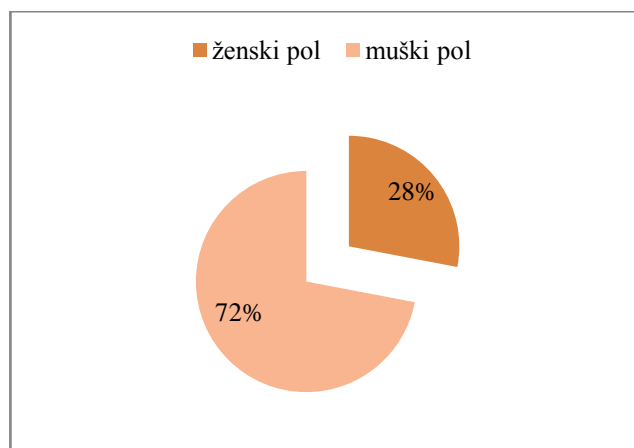
4. REZULTATI

4.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA

U istraživanje je uključeno 50 ispitanika s postavljenom dijagnozom tipa 2 dijabetes melitusa u momentu uvođenja metforminske terapije. Ispitivani su biohemijski pokazatelji metabolizma glikoze (glikoza, HbA1c, insulin), parametri kompletne krvne slike (crvena krvna loza), parametri lipidnog statusa kao i parametri statusa vitamina B12 (ukupni vitamin B12, B12-aktiv, homocistein) i folna kiselina, neposredno pre uvođenja terapije kao i vrednosti i dinamika promena navedenih parametara u toku terapije metforminom. Vrednosti analiziranih parametara određivane su u jednakim vremenskim intervalima, četiri, osam i dvanaest meseci nakon uvođenja metforminske terapije.

Ispitivana grupa je obuhvatila 36 (72 %) ispitanika muškog i 14 (28 %) ženskog pola (grafikon 1).

Grafikon 1: Učestalost ispitanika u studiji prema polnoj distribuciji



Prosečna starost u ispitivanoj grupi je iznosila 54.50 ± 8.58 godina. Medijana je iznosila 55.00 godina (IQR 25.-75. percentil: 52.00-60.00 godina) (tabela 5) .

Svi ispitanici su u momentu postavljanja dijagnoze tipa 2 dijabetes melitusa započeli monoterapiju za navedeno oboljenje, s dnevnom dozom 2 x 1000 mg metforminskog preparata (metformin), ujutro i uveče uz obrok.

U trenutku započinjanja istraživanja ispitanici su uzimali medikamente za određena pridružena oboljenja: beta-blokatore (9/50); aspirin 100 mg (10/50); inhibitore angiotenzin konvertujućeg enzima (17/50); kao i diuretike (6/50). Samo je jedan ispitanik imao postavljenu dijagnozu benigne hiperplazije prostate zbog koje je bio na terapiji preparatom prostamol uno (1/50). Ni jedan ispitanik nije bio na terapiji oralnim hipolipemicima.

Svi ispitanici uključeni u studiju su bili nepušači i nisu konzumirali alkohol. Najveći broj ispitanika je bio umereno fizički aktivan, njih 84 % (42/50). Svi ispitanici su imali uravnoteženu ishranu, koja je podrazumevala približno podjednaku zastupljenost namirnica biljnog i životinskog porekla (pre svega, životinsko meso). Svi ispitanici su unosili mleko i mlečne proizvode u količini manjoj od 0.5 litara na dan.

4.2. ANTROPOMETRIJSKI PARAMETRI I VREDNOSTI ARTERIJSKOG KRVNOG PRITISKA

U tabeli 5 su prikazani rezultati deskriptivne statistike antropometrijskih parametara i vrednosti arterijskog krvnog pritiska. Varijable s normalnom distribucijom su prikazane kao srednja vrednost (X) \pm standardna devijacija (SD), dok su varijable koje su statistički značajno odstupale od normalne distribucije, prikazane kao medijana i interkvartilni opseg (IQR), 25.-75. percentila. P vrednost predstavlja statističku značajnost između posmatranih varijabli u prvom i četvrtom vemenskom periodu (P1 i P4).

U toku jednogodišnjeg ispitivanja, nije utvrđena statistički značajna redukcija u telesnoj težini ($p=1.000$), procentu masne mase ($p=0.988$) (tabela 5). Konstatovani su statistički značajni padovi u vrednosti obima struka i kukova, kao i izračunatih vrednosti indeksa ITM-a ($p=0.005$) i WSR ($p=0.001$) (tabela 5).

Takođe, utvrđen je i statistički značajan pad u vrednostima sistolnog ($p=0.003$) kao i dijastolnog pritiska ($p=0.001$) nakon godinu dana ispitivanja (tabela 5).

Tabela 5: Antropometrijski parametri i vrednosti arterijskog krvnog pritiska (N=50) u P1, P2, P3 i P4

Parametar	P1	P2	P3	P4	P
	X±SD				
TV (cm)	173.62±10.18	-	-	-	
TM (kg)	94.69±20.67	92.60±21.17	92.96±20.84	91.30±19.49	1.000
OS (cm)	110.22±14.47	108.83±14.33	108.40±14.43	107.33±13.71	0.001
OK (cm)	111.34±11.03	110.50±10.46	109.46±10.87	108.51±10.68	0.004
ITM(kg/m ²)	31.19±5.26	30.48±5.56	30.65±5.62	30.11±5.27	0.005
WHR	0.99±0.08	0.98±0.07	0.99±0.07	0.99±0.07	1.000
WSR	0.64±0.08	0.63±0.07	0.62±0.08	0.62±0.07	0.001
LBM	63.78±12.83	62.68±12.42	62.69±12.17	62.08±11.68	0.025
Fat%	0.319±0.07	0.310±0.07	0.314±0.07	0.315±0.07	0.988
Medijana i IQR					p
TA-S	130.0	130.0	130.0	125.0	
(mm Hg)	(120.0-140.0)	(120.0-130.0)	(122.5-130.0)	(120.0-130.0)	0.003
TA-D	82.5	81.0	80.0	80.0	
(mm Hg)	(80.0-90.0)	(80.0-85.0)	(80.0-85.0)	(80.0-85.0)	0.001

Legenda: TV- telesna visina, izražena u cm; TM - telesna masa izražena u kg; OK - obim kukova izražen u cm; ITM - indeks telesne mase izražen u kg/m²; WHR - Odnos struk kuk; WSR - odnos struk visina; LBM - mršava mišićna masa; Fat% - procenat masti; TA-S sistolni krvni pritisak izražen u mm Hg; TA-D - dijastolni krvni pritisak izražen u mmHg

Jednostrukom analizom varijanse ponovljenih merenja upoređene su vrednosti sledećih obeležja antropometrijskih pokazatelja u sva četiri vremenska trenutka.

Ne postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina telesne mase (TM) u četiri vremenska trenutka ispitivanja ($F(1,49) = 0.463$, $p = 0.499$, $\eta^2=0.009$) (tabela 6). Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0.864 uz verovatnoću 0.074 što govori da se grupne srednje

vrednosti ne razlikuju, odnosno da ne postoji uticaj vremena. Veličina razlike odnosno uticaja Partial eta squared pokazatelja iznosi 0.136.

Tabela 6: Značajnost razlika u vrednostima TM tokom četiri pregleda (N=50)

Vreme		Razlika srednjih vrednosti	p
P1	P2	0.127	1.000
	P3	-0.231	1.000
	P4	1.433	1.000
P2	P3	-0.358	1.000
	P4	1.306	1.000
P3	P4	1.664	0.070

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina;* označava statističku značajnost

Ne postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina odnosa WHR u četiri vremenska trenutka ispitivanja ($F(1,49) = 0.387$, $p = 0.573$, $\eta^2=0.008$) (tabela 7). Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0.957 uz verovatnoću 0.558 te se grupne srednje vrednosti ne razlikuju odnosno da ne postoji uticaj vremena. Partial eta squared pokazatelj iznosi 0.043.

Tabela 7: Značajnost razlika u vrednostima WHR tokom četiri pregleda (N=50)

Vreme		Razlika srednjih vrednosti	p
P1	P2	0.006	1.000
	P3	0.001	1.000
	P4	0.001	1.000
P2	P3	-0.005	1.000
	P4	-0.005	1.000
P3	P4	0.000	1.000

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina;* označava statističku značajnost

Postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina mršave mišićne mase (LMB) u četiri vremenska trenutka ispitivanja ($F(1,49) = 5.666$, $p = 0.021$, $\eta^2=0.104$) (tabela 8). Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0.805 uz verovatnoću 0.016 te se grupne srednje vrednosti razlikuju i postoji uticaj vremena. Partial eta squared pokazatelj iznosi 0.195.

Tabela 8: Značajnost razlika u vrednostima LBM tokom četiri pregleda (N=50)

Vreme		Razlika srednjih vrednosti	p
P1	P2	1.102	0.186
	P3	1.090	0.237
	P4	1.700*	0.025
P2	P3	-0.011	1.000
	P4	0.598	0.542
P3	P4	0.609	0.093

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina; * označava statističku značajnost

Ne postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina FAT % u četiri vremenska trenutka ($F(1,49) = 0.511$, $p = 0.478$, $\eta^2=0.010$) (tabela 9). Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0.896 uz verovatnoću 0.158 što govori da se grupne srednje vrednosti ne razlikuju i da ne postoji uticaj vremena. Partial eta squared pokazatelj iznosi 0.104.

Tabela 9: Značajnost razlika u vrednostima FAT % tokom četiri pregleda (N=50)

Vreme	Razlika srednjih vrednosti	p
P1	P2	0.005
	P3	0.006
	P4	0.007
P2	P3	0.001
	P4	0.003
P3	P4	0.002

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina;* označava statističku značajnost

4.3. PARAMETRI KOMPLETNE KRVNE SLIKE

U tabeli 10 su prikazani rezultati parametara kompletne krvne slike. Varijable s normalnom distribucijom su prikazane kao srednja vrednost (X) \pm standardna devijacija (SD), dok su varijable koje su statistički značajno odstupale od normalne distribucije, prikazane kao medijana i interkvartilni opseg (IQR), 25.-75. percentila. P vrednost predstavlja statističku značajnost.

Tabela 10: Parametri kompletne krvne slike (N=50) u P1, P2, P3 i P4

Parametar	P1	P2	P3	P4	p
	X \pm SD				
WBC	7.60 \pm 2.13	7.41 \pm 1.84	7.33 \pm 1.92	7.39 \pm 1.49	0.316
Lym	2.69 \pm 0.73	2.56 \pm 0.59	2.59 \pm 0.66	2.59 \pm 0.60	0.171
Mo	0.49 \pm 0.15	0.48 \pm 0.15	0.52 \pm 0.26	0.50 \pm 0.15	0.836
RBC	4.85 \pm 0.39	4.88 \pm 0.39	4.83 \pm 0.37	4.81 \pm 0.37	1.000
Hgb (g/l)	151.76 \pm 11.64	151.84 \pm 11.86	151.10 \pm 11.38	149.86 \pm 11.62	0.257
Hct	0.44 \pm 0.04	0.40 \pm 0.03	0.44 \pm 0.03	0.44 \pm 0.03	0.492
PLT	246.68 \pm 82.39	239.02 \pm 52.45	246.28 \pm 66.65	247.36 \pm 64.83	0.892
	Medijana i IQR				p
Ne	3.65 (3.14-5.00)	3.76 (3.36-5.08)	3.85 (3.01-4.97)	3.85 (3.23-4.75)	0.604
Eos	0.16 (0.13-0.25)	0.18 (0.14-0.25)	0.20 (0.14-0.28)	0.19 (0.10-0.24)	0.877
Baso	0.04 (0.03-0.05)	0.04 (0.03-0.06)	0.04 (0.03-0.05)	0.03 (0.02-0.04)	0.278
MCV (fl)	90.1 (88.0-93.8)	90.0 (88.0-92.0)	90.0 (87.0-93.0)	90.0 (88.0-92.0)	1.000
MCH (pg)	31.1(30.3-32.2)	31.0 (30.1-31.7)	31.0 (30.0-32.3)	30.9 (30.2-31.5)	1.000
MCHC(g/l)	344.5(339-350)	343.5 (338-350)	347.0 (339-349)	345.7 (339-349)	1.000

Legenda: WBC- broj leukocita; Ne - broj neutrofila; Lym - broj limfocita; Eos - broj eozinofila; Baso - broj bazofila; RBC- broj eritrocita; Hgb - koncentracija hemoglobina; Hct- hematokrit; MCV - srednji volumen eritrocita; MCH- srednja količina hemoglobina po eritrocitu; MCHC - srednja koncentracija hemoglobina po; PLT- broj trombocita;

Tokom ispitivanja nisu utvrđene statistički značajne promene u vrednostima parametara crvene krvne loze (RBC, Hct, Hgb, MCV, MCH i MCHC) (tabela 10).

Takođe, nisu utvrđene statistički značajne promene u vrednostima ostalih, posmatranih parametara kompletne krvne slike (WBC, Lym, Mo, Ne, Eos, Baso i PLT) (tabela 10).

Jednostrukom analizom varijanse ponovljenih merenja upoređene su vrednosti sledećih pokazatelja kompletne krvne slike u sva četiri vremenska trenutka.

Ne postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina broja eritrocita (RBC) u četiri vremenska trenutka ispitivanja ($F(1,49) = 1.118$, $p = 0.296$, $\eta^2=0.022$) (tabela 11). Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0.918 uz verovatnoću 0.254 što govori da se grupne srednje vrednosti ne razlikuju odnosno da ne postoji uticaj vremena. Veličina razlike odnosno uticaja Partial eta squared pokazatelja iznosi 0.082.

Tabela 11: Značajnost razlika RBC tokom sva četiri pregleda (N=50)

Vreme		Razlika srednjih vrednosti	p
P1	P2	-0.027	1.000
	P3	0.023	1.000
	P4	0.039	1.000
P2	P3	0.050	0.989
	P4	0.065	0.328
P3	P4	0.015	1.000

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina; * označava statističku značajnost

Ne postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina koncentracija hemoglobina (Hgb) u četiri vremenska trenutka ispitivanja ($F(1,49) = 1.744$, $p = 0.193$, $\eta^2=0.034$) (tabela 12). Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0.864 uz verovatnoću 0.047

ukazujući da se grupne srednje vrednosti razlikuju i postoji uticaj vremena. Partial eta squared pokazatelj iznosi 0.154.

Tabela 12: Značajnost razlika Hgb-a tokom sva četiri pregleda (N=50)

Vreme		Razlika srednjih vrednosti	p
P1	P2	-0.080	1.000
	P3	0.660	1.000
	P4	1.900	0.257
P2	P3	0.740	1.000
	P4	1.980	0.130
P3	P4	1.240	0.874

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina;* označava statističku značajnost

Ne postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina hematokrita (Hct) u četiri vremenska trenutka ispitivanja ($F(1,49) = 2.076$, $p = 0.156$, $\eta^2=0.041$) (tabela 13). Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0.896 uz verovatnoću 0.157 što govori da se grupne srednje vrednosti ne razlikuju i da ne postoji uticaj vremena. Partial eta squared pokazatelj iznosi 0.104.

Tabela 13: Značajnost razlika Hct-a tokom sva četiri pregleda (N=50)

Vreme		Razlika srednjih vrednosti	p
P1	P2	0.003	1.000
	P3	0.008	0.668
	P4	0.009	0.492
P2	P3	0.004	0.931
	P4	0.005	0.353
P3	P4	0.001	1.000

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina;* označava statističku značajnost

Ne postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina MCH u četiri vremenska trenutka ($F(1,49) = 1.936$ $p = 0.170$, $\eta^2=0.038$) (tabela 14). Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0.918 uz verovatnoću 0.253 što govori da se grupne srednje vrednosti ne razlikuju odnosno da ne postoji uticaj vremena. Partial eta squared pokazatelj iznosi 0.082.

Tabela 14: Značajnost razlika MCH tokom sva četiri pregleda (N=50)

Vreme		Razlika srednjih vrednosti	p
P1	P2	0.178	0.697
	P3	-0.018	1.000
	P4	0.168	1.000
P2	P3	-0.196	0.359
	P4	-0.010	1.000
P3	P4	0.186	0.580

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina;* označava statističku značajnost

Ne postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina MCHC u četiri vremenska trenutka ($F(1,49) = 1.161$ $p = 0.287$, $\eta^2=0.023$) (tabela 15). Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0.927 uz verovatnoću 0.306 te se grupne srednje vrednosti ne razlikuju odnosno i ne postoji uticaj vremena. Partial eta squared pokazatelj iznosi 0.073.

Tabela 15: Značajnost razlika MCHC tokom sva četiri pregleda (N=50)

Vreme		Razlika srednjih vrednosti	p
P1	P2	0.530	1.000
	P3	-1.606	1.000
	P4	0.260	1.000
P2	P3	-2.136	0.428
	P4	-0.270	1.000
P3	P4	1.866	0.979

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina;* označava statističku značajnost

Ne postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina MCV u četiri vremenska trenutka ($F(1,49) = 1.161$ $p = 0.287$, $\eta^2=0.023$) (tabela 16). Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0.972 uz verovatnoću 0.717 što govori da se grupne srednje vrednosti ne razlikuju odnosno da ne postoji uticaj vremena. Veličina razlike odnosno uticaja Partial eta squared pokazatelj iznosi 0.028.

Tabela 16: Značajnost razlika vrednosti MCV-a tokom sva četiri pregleda (N=50)

Vreme		Razlika srednjih vrednosti	p
P1	P2	-0.650	1.000
	P3	-0.506	1.000
	P4	0.534	1.000
P2	P3	0.144	1.000
	P4	1.184	1.000
P3	P4	1.040	1.000

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina;* označava statističku značajnost

4.4. BIOHEMIJSKI PARAMETRI

U tabeli 17 su prikazani rezultati deskriptivne statistike određivanih biohemijskih parametara. Varijable s normalnom distribucijom su prikazane kao srednja vrednost (X) \pm standardna devijacija (SD), dok su varijable koje su statistički značajno odstupale od normalne distribucije, prikazane kao medijana i interkvartilni opseg (IQR), 25.-75. Percentila (tabela 17). P vrednost predstavlja statističku značajnost.

U toku godinu dana ispitivanja, nisu utvrđene statistički značajne promene u vrednostima uree ($p=0.857$), kreatinina ($p=0.941$) i mokraćne kiseline ($p=0.414$) (tabela 17). Takođe, nije utvrđena statistički značajna promena u izračunatoj vrednosti MDRD jednačine, kojom je procenjena vrednost jačine glomerulske filtracije kod svih ispitanika (tabela 17).

U toku ispitivanja nisu utvrđene statistički značajne promene u vrednostima koncentracija jonizovanog ($p=0.125$), ukupnog kalcijuma ($p=0.14$) i anorganskog fosfora ($p=0.696$) (tabela 17). Tokom jednogodišnjeg ispitivanja registrovan je pad vrednosti CRP-a (P1: medijana i IQR= 3.60 (1.9-5.9) mg/L vs P4: medijana i IQR=2.9 (1.5-5.1) mg/L), ali bez statističke značajnosti ($p=0.137$) (tabela 17). U cilju globalne procene jetrene funkcije, svim ispitanicima su određivani jetreni enzimi: AST, ALT i γ GT. Tokom godinu dana ispitivanja, registrovana je redukcija vrednosti navedena tri enzima, ali bez statističke značajnosti (tabela 17).

Tabela 17: Biohemijski parametri u P1, P2, P3 i P4

Parametar	P1	P2	P3	P4	p
X±SD					
Ca-ukupni	2.44±0.09	2.45±0.10	2.44±0.09	2.42±0.09	0.140
Ca-jonski	1.08±0.08	1.09±0.07	1.10±0.08	1.10±0.09	0.125
Urea	5.53±1.33	5.60±1.35	5.52±1.28	5.58±1.60	0.857
Kreatinin	80.76±15.50	80.50±17.69	81.52±15.43	80.52±17.34	0.941
MDRD	89.07±23.93	86.65±21.92	87.70±22.15	90.27±25.99	0.612
Ac.uricum	329.62±85.00	336.44±86.33	327.90±81.79	322.76±82.90	0.414
Fibrinogen	3.37±0.86	3.48±0.84	3.44±0.84	3.39±0.79	0.909
Medijana i IQR					
Fosfor	1.07 (0.97-1.22)	1.09 (0.95-1.20)	1.12 (0.95-1.20)	1.07 (0.93-1.19)	0.696
AST	22.5 (17.0-28.0)	23.0 (17.0-30.0)	21.0 (17.0-28.0)	21.0 (18.0-25.0)	0.128
ALT	31.0 (22.0-44.0)	30.0 (20.0-38.0)	29.0 (19.0-37.0)	28.5 (19.0-35.0)	0.062
Γ-GT	39.0 (27.0-67.0)	34.0 (24.0-55.0)	33.0 (24.0-53.0)	31.0 (23.0-50.0)	0.282
hs-CRP	3.60 (1.9-5.9)	2.4 (1.4-6.2)	2.6 (1.4-5.3)	2.9 (1.5-5.1)	0.137

Legenda: Ac.uricum – mokraćnakiselina; AST – aspartat-aminotransferaza; ALT - alanin-aminotransferaza;

γGT - gama glutamil transferaza; hsCRP - visoko-senzitivni c-reaktivni protein; MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) - prediktivna jednačina za procenu jačine glomerulske filtracije

4.5. BIOHEMIJSKI PARAMETRI GLIKOREGULACIJE

Tabela 18 prikazuje vrednosti biohemijskih parametara glikoregulacije, tokom sva četiri pregleda u okviru jednogodišnje opservacije. Svi ispitivani parametri glikoregulacije su imali statistički značajno izmenjene vrednosti, izuzev HOMA-B, čije se vrednosti nisu statistički signifikantno menjale ($p=1.000$).

Nakon prva četiri meseca (P1-P2) zabeležen je pad koncentracija glukoze u krvi (vrednosti medijana i IQR: 8.40 (7.00-10.50 mmol/L) vs 7.40 (6.80-9.20 mmol/L)). U trećoj tački posmatranja (P3) utvrđen je blagi porast vrednosti glikemije. Konačno, nakon dvanaest meseci od momenta započinjanja metforminske terapije registrovan je pad nivoa glukoze u krvi (vrednosti medijana i IQR: 7.30 (6.80-8.50 mmol/L)) (tabela 18, grafikon 2) .

U odnosu na bazalne koncentracije insulina (medijana i IQR: 14.6 (10.1-19.8 mIU/L)), utvrđen je porast posle četiri meseca primene metforminske terapije (medijana i IQR: 15.35 (10.1-21.9 mIU/L)). Nakon toga registrovan je kontinuirani pad nivoa insulinemije, posle osam (P3) i dvanaest meseci (P4) primene metformina (tabela 18, grafikon 3).

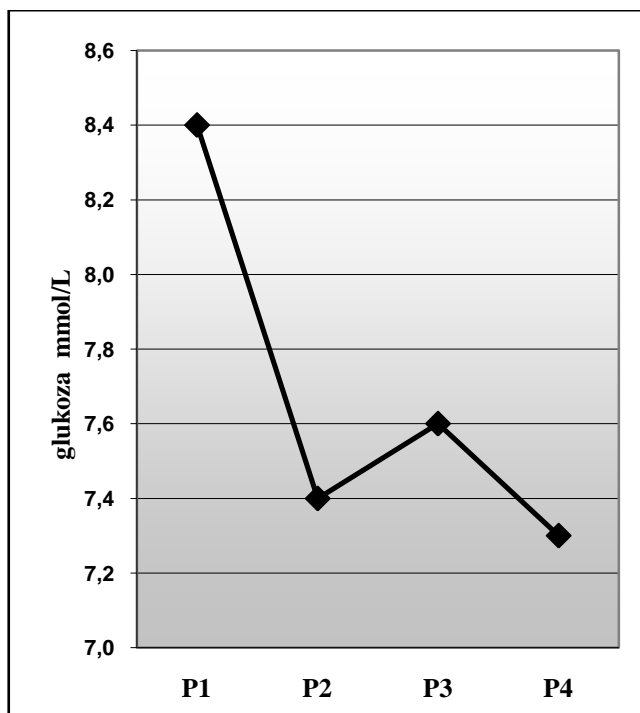
U odnosu na bazalne koncentracije HbA1c su imale tendenciju kontinuiranog pada, tokom osam meseci primene metformina (medijana i IQR: 42.40 (39.20-50.21mmol/mol) (tabela 18, grafikon 4). U periodu između osam i dvanaest meseci ispitivanja registrovan je diskretan porast vrednosti HbA1c, ali bez statističke značajnosti ($p=1.000$) (tabela 20, grafikon 4).

Tabela 18: Biohemijski parametri glikoregulacije (N=50) u P1, P2, P3 i P4

Parametar	P1	P2	P3	P4	p
	X±SD				
HOMA-B	68.47±34.06	79.48±34.73	76.54±34.39	68.83±26.36	1.000
	Medijana i IQR				
Glu (mmol/L)	8.40 (7.0-10.5)	7.40 (6.8-9.2)	7.60 (6.8-9.0)	7.30 (6.8-8.5)	0.000
Ins (mIU/L)	14.6 (10.4-19.8)	15.35 (10.1-21.9)	14.05(10.2-20.9)	10.95 (7.7-15.2)	0.000
HOMA-IR	2.52 (1.73-3.44)	2.56 (1.69-3.50)	2.20 (1.75-3.50)	1.74 (1.21-2.55)	0.000
HOMA-S	39.65 (29.10-57.90)	39.10 (28.6-59.0)	45.40 (28.6-57.2)	54.80 (38.2-76.5)	0.000
HbA1c (mmol/mol)	49.94 (42.82-66.96)	43.98 (40.12-54.43)	42.41 (39.2-50.21)	43.27 (39.43-53.57)	0.000

Legenda: Glu-glikemija bazalno u mmol/L; Ins - insulin bazalno u mIU/L; HOMA-IR - Homeostasis model assessment indeks za procenu insulinske rezistencije; HOMA-S- Homeostasis model assessment indeks za procenu insulinske senzitivnosti; HOMA-B- Homeostasis model assessment indeks za procenu sekretornih sposobnosti β ćelija; HbA1c- glicirani hemoglobin A1c izražen u mmol/mol.

Grafikon 2: Trend kretanja vrednosti glikemije (Glu) tokom godinu dana



Postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina glikemija (Glu) u toku četiri pregleda (P1, P2, P3 i P4) ($F(1,49)=12.298$, $p=0.001$, $\eta^2=0.201$) (tabela 19). Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0.696 uz verovatnoću 0.001 što govori da se grupne srednje vrednosti razlikuju, odnosno da postoji uticaj vremena. Veličina razlike, odnosno uticaja Partial eta squared pokazatelja iznosi 0.304.

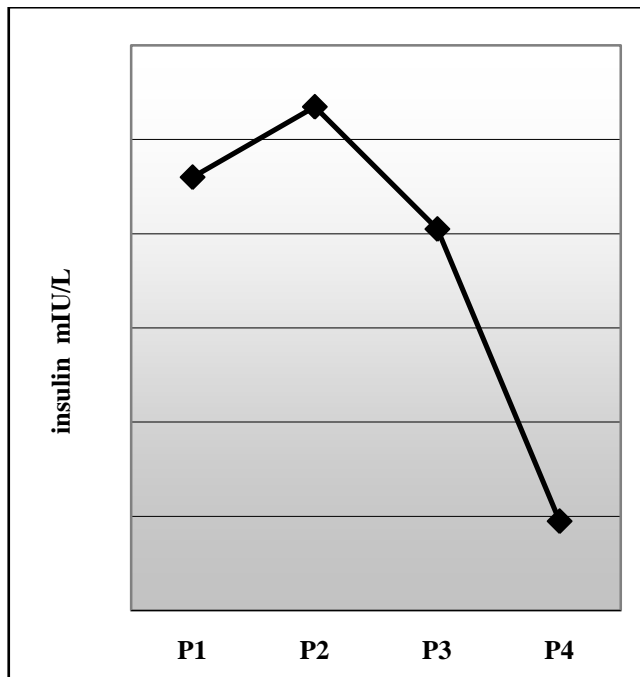
U toku ispitivanja, utvrđen je visoko statistički značajan pad koncentracija glukoze nakon prva četiri (P2), osam (P3) kao i dvanaest (P4) meseci terapije metforminom, u odnosu na vrednosti, pre započete terapije (P1). Nisu utvrđene značajne razlike između vrednosti glikemija u P2 i P3, kao ni P3 i P4 (tabela 19).

Tabela 19: Značajnost razlika vrednosti glikemija tokom sva četiri pregleda (N=50)

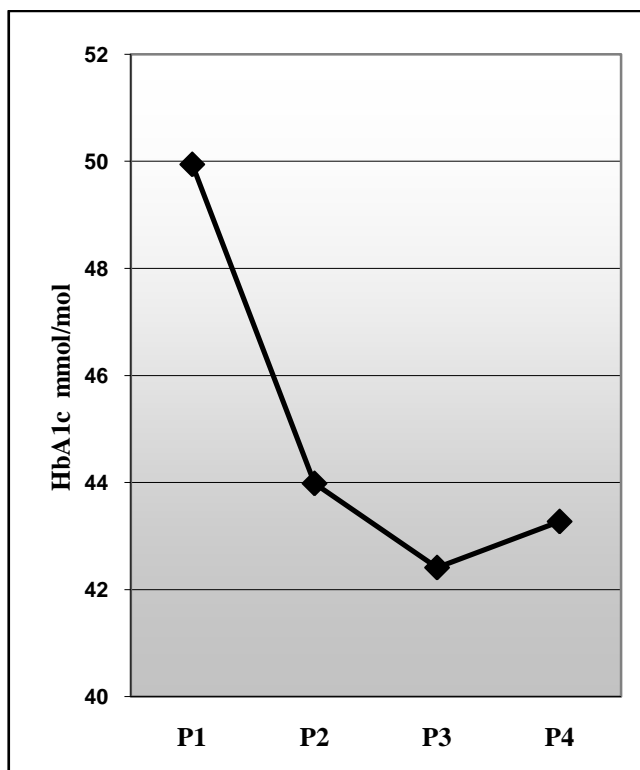
Vreme	Razlika srednjih vrednosti	p	
P1	P2	0.916*	0.005
	P3	1.090*	0.001
	P4	1.302*	0.000
P2	P3	0.174	1.000
	P4	0.386	0.621
P3	P4	0.212	0.657

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina; * označava statističku značajnost

Grafikon 3: Trend kretanja vrednosti insulina (Ins) tokom godinu dana



Grafikon 4: Trend kretanja vrednosti HbA1c tokom godinu dana



Postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina gliciranog hemoglobina a1c (HbA1c) u četiri vremenska trenutka ispitivanja ($F(1,49)=16.839$, $p=0.000$, $\eta^2=0.256$) (tabela 20). Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0.681 uz verovatnoću 0.000 što govori da se grupne srednje vrednosti značajno razlikuju i da postoji uticaj vremena. Partial eta squared pokazatelj iznosi 0.381.

U toku ispitivanja, utvrđen je statistički značajan pad nivoa HbA1c nakon četiri (P2), osam (P3) i dvanaest meseci (P4) terapije metforminom u odnosu na vrednosti, pre započete terapije (P1) (tabela 20).

Tabela 20: Značajnost razlika koncentracija HbA1c-a tokom sva četiri pregleda (N=50)

Vreme		Razlika srednjih vrednosti	p
P1	P2	9.457*	0.001
	P3	11.176*	0.000
	P4	10.655*	0.000
P2	P3	1.718	0.366
	P4	1.197	1.000
P3	P4	-0.521	1.000

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina; * označava statističku značajnost

U toku ispitivanja, utvrđen je statistički značajan pad izračunate vrednosti HOMA-IR kao i porast HOMA-S, nakon dvanaest meseci od momenta započete terapije metforminom (tabele 21 i 22). Takođe, izračunata HOMA-B za procenu sekretorne sposobnosti β ćelija se značajno menjala u toku osam meseci ispitivanja, s tim što je najznačajniji pad registrovan unutar prva četiri meseca (P1-P2) (Tabela 23).

Postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina HOMA-IR u četiri vremenska trenutka ispitivanja ($F(1,49) = 10.812$, $p = 0.002$, $\eta^2=0.181$) (tabela 21).

Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0.616 uz verovatnoću 0.000 ukazujući na činjenicu da se grupne srednje vrednosti HOMA-IR značajno razlikuju odnosno da postoji uticaj vremena. Veličina razlike, odnosno uticaja je prikazan kroz Partial eta squared pokazatelj i iznosi 0.384.

Tabela 21 : Značajnost razlika HOMA-IR tokom sva četiri pregleda (N=50)

Vreme		Razlika srednjih vrednosti	p
P1	P2	0.086	1.000
	P3	0.279	0.478
	P4	0.800*	0.000
P2	P3	0.193	1.000
	P4	0.714*	0.000
P3	P4	-0.522*	0.000

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina;* označava statističku značajnost

Postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina HOMA-S u četiri vremenska trenutka ispitivanja ($F(1,49) = 11.797$, $p = 0.001$, $\eta^2=0.194$) (tabela 22). Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0.662 uz verovatnoću 0.000 što govori da se grupne srednje vrednosti razlikuju odnosno da postoji uticaj vremena. Partial eta squared pokazatelj je 0.338.

Tabela 22 :Značajnost razlika HOMA-S tokom sva četiri pregleda (N=50)

Vreme		Razlika srednjih vrednosti	p
P1	P2	-0.947	1.000
	P3	-5.098	0.331
	P4	-15.506*	0.000
P2	P3	-4.151	0.631
	P4	-14.559*	0.000
P3	P4	10.408*	0.001

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina;* označava statističku značajnost

Postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina HOMA-B u sva četiri vremenska trenutka i spitivanja ($F(1,49) = 4.425$, $p = 0.041$, $\eta^2=0.083$) (tabela 23). Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0.782 uz verovatnoću 0.009 što govori da se grupne srednje vrednosti razlikuju odnosno da postoji uticaj vremena. Veličina razlike odnosno uticaja Partial eta squared pokazatelja iznosi 0.218. Navedena ukupna značajna razlika u vrednostima HOMA-B indeksa jeste nastala kao posledica značajnog porasta u prva četiri meseca ispitivanja (P1:68.47±34.06 vs P4:79.48±34.73; $p=0.025$).

Tabela 23: Značajnost razlika HOMA-B tokom sva četiri pregleda (N=50)

Vreme		Razlika srednjih vrednosti	p
P1	P2	-11.008*	0.025
	P3	-8.070	0.220
	P4	-0.360	1.000
P2	P3	2.938	1.000
	P4	10.648	0.081
P3	P4	-7.710	0.100

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina;* označava statističku značajnost

4.6. BIOHEMIJSKI PARAMETRI METABOLIZMA LIPIDA (lipidni, lipoproteinski status i lipidni indeksi za procenu insulinske rezistencije)

U tabeli 24 su prikazani rezultati biohemijskih pokazatelja metabolizma lipida u toku sva četiri ispitivanja. Varijable s normalnom distribucijom su prikazane kao srednja vrednost (\bar{X}) \pm standardna devijacija (SD), dok su varijable koje su statistički značajno odstupale od normalne distribucije, prikazane kao medijana i interkvartilni opseg (IQR), 25.-75. percentila. P vrednost predstavlja statističku značajnost između prvog i četvrtog vremenskog trenutka (P1 i P4).

U toku jednogodišnjeg ispitivanja, utvrđen je pad vrednosti ukupnog ($p=0.232$) i LDL holesterola ($p=1.000$), ali bez statističke značajnosti (tabela 24).

Utvrđena je statistički značajna redukcija u vrednostima triglicerida ($p=0.040$), kao i izračunatih indeksa LAP ($p=0.028$), VAI ($p=0.002$), McAuley ($p=0.000$) (tabela 24).

Osim toga, utvrđen je i statistički značajan porast vrednosti HDL holesterola između prvog i četvrtog vremenskog trenutka određivanja ($p=0.006$), kao i između vrednosti izračunatih indeksa Hol/HDL ($p=0.000$) i LDL/HDL ($p=0.002$). S obzirom da su se, tokom jednogodišnjeg ispitivanja vrednosti ukupnog i LDL holesterola snizili, a vrednosti HDL signifikantno povećali, navedeni indeksi (koji predstavljaju njihov količnik) su statistički značajno redukovani.

Tabela 24: Biohemijski parametri metabolizma lipida (N=50) u P1, P2, P3 i P4

Parametar	P1	P2	P3	P4	p
LDL (mmol/L)	3.46±1.08	3.33±1.00	3.29±0.92	3.36±0.91	1.000
Hol/HDL	5.48±1.72	4.92±1.54	4.83±1.51	4.67±1.33	0.000
LDL/HDL	3.38±1.30	3.02±1.23	2.89±1.05	2.91±1.02	0.002
Apo A1	1.39±0.30	1.44±0.35	1.43±0.32	1.46±0.39	0.359
Apo B	1.19±0.26	1.16±0.27	1.14±0.27	1.15±0.25	0.348
McAuley	5.35±1.19	6.07±1.28	5.64±1.26	6.06±1.28	0.000
	Medijana i IQR				p
Hol (mmol/L)	5.60 (4.93-6.74)	5.31 (4.86-6.02)	5.37 (4.68-6.18)	5.43 (4.80-6.02)	0.232
Tg (mmol/L)	2.12 (1.44-2.78)	2.04 (1.26-2.50)	1.77 (1.19-2.85)	1.79 (1.30-2.42)	0.040
HDL (mmol/L)	1.09 (0.84-1.43)	1.11 (0.89-1.42)	1.15 (0.94-1.44)	1.10 (0.95-1.55)	0.006
LAP	94.08 (67.76-153.76)	82.51 (53.00-136.40)	75.60 (53.55-139.84)	72.12 (54.00-115.50)	0.028
VAI	3.39 (2.10-4.92)	3.37 (1.68-4.03)	2.72 (1.64-4.85)	2.56 (1.64-3.66)	0.002

Legenda: Hol- holesterol ukupni; Tg- trigliceridi; HDL – holesterol visoke gustine; LDL- holesterol male gustine; Hol/HDL – odnos holesterol i HDL, indeks ateroskleroze; LDL/HDL – odnos LDL holesterol i HDL holesterol, indeks ateroskleroze; LAP - indeks lipidne akumulacije (lipid accumulation index); VAI – indeks visceralne adipoznosti (visceral adiposity index); McAuley – indeks insulinske senzitivnosti.

Jednostrukom analizom varijanse ponovljenih merenja upoređene su vrednosti sledećih obeležja: parametara lipidnog statusa i lipidnih indeksa za procenu insulinske rezistencije tokom svačetiri vremenska trenutka.

Postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina HDL holesterola u četiri vremenska trenutka ispitivanja ($F(1,49) = 5.654$, $p = 0.021$, $\eta^2=0.103$) (tabela 25). Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0.797 uz verovatnoću 0.013 što govori da se grupne srednje vrednosti razlikuju odnosno da postoji uticaj vremena. Veličina razlike odnosno uticaja Partial eta squared pokazatelja iznosi 0.203. Navedena ukupna značajna razlika u vrednostima HDL holesterola jeste nastala kao posledica značajnog porasta nakon osam meseci od

momenta započinjanja ispitivanja (P1:medijana i IQR: 1.09 (0.84-1.43) mmol/L vs P3:1.15 (0.94-1.44) mmol/L).

Tabela 25:Značajnost razlika u vrednostima HDL-a tokom četiri pregleda (N=50)

Vreme		Razlika srednjih vrednosti	p
P1	P2	-0.056	0.567
	P3	-0.082	0.060
	P4	-0.123*	0.006
P2	P3	-0.026	1.000
	P4	-0.067	0.242
P3	P4	-0.041	0.487

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina;* označava statističku značajnost

Ne postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina LDL holesterola u četiri vremenska trenutka ispitivanja ($F(1,49) = 0.878$, $p = 0.353$, $\eta^2=0.018$) (tabela 26). Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0.957 uz verovatnoću 0.558 što govori da se grupne srednje vrednosti ne razlikuju odnosno da ne postoji uticaj vremena. Partial eta squared pokazatelj iznosi 0.043.

Tabela 26:Značajnost razlika u vrednostima LDL-a tokom četiri pregleda (N=50)

Vreme		Razlika srednjih vrednosti	p
P1	P2	0.133	1.000
	P3	0.166	0.879
	P4	0.102	1.000
P2	P3	0.033	1.000
	P4	-0.030	1.000
P3	P4	-0.063	1.000

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina;* označava statističku značajnost

Ne postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina triglicerida (Tg) u četiri vremenska trenutka ispitivanja ($F(1,49) = 2.877$, $p = 0.096$, $\eta^2=0.055$) (tabela 27). Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0.851 uz verovatnoću 0.053 te se grupne srednje vrednosti ne razlikuju i ne postoji uticaj vremena. Partial eta squared pokazatelj iznosi 0.149.

Tabela 27: Značajnost razlika u vrednostima Tg tokom četiri pregleda (N=50)

Vreme		Razlika srednjih vrednosti	p
P1	P2	0.314	0.384
	P3	0.237	0.961
	P4	0.388*	0.040
P2	P3	-0.077	1.000
	P4	0.074	1.000
P3	P4	0.151	1.000

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina;* označava statističku značajnost

Ne postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina indeksa lipidne akumulacije (LAP) u četiri vremenska trenutka ($F(1,49) = 3.578$, $p = 0.064$, $\eta^2=0.068$) (tabela 28). Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0.836 uz verovatnoću 0.056 te se grupne srednje vrednosti ne razlikuju i ne postoji uticaj vremena. Partial eta squared pokazatelj iznosi 0.104.

Tabela 28: Značajnost razlika u vrednostima LAP-a tokom četiri pregleda (N=50)

Vreme		Razlika srednjih vrednosti	p
P1	P2	15.047	0.536
	P3	13.237	0.661
	P4	23.557*	0.028
P2	P3	-1.810	1.000
	P4	8.510	0.902
P3	P4	10.321	0.546

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina;* označava statističku značajnost

Postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina indeksa visceralne adipoznosti (VAI) u četiri vremenska trenutka ispitivanja ($F(1,49) = 6.995$, $p = 0.011$, $\eta^2=0.125$) (tabela 29). Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0.743 uz verovatnoću 0.003 što govori da se grupne srednje vrednosti razlikuju odnosno da postoji uticaj vremena. Veličina razlike odnosno uticaja Partial eta squared pokazatelja iznosi 0.257.

Tabela 29: Značajnost razlika u vrednostima VAI tokom četiri pregleda (N=50)

Vreme		Razlika srednjih vrednosti	p
P1	P2	0.788	0.064
	P3	0.638	0.186
	P4	1.093*	0.002
P2	P3	-0.150	1.000
	P4	0.305	0.446
P3	P4	0.455	0.174

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina;* označava statističku značajnost

Postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina McAuley indeksa u sva četiri vremenska trenutka ispitivanja ($F(1,49)=9.514$, $p=0.003$, $\eta^2=0.163$) (tabela 30). Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0.582 uz verovatnoću 0.000 što govori da se grupne srednje vrednosti razlikuju odnosno da postoji uticaj vremena. Veličina razlike odnosno uticaja Partial eta squared pokazatelja iznosi 0.418.

Tabela 30: Značajnost razlika McAuley indeksa tokom sva četiri pregleda (N=50)

Vreme	Razlika srednjih vrednosti	p	
P1	P2	-0.167	1.000
	P3	-0.288	0.500
	P4	-0.713*	0.000
P2	P3	-0.121	1.000
	P4	-0.546*	0.001
P3	P4	0.425*	0.013

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina;* označava statističku značajnost

4.7. BIOHEMIJSKI PARAMETRI METABOLIZMA VITAMINA B12, HOMOCISTEIN I FOLNA KISELINA

U tabeli 31 su prikazani rezultati biohemijskih pokazatelja metabolizma kobalamina: vitamina B12, B12 aktiva; homocistein; kao i folna kiselina. Varijable s normalnom distribucijom su prikazane kao srednja vrednost (X) \pm standardna devijacija (SD), dok su varijable koje su statistički značajno odstupale od normalne distribucije, prikazane kao medijana i interkvartilni opseg (IQR), 25.-75. percentila. P vrednost predstavlja statističku značajnost između posmatranih varijabli na početku i nakon godinu dana ispitivanja (P1 i P4).

U toku godinu dana ispitivanja utvrđen je statistički značajan pad vrednosti ukupnog vitamina B12 kao i B12 aktiva (Holo TC) (tabela 31). Takođe, utvrđen je statistički značajan porast vrednosti homocisteina ($p=0.000$) (tabela 31).

Nakon godinu dana ispitivanja detektovana je redukcija u vrednosti folne kiseline, ali bez statističke značajnosti ($p=0.564$).

Tabela 31: Biohemijski parametri metabolizma vitamina B12 i folne kiseline (N=50) u P1, P2, P3 i P4

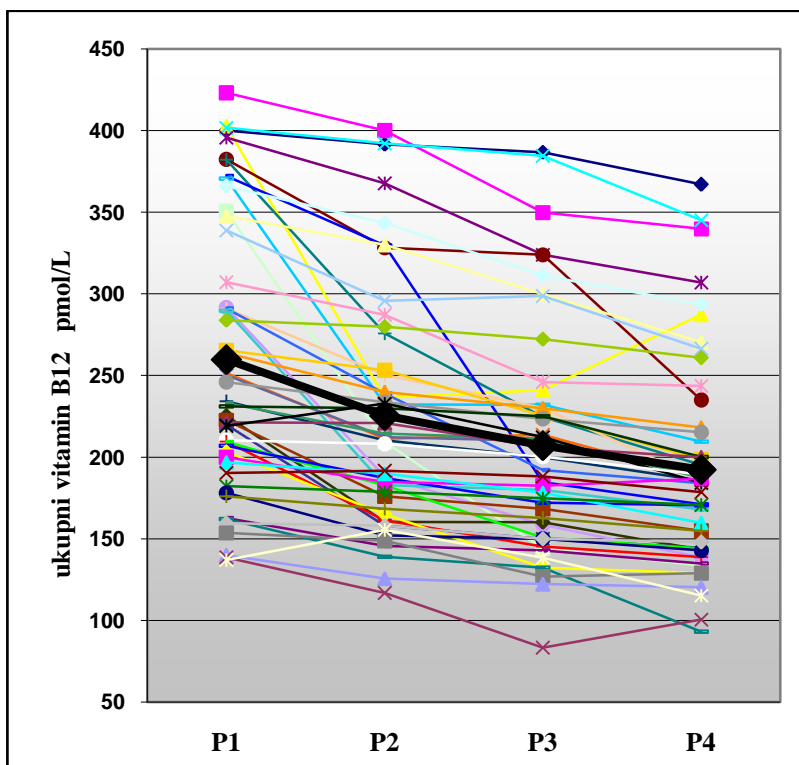
Parametar	P1	P2	P3	P4	p
	X±SD				
B12-ukupni (pmol/L)	266.3±104.3	225.5±73.0	207.1±68.9	192.4±63.6	0.000
B12-aktiv (pmol/l)	94.1±49.9	81.60±42.6	75.10±43.2	67.60±35.6	0.000
Folna kis. (nmol/L)	17.28±8.26	16.21±6.40	16.41±7.44	15.35±7.76	0.564
	Medijana i IQR				P
Hcy (μmol/L)	9.95 (8.80-12.30)	10.65 (9.00-13.10)	11.25 (8.90-13.50)	12.10 (10.00-14.00)	0.000

Legenda: B-12 - ukupni vitamin B12; B12-aktiv- holotranskobalamin; Hcy-ukupni homocistein u plazmi.

4.7.1. Trend promena koncentracija i značajnost razlika ispitivanih parametara metabolizma vitamina B12 i folne kiseline

Prosečna vrednost ukupnog vitamina B12 u momentu započinjanja ispitivanja je iznosila 266.30±104.3 pmol/L. Tokom naredna tri pregleda (nakon četiri, osam i dvanaest) meseci registruje se kontinuiran trend pada vrednosti ukupnog vitamina B12. Prosečna vrednost ukupnog vitamina B12 je, nakon godinu dana primene metformina iznosila 192.4±63.6 pmol/L (tabela 31). Na grafikonu 5 je prikazan trend kretanja vrednosti ukupnog vitamina B12 kod svih ispitanika. Crna linija prikazuje trend kretanja srednjih vrednosti ukupnog vitamina B12 tokom ispitivanja.

Grafikon 5: Trend kretanja koncentracija ukupnog vitamina B12 u toku ispitivanja kod svih 50 ispitanika



Legenda: Trend kretanja vrednosti ukupnog vitamina B12, crna linija označava trend kretanja srednjih vrednosti ukupnog vitamina B12

Kada je u pitanju ukupni B12, rezultati jednostruke analize varijanse ponovljenih merenja pokazuju da postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina ukupnog B12 u sva četiri vremenska trenutka ispitivanja ($F(1,49) = 45.979$, $p = 0.000$, $\eta^2 = .484$) (tabela 32). Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0,353 uz verovatnoću 0.000 što govori da se grupne srednje vrednosti razlikuju odnosno da postoji uticaj vremena. Veličina razlike odnosno uticaja Partial eta squared pokazatelja iznosi 0.647.

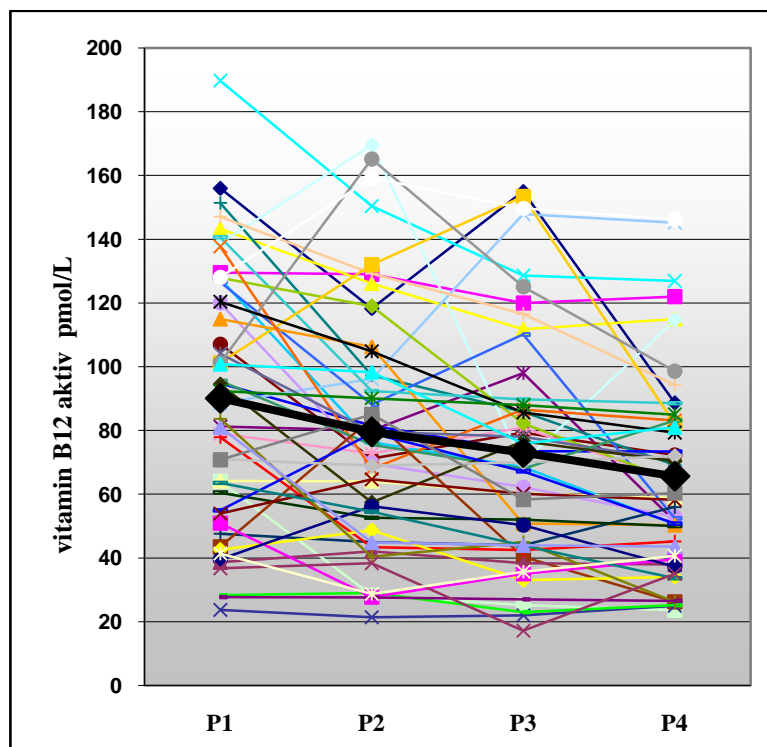
Tabela 32: Značajnost razlika ukupnog vitamina B12 u sva četiri pregleda (N=50)

Vreme		Razlika srednjih vrednosti	p
P1	P2	40.782*	0.000
	P3	59.170*	0.000
	P4	73.870*	0.000
P2	P3	18.388*	0.000
	P4	33.088*	0.000
P3	P4	14.700*	0.000

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina;* označava statističku značajnost

Prosečna vrednost B12 aktiv-a u momentu započinjanja ispitivanja (P1) je iznosila 94.10 ± 49.9 pmol/L. Tokom naredna tri pregleda (nakon četiri, osam i dvanaest meseci) prisutan je trend kontinuiranog pada vrednosti B12 aktiva. Ispitivanje je završeno s prosečnom vrednošću B12 aktiva od 67.60 ± 35.6 pmol/L (tabela 31). Na grafikonu 6 je prikazan trend kretanja vrednosti B12 aktiva (holotranskobalamina) tokom jednogodišnjeg ispitivanja kod svih pacijenata. Crna linija prikazuje trend kretanja srednjih vrednosti vitamin B12 aktiva tokom ispitivanja.

Grafikon 6: Trend kretanja koncentracija vitamina B12 aktiva u toku ispitivanja kod svih 50 ispitanika



Legenda: Trend kretanja vrednosti vitamina B12 aktiva, crna linija označava trend kretanja srednjih vrednosti vitamina B12 aktiva

Jednostruka analiza varijanse ponovljenih merenja B12 aktiva pokazuje da postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina B12 aktiva u četiri vremenska trenutka ispitivanja ($F(1,49) = 17.160$, $p = 0.000$, $\eta^2 = .259$). Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0.549 uz verovatnoću 0.000 što govori da se grupne srednje vrednosti razlikuju odnosno da postoji uticaj vremena. Veličina razlike odnosno uticaja je velika, partial eta squared pokazatelj iznosi 0.451.

U tabeli 33 su dati rezultati t testova uparenih uzoraka sa Bonferoni korekcijom. U slučaju B12 aktiva postoje statistički značajne razlike svih parova vremenskih tačaka osim: između drugog (P2) i trećeg (P3) vremenskog perioda i između trećeg (P3) i četvrtog (P4).

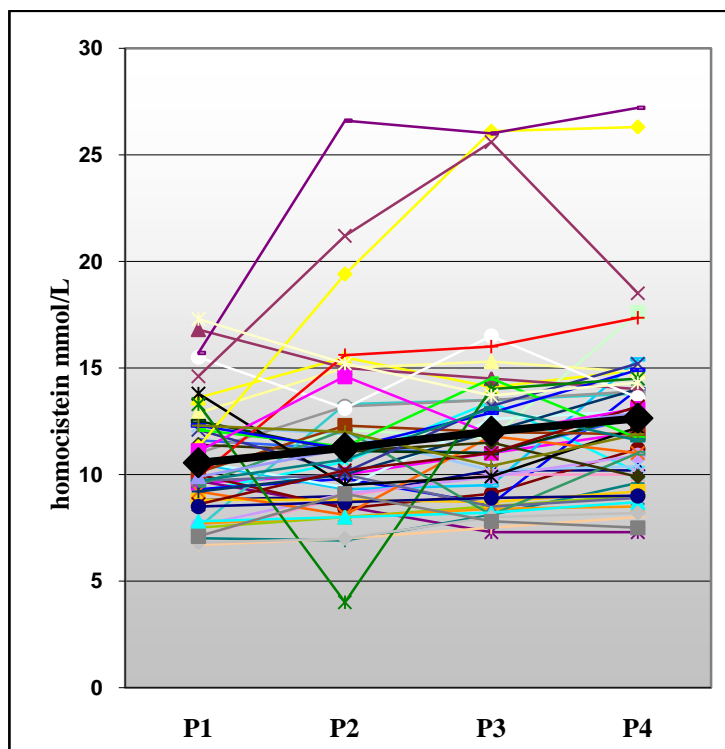
Tabela 33: Značajnost razlika ukupnog vitamina B12 aktiva u sva četiri pregleda (N=50)

Vreme		Razlika srednjih vrednosti	p
P1	P2	12.574*	0.035
	P3	19.084*	0.001
	P4	26.490*	0.000
P2	P3	6.510	0.309
	P4	13.916*	0.000
P3	P4	7.406	0.062

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina;* označava statističku značajnost

Tokom ispitivanja, utvrđen je kontinuirani porast vrednosti homocisteina tokom sva četiri pregleda (P1, P2, P3 i P4) (tabela 31). Na grafikonu 7 su prikazane trend linije kretanja vrednosti ukupnog homocisteina kod svih ispitanika. Crna linija pokazuje trend kretanja srednjih vrednosti homocisteina u toku godinu dana ispitivanja.

Grafikon 7: Trend kretanja koncentracija homocisteina u toku ispitivanja kod svih 50 ispitanika



Legenda: Trend kretanja vrednosti homocisteina, crna linija označava trend kretanja srednjih vrednosti homocisteina

Jednostruka analiza varijanse ponovljenih merenja homocisteina (Hcy) pokazuje da postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina Hcy u sva četiri vremenska trenutka ispitivanja ($F(1,49) = 11.285$, $p = 0.000$, $\eta^2 = 0.187$). Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0.672 uz verovatnoću 0.000 što govori da se grupne srednje vrednosti razlikuju, odnosno da postoji uticaj vremena. Veličina uticaja merena pomoću partial eta squared pokazatelja je velika i iznosi 0.328.

U tabeli 34 su dati rezultati t testova uparenih uzoraka sa Bonferoni korekcijom. U slučaju homocisteina, postoji statistički značajna razlika svih parova vremenskih tačaka osim između

prvog (P1) i drugog (P2) i drugog (P2) i trećeg (P3) vremenskog trenutka ispitivanja, odnosno registruje se statistički značajan porast homocisteina u periodu od osam do dvanaest meseci ispitivanja.

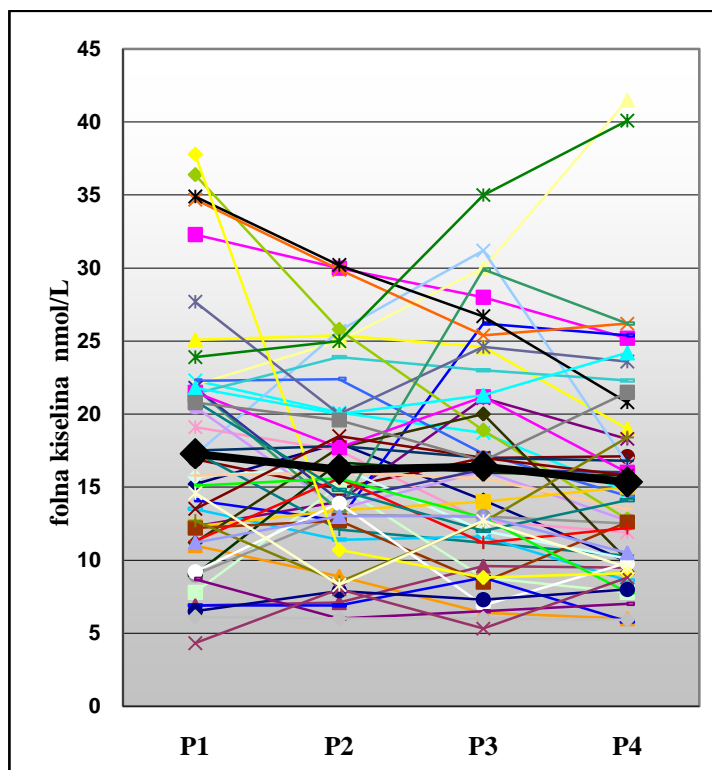
Tabela 34: Značajnost razlika ukupnog Hcy u sva četiri pregleda (N=50)

Vreme		Razlika srednjih vrednosti	p
P1	P2	-0.900	0.139
	P3	-1.276*	0.036
	P4	-2.090*	0.000
P2	P3	-0.376	1.000
	P4	-1.190*	0.001
P3	P4	-0.814*	0.017

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina; * označava statističku značajnost

Posle 4 meseca od početka ispitivanja registrovan je pad vrednosti folne kiseline. Nakon osam meseci (P3), koncentracije folne kiseline su bile više u odnosu na prethodni period (P2), ali niže u odnosu na vrednosti u trenutku započinjanja ispitivanja (P1). U poslednja četiri meseca ispitivanja registrovan je pad vrednosti folne kiseline (tabela 31) Na grafikonu 8 je prikazan trend kretanja izmerenih vrednosti folne kiseline kod svih ispitanika. Crna linija označava trend kretanja srednjih vrednosti folne kiseline tokom jednogodišnjeg ispitivanja.

Grafikon 8: Trend kretanja koncentracija folne kiseline u toku ispitivanja kod svih 50 ispitanika



Legenda: Trend kretanja vrednosti folne kiseline, crna linija označava trend kretanja srednjih vrednosti folne kiseline

Jedino obeležje gde ne postoje statistički značajne razlike između aritmetičkih sredina u četiri vremenska trenutka je folna kiselina ($F(1,49)=1.678$, $p=0.174$, $\eta^2=0.033$). Vilkosov pokazatelj lambda iznosi 0.901 uz verovatnoću 0.176 što govori da se grupne srednje vrednosti ne razlikuju odnosno da ne postoji statistički uticaj vremena. Ovaj rezultat je potvrdio i partial eta squared pokazatelj koji iznosi 0.099.

Rezultati t testova uparenih uzoraka sa Bonferoni korekcijom u slučaju folne kiseline ukazuju da ne postoje statistički značajne razlike ni kod jednog para vremenskih tačaka (tabela 35).

Tabela 35: Značajnost razlika koncentracija folne kiseline u sva četiri pregleda (N=50)

Vreme		Razlika srednjih vrednosti	p
P1	P2	1.064	1.000
	P3	0.868	1.000
	P4	1.930	0.564
P2	P3	-0.196	1.000
	P4	0.866	1.000
P3	P4	1.062	0.428

Legenda: P1- prvi pregled; P2- drugi pregled, nakon 4 meseca primene metformina; P3- treći pregled, nakon 8 meseci primene metformina; P4- četvrti pregled nakon 12 meseci primene metformina;* označava statističku značajnost

4.7.2. Razlike u procentima pada vitamina B12 i B12 aktiva

Prosečan pad vitamina B12 tokom prva četiri meseca primene metformina je iznosio u procentima 12.94 %, dok za vitamin B12 aktiv je taj procenat iznosio 8.48 %. Međutim, ova razlika nije statistički značajna ($t=1.093$, $df=49$, $p=0.280$).

Prosečan pad ukupnog vitamina B12 tokom godinu dana ispitivanja (12 meseci primene metformina) je u procentima iznosio 25.29 %, dok za vitamin B12 aktiv je iznosio 23.26 %. Takođe, i ova razlika nije na nivou statističke značajnosti ($t=0.627$, $df=49$, $p=0.533$).

Tabela 36: Značajnost razlika pada B12 i B12 aktiva, u procentima tokom ispitivanja

N=50	B12	B12 aktiv	P vrednost
P1-P2	12.942	8.486	0.280
P1-P4	25.290	23.260	0.533

Legenda: P1-P2: prosečna vrednost razlika u vrednosti vitamina B12, odnosno B12 aktiva, na početku, i nakon prva četiri meseca ispitivanja izražene u procentima; P1-P4: prosečna vrednost razlika u vrednosti vitamina B12, odnosno B12 aktiva, na početku, i nakon dvanaest meseci ispitivanja izražene u procentima

4.7.3. Analiza zavisnosti promena ukupnog vitamina B12 i B12 aktiva (Hi kvadrat test)

Daljom analizom praćena je promena ukupnog vitamina B12 i B12 aktiva tokom godinu dana ispitivanja. Definisane su razlike između varijabli ukupnog B12 merenih u prvom (P1) i četvrtom pregledu (P4) kao i varijable B12 aktiv u istim vremenskim trenucima. Drugim rećima meren je pad obe varijable tokom vremena. Potom su dobijene razlike transformisane u binarne kategorijalne varijable koje mogu da prime vrednost 0 ili 1. Vrednost 0 je dodeljena ako pad nije znaćajan, a 1 ako je pad znaćajan. Znaćajnost pada obe razlike je odrećena 75. percentilom. U slućaju pada ukupnog B12, 75. percentil je iznosio 84.6 pmol/L, a B12 aktiv 52.28 pmol/L.

Hi kvadrat test nezavisnosti je potvrdio da postoji statistićki znaćajna zavisnost između varijabli pada B12 i B12 aktiva ($\chi^2=10.240$, $p=0.001$). Ako se posmatraju ispitanici koji nisu imali znaćajan pad B12, njih 86.8% nije imalo znaćajan pad B12 aktiva. S druge strane, ako se posmatraju ispitanici s znaćajnim padom B12, 58.3% je imalo, istovremeno znaćajan pad B12 aktiva.

Tabela 37: Rezultati Chi kvadrat testa

		B12 aktiv		Total	
		0	1		
	0	Broj	33	5	38
		% unutar B12	86.8%	13.2%	100.0%
		% unutar B12 aktiv	86.8%	41.7%	76.0%
		% of Total	66.0%	10.0%	76.0%
B12 ukupni	1	Broj	5	7	12
		% unutar B12	41.7%	58.3%	100.0%
		% unutar B12 aktiv	13.2%	58.3%	24.0%
		% od ukupnih	10.0%	14.0%	24.0%

4.7.4. Analize promena nivoa parametara vitamina B12 i folne kiseline u odnosu na godine života ispitanika (Manova analiza)

Ne postoji statistički značajna interakcija između merenja ukupnog vitamina B12 tokom četiri vremenska trenutka i godina starosti pacijenata $F(3,47)=1.721$, $p=0.165$, $\eta^2=0.035$, što je potvrđeno i Wilks Lambda koeficijentom koji iznosi 0.944, sa verovatnoćom 0.458. Rezultati takođe, ukazuju da godine nemaju prediktivnu moć u utvrđivanju razlika u B12 tokom vremena $F(1,47)=3.014$, $p=0.164$, $\eta^2=0.041$.

Slično kao kod ukupnog B12, ne postoji statistički značajna interakcija između merenja B12 aktiv tokom 4 vremenska trenutka i godina starosti pacijenata ($F(3,47)=1.030$, $p=0.369$, $\eta^2=0.021$), što je potvrđeno i Wilks Lambda koeficijentom koji iznosi 0.954, sa verovatnoćom 0.190. Rezultati ukazuju da godine nemaju prediktivnu moć u utvrđivanju razlika u B12 aktiva tokom vremena $F(1,47)=0.504$, $p=0.481$, $\eta^2=0.011$.

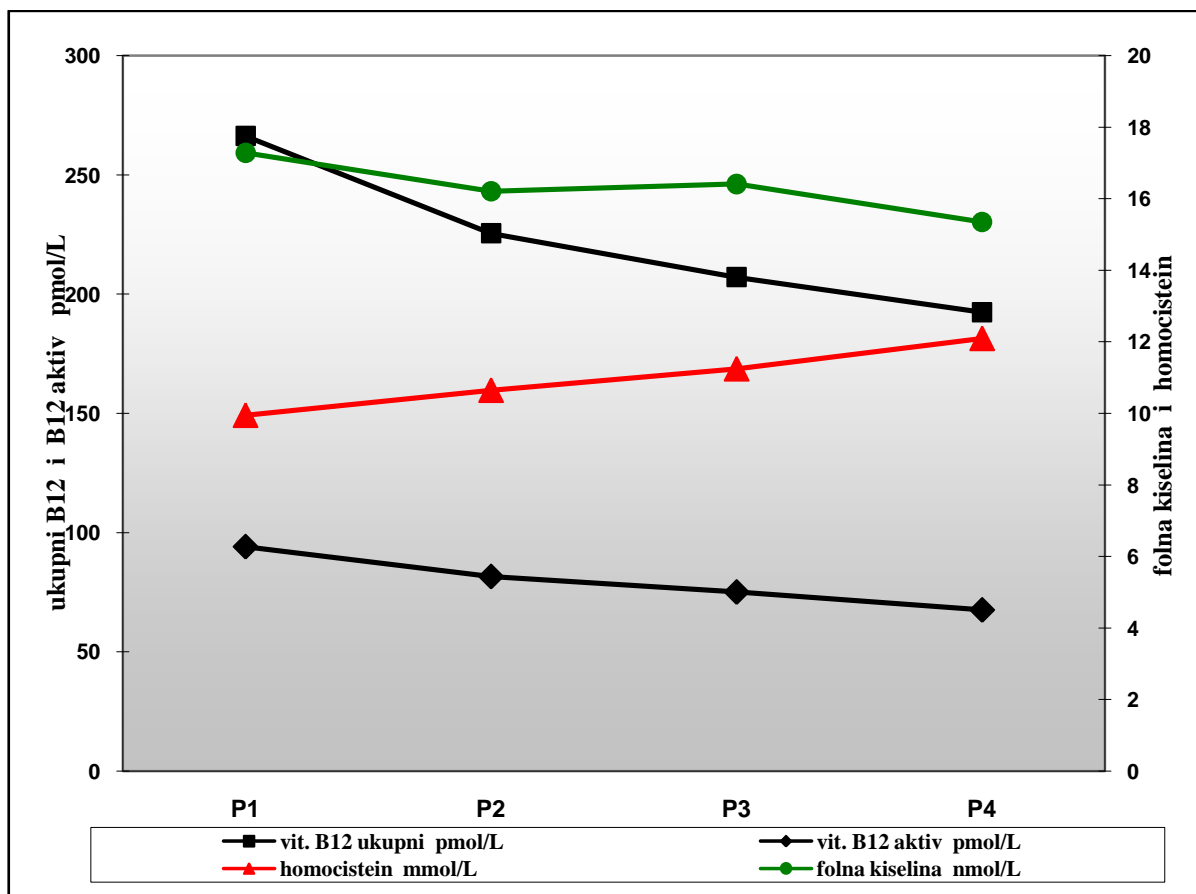
Ne postoji statistički značajna interakcija između merenja folne kiseline tokom 4 vremenska trenutka i godina starosti pacijenata ($F(3,47)=1.411$, $p=0.249$, $\eta^2=0.029$), što je potvrđeno i Wilks Lambda koeficijentom koji iznosi 0.896, sa verovatnoćom 0.540. Rezultati ukazuju da godine nemaju prediktivnu moć u utvrđivanju razlika u folnoj kiselini tokom vremena $F(1, 47)=2.003$, $p=0.089$, $\eta^2=0.060$.

Postoji statistički značajna interakcija između merenja homocisteina tokom 4 vremenska trenutka i godina starosti pacijenata. $F(3,47)=3.618$, $p=0.015$, $\eta^2=0.071$, što je potvrđeno i Wilks Lambda koeficijentom koji iznosi 0.790, sa verovatnoćom 0.013. Međutim, rezultati ukazuju da godine nemaju prediktivnu moć u utvrđivanju razlika u homocisteinu tokom vremena $F(1, 47)=0.415$, $p=0.523$, $\eta^2=0.009$.

4.7.5. Interakcije između parametara vitamina B12, B12 aktiva, homocisteina i folne kiseline

Postoji značajna interakcija između ukupnog B12 i B12 aktiv, kao posmatrane promenljive u vremenu $p=0.001$ (grafikon 9). Postoji značajna interakcija između ukupnog B12 i Hcy, kao posmatrane promenljive u vremenu $p=0.000$ (grafikon 9). Postoji značajna interakcija između B12 aktiv i Hcy, kao posmatrane promenljive u vremenu $p=0.000$ (grafikon 9). Postoji značajna interakcija između folne kiseline i Hcy, kao posmatrane promenljive u vremenu $p=0.000$ (grafikon 9).

Grafikon 9: Interakcije između ukupnog vitamina B12, B12 aktiva, homocisteina i folne kiseline



4.8. RELACIJE IZMEĐU ANALIZIRANIH PARAMETARA U SVA ČETIRI

VREMENSKA TRENUTKA (P1, P2, P3 i P4)

4.8.1. Ukupni vitamin B12

Korelacionom analizom ispitivano je postojanje linearne veze između ukupnog vitamina B12 i antropometrijskih parametara, starosne dobi ispitanika, B12 aktiv (holoTC), folne kiseline i homocisteina unutar sva četiri pregleda (P1, P2, P3 i P4).

Tokom sva četiri pregleda nije utvrđena statistički značajna korelacija između vrednosti ukupnog vitamina B12 i godina života ispitanika ($p=0.681$; $p=0.977$; $p=0.855$ i $p=0.999$) (tabela 38). Utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija između ukupnog vitamina B12 i izračunatih antropometrijskih parametara: ITM ($p=0.001-0.006$); WHR ($p=0.003-0.04$) i WSR ($0.001-0.016$) (tabela 38).

Tokom sve četiri pregleda utvrđena je značajna pozitivna korelacija između ukupnog vitamina B12 i B12 aktiva ($p=0.000$) (tabela 38). Linearnom korelacionom analizom utvrđena je značajna korelacija između ukupnog vitamina B12 i folne kiseline, posmatrano u sve četiri tačke ispitivanja. Statistički značajna inverzna korelacija između ukupnog B12 i homocisteina je utvrđena jedino u P3 ($p=0.029$) (tabela 38).

Od parametara kompletne krvne slike, ukupni B12 je značajno direktno korelisao jedino sa brojem eritrocita tokom sva četiri pregleda ($p=0.017$; $p=0.011$; $p=0.008$ i $p=0.05$) i inverzno, s vrednostima MCV-a u prvom ($p=0.008$) i četvrtom pregledu ($p=0.05$) (tabela 38).

Tabela 38: Linearna korelaciona analiza između ukupnog vitamina B12 i ispitivanih parametara i unutar sva četiri pregleda (P1, P2, P3 i P4).

N=50	B12 ukupni (pmol/L)		B12 ukupni (pmol/L)		B12 ukupni (pmol/L)		B12 ukupni (pmol/L)	
	P1		P2		P3		P4	
	r	p	r	p	r	p	r	p
ITM (kg/m ²)	0.392	0.006*	0.483	0.002*	0.449	0.001*	0.438	0.002*
WHR	0.233	0.102	0.287	0.040*	0.393	0.006*	0.415	0.003*
WSR	0.466	0.001*	0.450	0.016*	0.470	0.001*	0.124	0.383
Starost (god)	0.059	0.681	0.040	0.977	-0.027	0.850	0.016*	0.999
B12 aktiv (pmol/L)	0.662	0.000*	0.643	0.000*	0.730	0.000*	0.619	0.000*
Folna kis. (nmol/L)	0.285	0.004*	0.405	0.004*	0.415	0.003*	0.277	0.050*
Hcy (μmol/L)	-0.247	0.083	-0.383	0.074	-0.311	0.029*	-0.257	0.070
RBC	0.338	0.017	0.362	0.011*	0.376	0.008*	0.272	0.050*
Hct	0.192	0.178	0.235	0.099	0.217	0.129	0.185	0.195
MCV (fl)	-0.376	0.008*	-0.100	0.483	-0.141	0.322	-0.274	0.050*

Legenda: ITM- indeks telesne mase izražen ukg/m²; WHR- odnos struk/kuk (weist to hip ratio); WSR- odnos struk/visina (weist to stature ratio); Hcy- homocisteinu plazmi; RBC- broj eritrocita; Hct- hematokrit; MCV- srednji volumen eritrocita; r- koeficijent korelacije ranga, p-vrednost statističke značajnosti (* statistička značajnost)

4.8.2. Vitamin B12 aktiv

Korelacionom analizom ispitivano je postojanje linearne veze između B12 aktiva i antropometrijskih parametara, starosnu dob ispitanika, folnu kiselinu i homocistein unutar sva četiri pregleda (P1, P2, P3 i P4).

Tokom sva četiri pregleda nije utvrđena statistički značajna korelacija između vrednosti B12 aktiva i godina života ispitanika ($p=0.472$; $p=0.947$; $p=0.659$ i $p=0.993$) (tabela 39). Utvrđena je visoko statistički značajna pozitivna korelacija između ukupnog vitamina B12 i izračunatih antropometrijskih parametara: ITM ($p=0.000$); WHR ($p=0.000-0.009$) i WSR ($p=0.000-0.007$) (tabela 39).

Linearnom korelacionom analizom utvrđena je značajna pozitivna korelacija B12 aktiva i folne kiseline, posmatrano u sve četiri tačke ispitivanja ($p=0.005$; $p=0.008$; $p=0.001$ i $p=0.003$). Takođe, utvrđena je statistički značajna inverzna korelacija između B12 aktiva i homocisteina u sve četiri tačke merenja ($p=0.01$; $p=0.004$; $p=0.01$ i $p=0.026$) (tabela 39).

Od parametara kompletne krvne slike, B12 aktiv je značajno direktno korelisao jedino sa brojem eritrocita tokom sva četiri pregleda ($p=0.005$; $p=0.002$; $p=0.000$ i $p=0.005$) i inverzno, s vrednostima MCV-a u trećem pregledu ($p=0.035$). B12 aktiv je pozitivno korelisao s vrednostima hematokrita tokom prva dva merenja (P1 i P2) (tabela 39).

Tabela 39: Linearna korelaciona analiza između B12 aktiva i ispitivanih parametara i unutar sva četiri pregleda (P1, P2, P3 i P4).

N=50	B12 aktiv (pmol/L)		B12 aktiv (pmol/L)		B12 aktiv (pmol/L)		B12 aktiv (pmol/L)	
	P1		P2		P3		P4	
	r	p	r	p	r	p	r	p
ITM (kg/m ²)	0.606	0.000*	0.566	0.001*	0.560	0.000*	0.594	0.000*
WHR	0.434	0.002*	0.541	0.002*	0.563	0.000*	0.372	0.009*
WSR	0.599	0.000*	0.483	0.007*	0.538	0.000*	0.015	0.916
Starost (god)	0.103	0.472	0.009	0.947	0.063	0.659	0.001	0.993
Folna kis. (nmol/L)	0.395	0.005*	0.377	0.008*	0.460	0.001*	0.413	0.003*
Hcy (μmol/L)	-0.367	0.01*	-0.406	0.004*	-0.343	0.010*	-0.316	0.026*
RBC	0.396	0.005*	0.537	0.002*	0.499	0.000*	0.394	0.005*
Hct	0.302	0.034*	0.390	0.006*	0.216	0.130	0.198	0.165
MCV (fl)	-0.252	0.077	-0.238	0.095	-0.301	0.035*	-0.235	0.100

Legenda: ITM- indeks telesne mase izražen uk_g/m²; WHR- odnos struk/kuk (weist to hip ratio); WSR- odnos struk/visina (weist to stature ratio); Hcy- homocisteinu plazmi; RBC- broj eritrocita; Hct- hematokrit; MCV- srednji volumen eritrocita; r- koeficijent korelacije ranga, p-vrednost statističke značajnosti (* statistička značajnost)

4.9. UČESTALOST BROJA ISPITANIKA SA GRANIČNO SNIŽENIM I NISKIM NIVOIMA VITAMINA B12

Tokom jednogodišnjeg ispitivanja, vrednosti ukupnog vitamina B12 aktiva svih ispitanika su bile unutar referentnog intervala preporučenog od strane proizvođača (ref. za ukupni B12: 138.0-652.0 pmol/L).

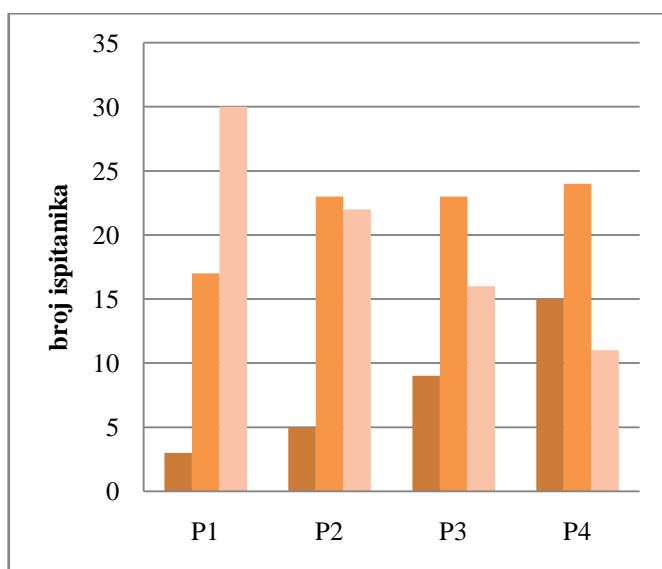
U momentu započinjanja ispitivanja 34 % (17/50) ispitanika je imalo granično niske vrednosti vitamina B12 (subklinički deficit vitamina B12), (ref. 138.0-652.0 pmol/L, raspon granično niskih vrednosti: 150-220 pmol/L). Nakon četiri meseca primene metforminske terapije (2. merenje: P2), procenat istih se povećao na 46 % (23/50). A posle 8 meseci je taj broj ostao isti (23/50). Ispitivanje je završilo 24 (48 %) ispitanika sa subkliničkim deficitom vitamina B12 (vrednosti ukupnog vitamina B12 u rasponu od 150.0-220.0 pmol/L).

U momentu započinjanja ispitivanja 6 % (3/50) ispitanika je imalo niske vrednosti (biohemijski verifikovan deficit ukupnog vitamina B12, cut off: < 150 pmol/L) vrednosti ukupnog vitamina B12. Nakon četiri meseca primene metforminske terapije (2. merenje: P2), procenat istih se povećao na 10 % (5/50), ali bez statističke značajnosti (McNemarov test, $p=0.625$). Nakon osam meseci je taj broj je povećan na 18 % (9/50). Ispitivanje je završilo 15 ispitanika sa biohemijskim deficitom vitamina B12 (grafikon 10). Tokom godinu dana ispitivanja, učestalost ispitanika s biohemijskim deficitom vitamina B12 se statistički značajno povećala (McNemarov test, $p=0.000$).

Analizom ovog grafikona 10, registruje se kontinuirani porast broja ispitanika s vrednostima ukupnog vitamina B12 ispod graničnih 150.0 pmol/L, takođe je prisutan i kontinuirani pad broja ispitanika s vrednostima ukupnog vitamina B12 iznad 220.0 pmol/L. Na početku

ispitivanja, broj ispitanika s granično niskim vrednostima ukupnog vitamina B12 bio relativno visok (34 %), Ukupni vitamin B12 u intervalu od 150-220 pmol/L, počevši od 4. meseca ispitivanja se nije značajno menjao (McNemarov test, $p=0.108$) (grafikon 10).

Grafikon 10: Učestalost broja ispitanika sa granično sniženim i niskim nivoima vitamina B12, kroz četiri tačke merenja (N=50)



B12-uk (pmol/L)	P1 %	P2 %	P3 %	P4 %	p
< 150	6	10	18	30	0.000*
150-220	34	46	46	48	0.108
> 220	60	44	36	22	0.135

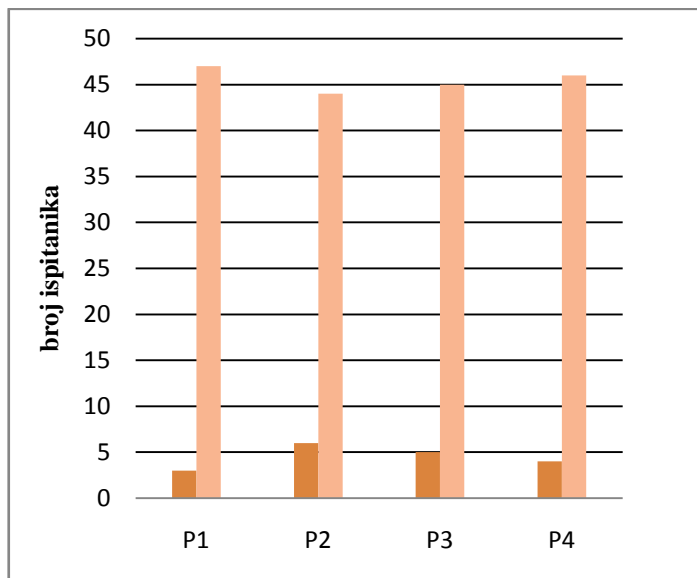
Legenda: Stubići najtamnije nijanse narandžaste boje predstavljaju učestalost broja ispitanika s vrednošću ukupnog vitamina B12<150.0 pmol/L, tokom sva četiri pregleda (P1, P2, P3 i P4). Stubići svetlije nijanse predstavljaju apsolutan broj ispitanika s vrednošću ukupnog vitamina B12 između 150.0-220.0pmol/L, u sva četiri merenja. Stubići najsvetlije nijanse predstavljaju broj ispitanika s vrednošću ukupnog vitamina B12 višim od 220.0 pmol/L.

4.10. UČESTALOST BROJA ISPITANIKA SA BIOHEMIJSKIM DEFICITOM VITAMINA B12 ACTIV-a

Istovremenim određivanjem vitamina HoloTC (B12 Activ), koji predstavlja aktivnu formu ovog vitamina, svi ispitanici su imali vrednosti unutar referentnog intervala predloženog od strane proizvođača (25.1-165.0 pmol/L). U momentu započinjanja ispitivanja 3 (6 %) ispitanika je imalo vrednost HoloTC ispod granice od 35 pmol/L. Nakon četiri meseca primene metforminske terapije (2. merenje: P2), broj istih se povećao na 6 (12 %), ali bez statističke značajnosti (McNemarov test, $p=0.851$). Nakon osam meseci je taj broj smanjen na 5 (10%). Ispitivanje je završilo 4 (8%) ispitanika sa vrednošću HoloTC ispod preporučene cut-off vrednosti (grafikon 11). Tokom godinu dana ispitivanja nije doslo do statistički značajnog porasta broja ispitanika s deficitom vitamina B12 (na osnovu cut off vrednosti B12 aktiva) ($p=0.480$).

Analizirajući dobijene rezultate i navedeni grafikon 11, utvrđeno je da se tokom jednogodišnjeg (dvanaest meseci) ispitivanja broj ispitanika s niskim vrednostima vitamina B12 aktiva nije značajno povećavao.

Grafikon 11: Učestalost ispitanika sa biohemijskim deficitom B12-aktiv (holoTC) (cut off vrednost od 35.0 pmol/L), kroz četiri tačke merenja (N=50)



B12 Aktiv (pmol/L)	P1 %	P2 %	P3 %	P4 %	p
< 35	6	12	10	8	0.480
> 35	94	88	90	92	0.590

Legenda: Stubići tamno narandžaste boje predstavljaju učestalost ispitanika s vrednošću B12-aktiva < 35.0 pmol/L. Stubići svetlije nijanse predstavljaju broj ispitanika s vrednošću B12-aktiva > 35.0 pmol/L, u sva četiri merenja.

4.11. HOMOCISTEIN I FOLNA KISELINA

Tokom jednogodišnjeg ispitivanja, vrednosti homocisteina (medijane) u plazmi su bile unutar referentnog intervala. U momentu započinjanja ispitivanja, četiri ispitanika su imali vrednosti homocisteina iznad gornje granice referentnog intervala (preporučeni referentni interval od strane proizvođača; 5.1-15.4 $\mu\text{mol/L}$). Taj procenat od 8 % (4/50) se održao i nakon četiri i osam meseci od momenta uvođenja metforminske terapije. Ispitivanje je završilo 5 ispitanika s vrednošću homocisteina iznad gornje granice referentnog opsega.

Tokom jednogodišnjeg ispitivanja, srednje vrednosti koncentracija folne kiseline su bile unutar referentnog intervala (7.0-46.4 nmol/L). Takođe, svi ispitanici su imali normalne vrednosti folne kiseline tokom jednogodišnjeg ispitivanja (sva četiri merenja tj.pregleda).

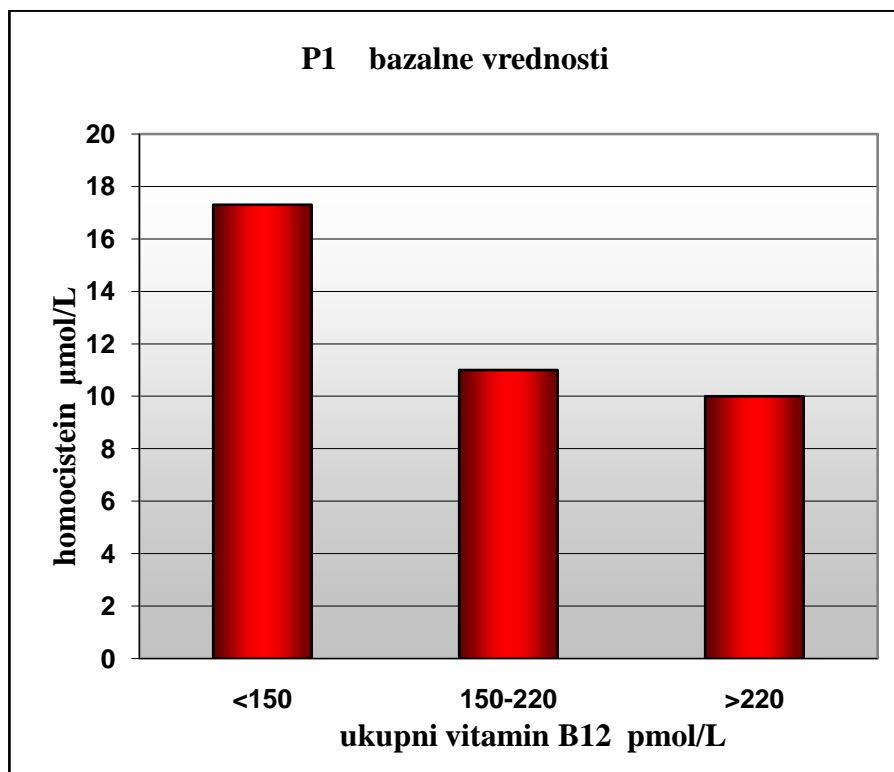
4.11.1. Vrednosti homocisteina u odnosu na ukupni vitamin B12

P1

Na grafikonu 12 su prikazane srednje vrednosti koncentracija homocisteina u odnosu na tri podgrupe ispitanika podeljenih na osnovu vrednosti ukupnog vitamina B12 u toku prvog pregleda (merjenja). Prva podgrupa s vrednošću ukupnog vitamina B12 nižom od 150.0 pmol/L , druga s vrednošću između 150.0-220.0 pmol/L i treća s vrednošću iznad 220.0 pmol/L . Analizom statističke značajnosti utvrđena je statistički značajna razlika u vrednosti Hcy između prve i druge ($p=0.009$), kao i prve i trećepodgrupe ($p=0.000$). Vrednosti Hcy u drugoj podgrupi su bile više, ali se nisu značajno razlikovale u odnosu na treću podgrupu ($p=0.143$). Najviše vrednosti Hcy (17.3 $\mu\text{mol/L}$) su bile u podgrupi ispitanika koje su imale

biohemijski verifikovan deficit ukupnog vitamina B12 (<150.0 pmol/L), dok su najniže vrednosti bile u grupi ispitanika s vrednošću B12 iznad 220.0 pmol/L (10.0µmol/L).

Grafikon 12: Vrednosti Hcy u odnosu na vrednosti ukupnog vitamina B12 u krvi (P1)

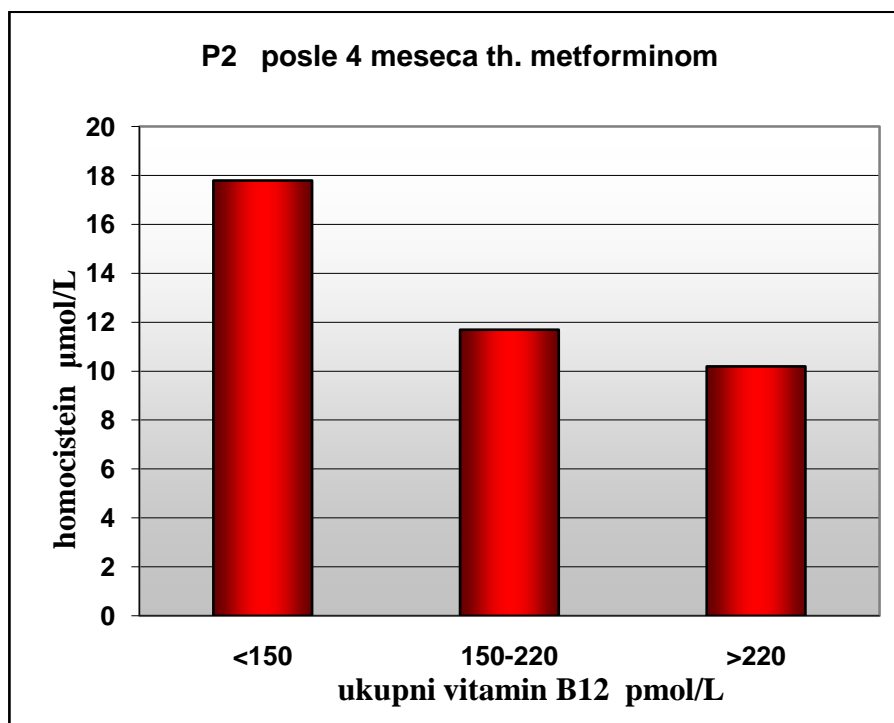


P2

Na grafikonu 13 su prikazane srednje vrednosti koncentracija homocisteina u odnosu na tri podgrupe ispitanika podeljenih na osnovu vrednosti ukupnog vitamina B12, tokom drugog pregleda. Prva podgrupa s vrednošću B12 nižom od 150.0 pmol/L, druga s vrednošću između 150.0-220.0 pmol/L i treća s vrednošću iznad 220.0 pmol/L. Analizom statističke značajnosti utvrđena je statistički značajna razlika u vrednosti Hcy između prve i druge ($p=0.004$), kao i prve i trećepodgrupe ($p=0.001$). Vrednosti Hcy u drugoj podgrupi su bile više, se nisu značajno razlikovale u odnosu na treću podgrupu ($p=0.173$). Najviše vrednosti Hcy

(17.8 μ mol/L) su bile u podgrupi ispitanika koje su imale biohemijski verifikovan deficit vitamina B12 (<150.0 pmol/L), dok su najniže vrednosti bile u grupi ispitanika s vrednošću B12 iznad 220.0 pmol/L (10.2 μ mol/L).

Grafikon 13: Vrednosti Hcy u odnosu na vrednosti ukupnog vitamina B12 u krvi (P2)

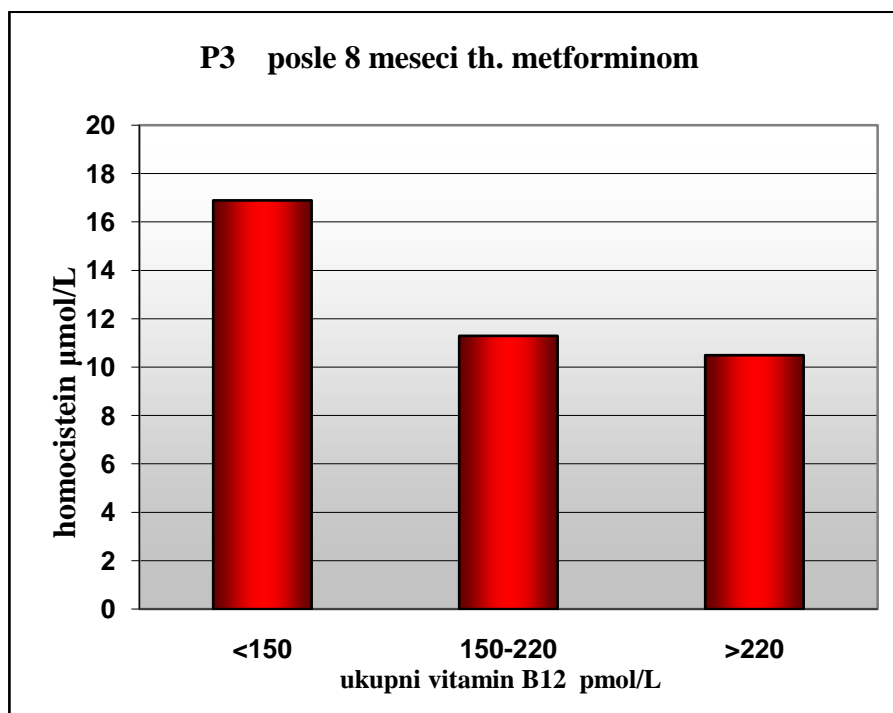


P3

Na grafikonu 14 su prikazane srednje vrednosti koncentracija homocisteina u odnosu na tri podgrupe ispitanika podeljenih na osnovu vrednosti ukupnog vitamina B12, tokom trećeg pregleda. Prva podgrupa s vrednošću B12 nižom od 150.0 pmol/L, druga s vrednošću između 150.0-220.0 pmol/L i treća s vrednošću iznad 220.0 pmol/L. Analizom statističke značajnosti utvrđena je statistički značajna razlika u vrednosti Hcy između prve i druge ($p=0.001$), kao i prve i trećepodgrupe ($p=0.001$). Vrednosti Hcy u drugoj podgrupi su bile više, se nisu značajno razlikovale u odnosu na treću podgrupu ($p=0.135$). Najviše vrednosti Hcy

(16.9 μ mol/L) su bile u podgrupi ispitanika koje su imale biohemijski verifikovan deficit vitamina B12 (<150.0 pmol/L), dok su najniže vrednosti bile u grupi ispitanika s vrednošću B12 iznad 220.0 pmol/L (10.5 μ mol/L).

Grafikon 14: Vrednosti Hcy u odnosu na vrednosti ukupnog vitamina B12 u krvi (P3)

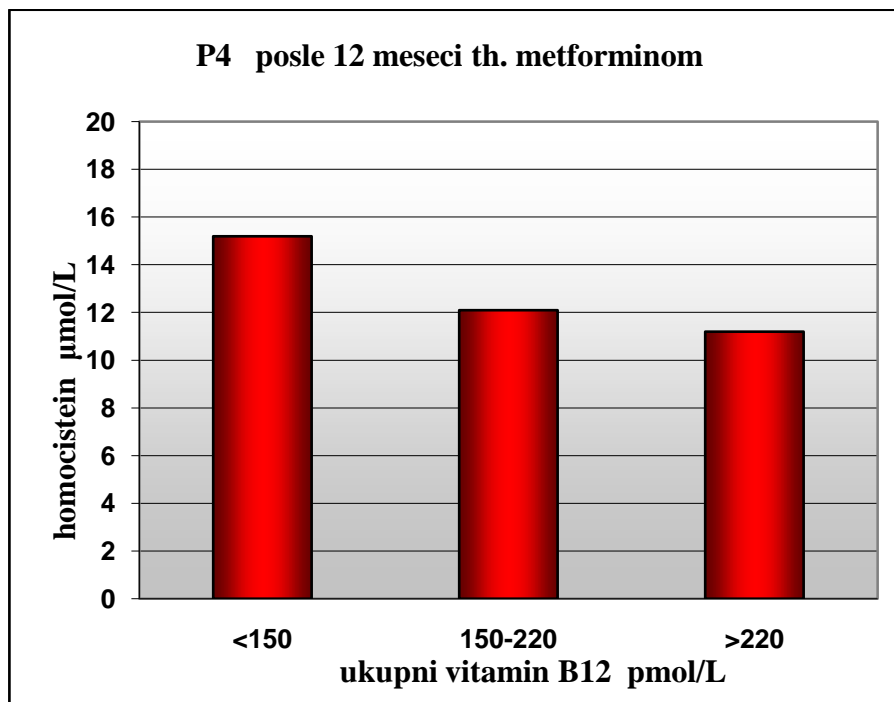


P4

Na grafikonu 15 su prikazane srednje vrednosti koncentracija homocisteina u odnosu na tri podgrupe ispitanika podeljenih na osnovu vrednosti ukupnog vitamina B12, tokom poslednjeg, četvrtog pregleda. Prva podgrupa s vrednošću B12 nižom od 150.0 pmol/L, druga s vrednošću između 150.0-220.0 pmol/L i treća s vrednošću iznad 220.0 pmol/L. Analizom statističke značajnosti utvrđena je statistički značajna razlika u vrednosti Hcy između prve i druge ($p=0.029$), kao i prve i treće podgrupe ($p=0.041$). Vrednosti Hcy u drugoj podgrupi su bile više, se nisu značajno razlikovale u odnosu na treću podgrupu

($p=0.247$). Najviše vrednosti Hcy ($15.2\mu\text{mol/L}$) su bile u podgrupi ispitanika koje su imale biohemijski ferifikovan deficit vitamina B12 ($<150.0\text{ pmol/L}$), dok su najniže vrednosti bile u grupi ispitanika s vrednošću B12 iznad 220.0 pmol/L ($11.2\mu\text{mol/L}$).

Grafikon 15: Vrednosti Hcy u odnosu na vrednosti ukupnog vitamina B12 u krvi (P4)

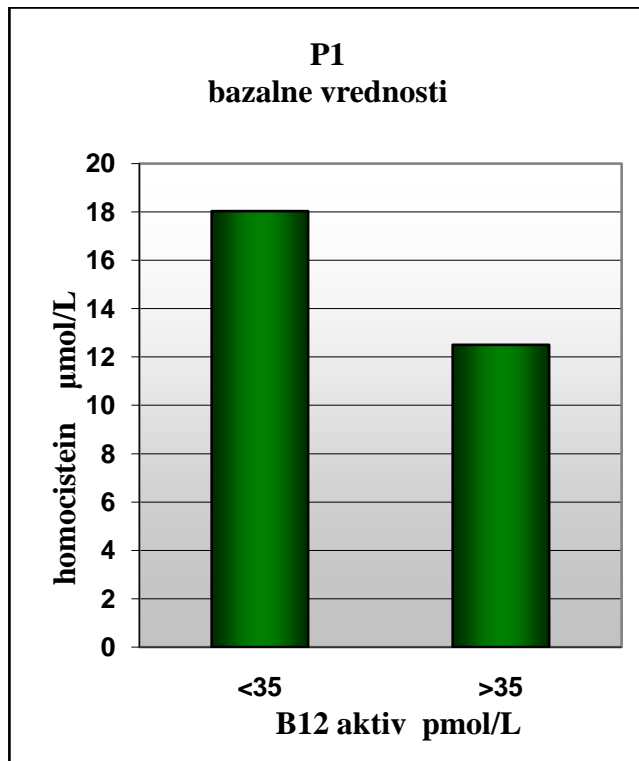


4.11.2. Vrednosti homocisteina u odnosu na vitamin B12 aktiv

P1

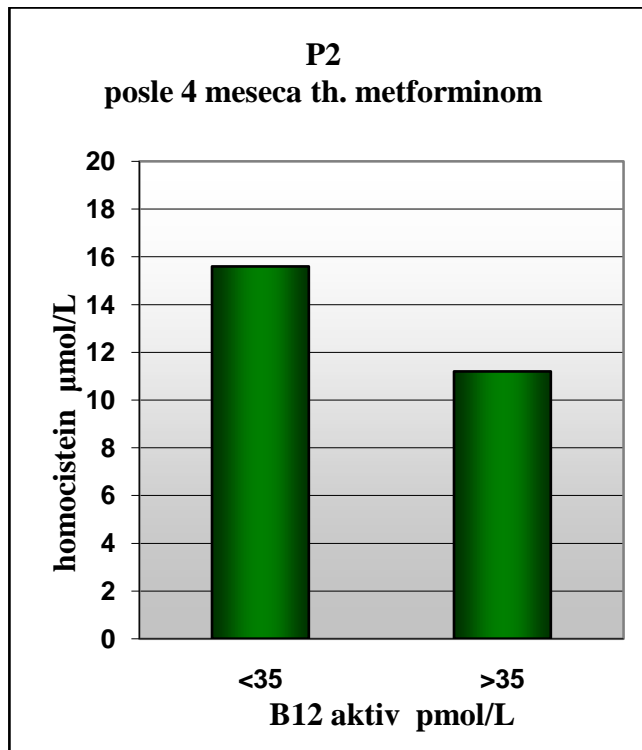
Na grafikonu 16 su prikazane srednje vrednosti koncentracija homocisteina u odnosu na cut-off vrednost vitamina B12 aktiv (HoloTc) od 35.0 pmol/L , tokom prvog pregleda (merenja). Na osnovu navedene granične vrednosti, formirane su dve podgrupe ispitanika, prva s vrednošću B12 aktiva nižom od 35.0 pmol/L i druga s vrednošću B12 aktiva iznad 35.0 pmol/L . Analizom statističke značajnosti nije utvrđena statistički značajna razlika u vrednosti Hcy između prve i druge podgrupe ($p=0.165$).

Grafikon 16: Vrednosti Hcy u odnosu na vrednosti B12 aktiva u krvi (P1)

**P2**

Na grafikonu 17 su prikazane srednje vrednosti koncentracija homocisteina u odnosu na cut-off vrednost vitamina B12 aktiva (HoloTc) od 35.0 pmol/L, tokom drugog pregleda. Na osnovu navedene granične vrednosti, formirane su dve podgrupe ispitanika, prva s vrednošću B12 aktiva nižom od 35.0 pmol/L i druga s vrednošću B12 aktiva iznad 35.0 pmol/L. Ispitanici sa vrednošću B12 aktiva nižoj od 35.0 pmol/L su imali statistički značajno više vrednosti homocisteina u krvi (15.6 vs 11.2 µmol/L; p=0.038)

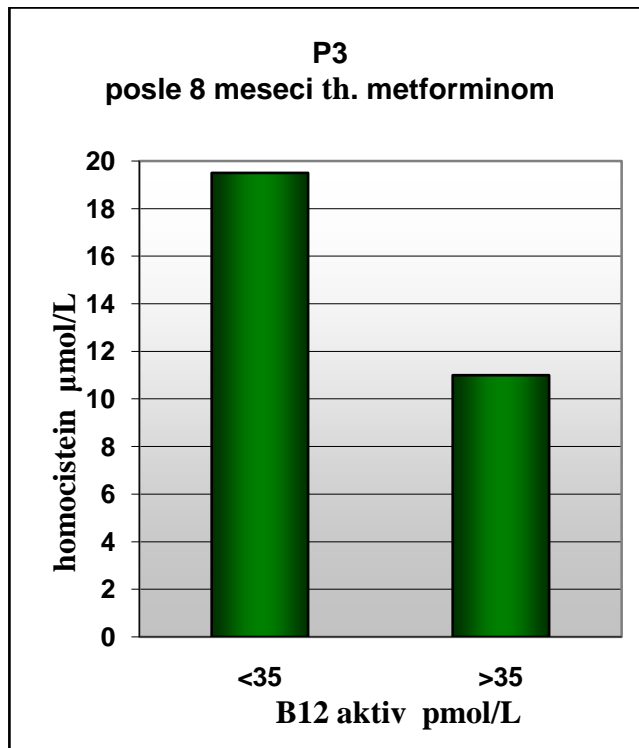
Grafikon 17: Vrednosti Hcy u odnosu na vrednosti B12 aktiva u krvi (P2)



P3

Na grafikonu 18 su prikazane srednje vrednosti koncentracija homocisteina u odnosu na cut-off vrednost vitamina B12 aktiv (HoloTc) od 35.0 pmol/L, tokom trećeg pregleda. Na osnovu navedene granične vrednosti, formirane su dve podgrupe ispitanika, prva s vrednošću B12 aktiva nižom od 35.0 pmol/L i druga s vrednošću B12 aktiva iznad 35.0 pmol/L. Ispitanici sa vrednošću B12 aktiva nižoj od 35.0 pmol/L su imali statistički značajno više vrednosti homocisteina u krvi (19.5 vs 11.0 µmol/L; p=0.000)

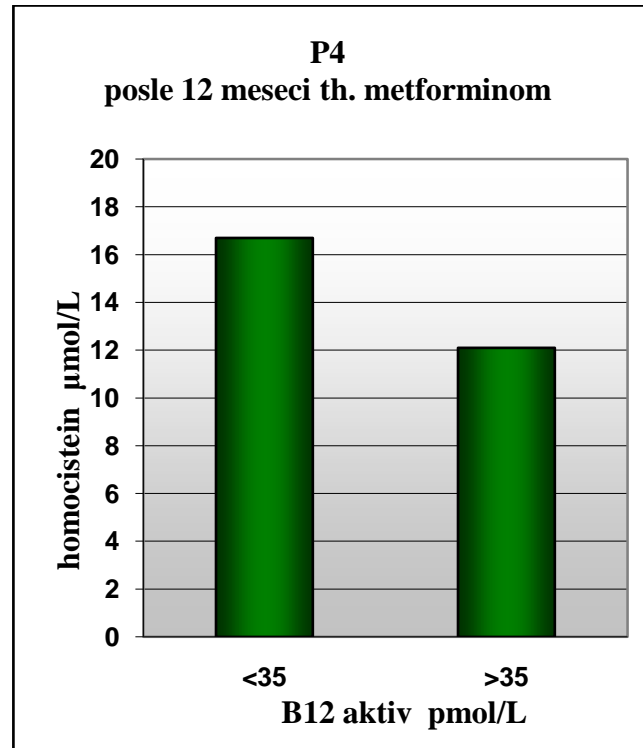
Grafikon 18: Vrednosti Hcy u odnosu na vrednosti B12 aktiva u krvi (P3)



P4

Na grafikonu 19 su prikazane srednje vrednosti koncentracija homocisteina u odnosu na cut-off vrednost vitamina B12 aktiv (HoloTc) od 35.0 pmol/L, tokom četvrtog pregleda. Na osnovu navedene granične vrednosti, formirane su dve podgrupe ispitanika, prva s vrednošću B12 aktiva nižom od 35.0 pmol/L i druga s vrednošću B12 aktiva iznad 35.0 pmol/L. Ispitanici sa vrednošću B12 aktiva nižoj od 35.0 pmol/L su imali statistički značajno više vrednosti homocisteina u krvi (16.7 vs 12.1 µmol/L; $p=0.006$).

Grafikon 19: Vrednosti Hcy u odnosu na vrednosti B12 aktiva u krvi (P4)



4.12. PANEL PODACI

U cilju ispitivanja predviđanja nivoa homocisteina tokom godinu dana ispitivanja, konstruisan je regresijski model s primenom panel podataka. Hausman test je potvrdio adekvatnost modela slučajnih efekata pa je za ispitivanje uticaja ukupnog vitamina B12, B12 aktiva i folne kiseline na homocistein primenjen regresijski model na panel podacima sa slučajnim efektima.

Rezultati modela ukazuju da su ukupni vitamin B12 i folna kiselina značajni prediktori homocisteina. Takođe, na ovom modelu je dodatno pokazan i statistički značajan uticaj četvrtog vremenskog perioda tj. poslednja četiri meseca ispitivanja na promenu, odnosno porast nivoa homocisteina (P3-P4).

Tabela 40: Regresijski model predikcije homocisteina na panel podacima

N=50	Koeficijent	St.greška	z	p- vrednost
	15.0665	1.22142	12.34	<0.0001***
B12	-0.00868	0.004129	-2.103	0.0354**
B12 aktiv	-0.000205	0.007409	-0.02774	0.9779
Folna kis	-0.114950	0.031850	-3.609	0.0003***
dt_2	0.420926	0.382090	1.102	0.2706
dt_3	0.658423	0.412872	1.595	0.1108
dt_4	1.23261	0.443013	2.782	0.0054***

Legenda: z-registrovana vrednost test statistike; dt_2- prvi, posmatrani vremenski interval tj. prva četiri meseca od momenta započinjanja primene metformina ; dt_3- drugi, posmatrani vremenski interval tj. druga četiri meseca od momenta započinjanja primene metformina,; dt_4- treći, posmatrani vremenski interval tj. treća, odnosno poslednja, četiri meseca od momenta započinjanja primene metformina;

5. DISKUSIJA

Studijom je obuhvaćeno 50 ispitanika s postavljenom dijagnozom tipa 2 dijabetes melitusa-a od trenutka započinjanja metforminske terapije. Svi ispitanici su tokom godinu dana kontinuirano uzimali 2000 miligrama metforminskog preparata, per os i kroz dve dnevne doze, tokom jutarnjeg i večernjeg obroka. Neposredno pre započinjanja primene medikamentne terapije (pregled 1: P1), svim ispitanicima je uzorkovana krv i izmerene koncentracije ukupnog vitamina B12 i B12 aktiva (holotranskobalamin: HoloTc). Vrednosti vitamina B12 praćene su nakon četiri (P2), osam (P3) i dvanaest meseci (P4), od trenutka započinjanja primene metformina.

5.1. KONTINUIRANI PAD SREDNJIH VREDNOSTI OBA, UKUPNOG B12 I B12 AKTIVA U TOKU POSMATRANOG PERIODA

U momentu započinjanja ispitivanja (P1), prosečna vrednost ukupnog vitamina B12 u krvi je iznosila 266.3 ± 104.3 pmol/L. Međutim, tokom prvog pregleda, pojedinačne vrednosti navedenog vitamina u krvi su značajno varirale i kretale se u širokom rasponu od: 137.0 do čak, 650.0 pmol/L.

Zatečeni status vitamina B12 kod ispitanika zavisi od postojećih rezervi u organizmu kao i kontinuiranog, dnevnog unosa ovog vitaminaputem namirnica bogatih vitaminom B12. Tkivne rezerve vitamina B12 su relativno visoke i iznose oko 2500 µg, dok se uravnoteženom ishranom, u proseku, dnevno može uneti 2.4 µg ovog vitamina [106].

Zbog postojanja širokog intervala referentnih vrednosti za vitamin B12 kao i prisustva ispitanika s istovremenim biohemijskim deficitom i odsustvom kliničkih manifestacija ovog vitamina, od posebnog značaja jeste sagledavanje statusa vitamina B12 kod određenih populacija, naročito kod pacijenata obolelih od T2DM.

Tokom ispitivanja, uočava se pad vrednosti ukupnog vitamina B12 u krvi i to već nakon četiri meseca primene metformina prosečne vrednosti ovog vitamina su iznosile 225.5 ± 73.0 pmol/L, a posle osam meseci, 207.1 ± 68.9 pmol/L. Nakon godinu dana primene metformina, prosečna vrednost ukupnog B12 je snižena na 192.4 ± 63.6 pmol/L. Tokom sva tri četvoro-mesečna intervala utvrđen je statistički značajan pad koncentracija ukupnog vitamina B12 ($p=0.000$). Sličan trend pada je registrovan i s vrednostima holotranskobalamina (B12 aktiva). U toku tri četvoro-mesečna intervala, utvrđen je statistički značajan pad koncentracija i B12 aktiva ($p=0.000$).

Potencijalni mehanizam kojim bi se mogao objasniti kontinuirani pad nivoa cirkulišućeg vitamina B12 je vezan za primenu metformina odnosno posledičnu, metforminom indukovanu malapsorpciju vitamina B12 na nivou terminalnog ileuma [107]. Kako je poznato da je navedeni transportni mehanizam preuzimanja vitamina B12 u enterocite zavisen od aktivnosti jona kalcijuma, smatra se da pozitivian naboj metformina direktnom kompeticijom može dovesti do narušavanja procesa apsorpcije vitamina B12 na nivou terminalnog ileuma [107].

5.2. UČESTALOST DEFICITA VITAMINA B12

Tokom jednogodišnjeg ispitivanja, vrednosti ukupnog vitamina B12 kod svih ispitanika su bile unutar referentnog intervala, preporučenog od strane proizvođača (138.0-652.0 pmol/L). Međutim, ukoliko se posmatra najčešće primenjivana donja cut-off vrednost za ukupni vitamin B12 od 150.0 pmol/L, u momentu započinjanja ispitivanja, 6 % ispitanika je imalo deficit vitamina B12. Posle četiri meseca kontinuirane upotrebe 2000 miligrama metformina na dan, taj procenat je porastao na 8 %. Nakon osam meseci, 20 % ispitanika je imalo deficit vitamina B12, da bi jednogodišnje ispitivanje završilo, čak 15 ispitanika s vrednošću ukupnog vitamina B12 nižom od 150.0 pmol/L (30 %).

Učestalost pojave deficita vitamina B12 kod pacijenata obolelih od T2DM-a na metforminskoj terapiji se, prema literaturnim podacima, kreće između 5 % i 37 % [108]. Međutim, navedeni opseg učestalosti deficita vitamina B12 je relativno širok i značajno se razlikuje od studije do studije. Neujednačenost u pogledu učestalosti deficita navedenog vitamina se može objasniti činjenicom da su ispitivanja vršena na različitim populacijama s različitim socio-ekonomskim statusom. Jedan od najviših procenata učestalosti deficita vitamina B12 je objavljen u studiji sprovedenoj na Brazilskoj populaciji, dok je značajno nižu učestalost od 5.8 %, utvrdila američka grupa autora [109, 110]. Svakako prilikom analiziranja učestalosti deficita ovog vitamina moralo bi se uzeti u razmatranje etnička i verska pripadnost, te navike u ishrani. U Indijskoj populaciji, sa dominantnom vegetarijanskom ishranom, registruje se visoka učestalost deficita vitamina B12 [111]. Rezultati ove studije su u saglasnosti sa do sada objavljenim rezultatima iz literature.

Učestalost pojave deficita ukupnog vitamina B12 je kontinuirano rasla, s porastom broja meseci primene metformina i iznosila nakon četiri meseca 8 %, da bi se povećala na čak 30 % nakon dvanaest meseci [111].

Procenat učestalosti deficita značajno varira i zbog činjenice da su primenjivani različiti laboratorijski testovi kao i različite, granične cut-off vrednosti prilikom utvrđivanja statusa vitamina B12 u krvi [110]. Ukoliko se koristi viši nivo cut-off vrednosti za deficit ukupnog vitamina B12 od 220.0 pmol/L (koji obuhvata i interval 150.0-220.0 pmol/L), procenat učestalosti niskih vrednosti vitamina B12 je značajno viši. Navedeni interval pripada kategoriji nisko normalnih vrednosti te prema literaturnim podacima, odgovara subkliničkom deficitu bez ispoljenih simptoma i znaka karakterističnih za deficit ovog vitamina (siva zona).

U momentu započinjanja ispitivanja, 34 % ispitanika je imalo subklinički deficit ovog vitamina. Nakon godinu dana, gotovo 50 % (39/50) ispitanika je imalo vrednosti ukupnog vitamina B12 u rasponu od 150.0-220.0 pmol/L.

Svi ispitanici su imali vrednosti vitamin B12 aktiva (HoloTC) unutar referentnog opsega (25.1-165.0 pmol/L) u sva četiri merenja. Međutim, u odnosu na najčešće, u literaturi, primenjivanu graničnu vrednost od 35.0 pmol/L, ispitivanje je započelo 3 ispitanika s vrednošću B12 aktiva nižom od 35.0 pmol/L. Nakon četiri meseca primene metforminske terapije, broj istih se povećao na 6 (12 %). Posle osam meseci je taj broj smanjen na 5. Ispitivanje je završilo 4 (8 %) ispitanika sa vrednošću B12 aktiva ispod preporučene granične vrednosti.

Primenom dva, različita kriterijuma za potvrdu biohemijskog deficita vitamina B12 (cut off za B12 ukupni od <150.0 pmol/L i B12 aktiv od < 35.0 pmol/L) dobijeni su različiti rezultati.

U odnosu na izmerene vrednosti tokom prvog pregleda (P1), i prema jednom i drugom kriterijumu, učestalost deficita vitamina B12 je iznosila 6 %. Nakon četiri, osam i konačno, dvanaest meseci primene metformina, dolazi do značajnog razilaženja u procentima koje odražavaju učestalost biohemijskog deficita ovog vitamina. Prema prvom kriterijumu, učestalost iznosi 30 %, dok prema kriterijumu koji obuhvata merenje holotranskobalamina (B12 aktiv), taj procenat je značajno niži i iznosi 10 %.

Diskrepanca u procentu učestalosti deficita vitamina B12 se može, pre svega komentarisati, primenom graničnih, cut-off vrednosti koje su postavljene krajnje arbitrarno. Naročito se ovaj podatak odnosi na graničnu cut-off vrednost za B12 aktiv. Prema literaturnim podacima, na osnovu izmerenih vrednosti B12 aktiva, prevalenca deficita ovog vitamina varira u rasponu od 3.9 % do 16 %, u zavisnosti od primenjene granične vrednosti [83, 112]. Značajno niža donja granična vrednost za holotranskobalamin od 21.0 pmol/L rezultirala je značajno nižom učestalošću vitamin B12-deficijentnih T2DM pacijenata na metforminskoj terapiji. U ovom ispitivanju, za graničnu vrednost je uzeta vrednost od 35.0 pmol/L, te dobijeni procenat učestalosti deficita ovog vitamina je u saglasnosti sa do sada objavljenim rezultatima (10 %) [112].

Polazeći od pretpostavke da postoji neusaglašenost između kliničkih i biohemijskih odnosno, laboratorijskih znaka deficita vitamina B12, evidentno je da bi biohemijski registrovan deficit trebao prethoditi kliničkom ispoljavanju deficita vitamina B12 [107]. Međutim, da li će i kojim intenzitetom zaista i nastati klinički deficit vitamina B12, u populaciji obolelih od T2DM, lečenih metforminom, nije dovoljno poznato i opisano u literaturi. Jasno je da etički principi prospektivnih ispitivanja onemogućavaju istraživanje dinamike progresije subkliničkog, biohemijskog deficita vitamina B12 u klinički deficit ovog vitamina. Ovom

studijom je potvrđeno da, i nakon godinu dana primene metformina, ni jedan ispitanik (N=50) nije imao, niti je razvio kliničke simptome i znake, karakteristične za deficit vitamina B12.

5.3. ĆELIJSKI EFEKTI VITAMINA B12 I NIVOI OVOG VITAMINA U EKSTRACELULARNOM PROSTORU

Iako je opšte poznato da terapija metforminom smanjuje nivo vitamina B12 u ekstracelularnom prostoru, nameće se pitanje: da li i u kojoj meri, ova terapija dovodi do deficita vitamina B12 u samim ciljnim ćelijama gde se u suštini odvijaju biološki efekti ovog vitamina?

Zbog toga je u okviru sprovedenih, laboratorijskih ispitivanja, pored određivanja koncentracija ukupnog vitamina B12 i holotranskobalamina, određivan i MCV kao jedan (uz parametre kompletne krvne slike) od najčešćih laboratorijskih parametara u utvrđivanju metaboličkog statusa ovog vitamina u kliničkim ispitivanjima. Međutim, mora se imati u vidu da je MCV istovremeno i nedovoljno precizan, senzitivan i specifičan laboratorijski parametar u sagledavanju deficita vitamina B12.

Teorijski, nedostatak vitamina B12 u jednom momentu će dovesti do pojave megaloblastne anemije koja se manifestuje značajnim porastom srednjeg volumena eritrocita ($MCV > 98$ fl). Stoga su u ovom ispitivanju praćeni parametri crvene krvne loze: broj eritrocita, koncentracija hemoglobina, hematokrit kao i izvedeni eritrocitni pokazatelji: MCV, MCH i MCHC, tokom sva četiri pregleda (P1, P2, P3 i P4).

Tokom godinu dana trajanja ove studije, i pored značajnog pada ukupnog i aktivnog vitamina B12, svi ispitanici su imali vrednosti svih navedenih parametara unutar referentnih intervala. Niti jedan ispitanik, niti u jednoj tački merenja nije imao laboratorijski potvrđenu i/ili klinički manifestnu megaloblastnu anemiju. Takođe, tokom godinu dana ispitivanja nije

došlo do statistički signifikantnog porasta vrednosti MCV-a (medijana i IQR u P1: 90.1 fl (88.0-93.8) vs. P4: 90.0 fl (88.0-92.0); $p=1.000$). S obzirom, da na vrednosti MCV-a mogu uticati istovremeno i nivoi folne kiseline i/ili gvožđa, MCV se smatra najmanje pouzdanim i senzitivnim laboratorijskim parametrom u proceni statusa vitamina B12 [113]. Tokom godinu dana kontinuirane primene metformina nije zabeležen niti jedan slučaj megaloblastne anemije. Navedeni podatak je u skladu sa poznatim literaturnim podacima koji ukazuju na činjenicu da je za kliničko ispoljavanje megaloblastne anemije potreban mnogo duži vremenski period, od minimum nekoliko godina [114, 125]. Do sada nisu objavljene studije u kojima jejednogodišnja primena metformina imala uticaj na eritrocitopoezu i pojavu megaloblastne anemije te kao takva nije uticala negativno na intraćelijski metabolizam eritrocitne loze [82, 109]. Naime, u literaturi, prvi slučaj megaloblastne anemije koji je doveden u vezu s kontinuiranom upotrebom metformina nastao je nakon osam godina kontinuirane primene navedenog leka [116].

S obzirom na mogućnost nastanka ozbiljnih komplikacija deficita vitamina B12 kod pacijenata s T2DM-a, Obeid i saradnici su fokus interesovanja preusmerili na praćenje senzitivnijih i specifičnijih laboratorijskih parametara unutarćelijskog metabolizma vitamina B12. Pored laboratorijskog određivanja ukupnog vitamina B12 i holoTC, kao markera ekstraćelijskog statusa ovog vitamina, ovi autori su određivali nivo B12 u eritrocitima, kao i direktne pokazatelje metaboličke aktivnosti ovog vitamina u krvi (MMA, homocistein, s-adenozilmetionin i s-adenozilhomocistein) [117]. Prvenstveno, ovom studijom je utvrđeno da je grupa dijabetičara imala više vrednosti MMA, s-adenozilmetionina, s-adenozilhomocisteina i niže vrednosti vitamina B12 u eritrocitima, uz vrednosti ukupnog vitamina B12 i holoTC koje su bile više u odnosu na grupu nedijabetičnih ispitanika.

Analizom grupe dijabetičara na metforminskoj terapiji i bez nje, ustanovljene su značajno niže vrednosti ukupnog vitamina B12 i holoTC u krvi uz istovremeno niže vrednosti MMA i s-adenozilhomocisteina, te posledično viši indeks metilacije (odnos s-adenozilmetionina i s-adenozilhomocisteina), u grupi dijabetičara na metforminskoj terapiji. Povišeni nivoi s-adenozinhomocisteina inhibišu enzime koji direktno učestvuju u procesu remetilacije, odnosno resinteze metionina.

Na osnovu dobijenih rezultata, autori su prepostavili postojanje vitamin B12 rezistencije karakteristične za T2DM. S druge strane, uvođenjem metformina u terapiju osnovne bolesti, taj stepen rezistencije je bio niži. U svakom slučaju, nameće se ideja o fenomenu zamaskiranosti statusa vitamina B12, kada se taj status procenjuje isključivo na osnovu nivoa ukupnog vitamina B12 i holoTC-a u krvi. Upravo, naredna ispitivanja u ovoj oblasti bi mogla dati preciznije odgovore na ovo veoma kompleksno pitanje. Pre svega se misli na uspostavljanje i primenu jedinstvene metodologije koja omogućava direktnu i indirektnu procenu koncentracije vitamina B12 u samim ciljnim ćelijama, kao tačnijeg i preciznijeg parametra metaboličkog puta zavisnog od kobalamina. Istovremeno, mogućnost sprovođenja ispitivanja uticaja metformina na kulturi humanih ćelija, analogno ispitivanjima na eksperimentalnim životinjama.

5.4. ODNOS IZMEĐU UKUPNOG VITAMINA B12 I B12 AKTIVA U ISPITIVANJU STATUSA VITAMINA B12 U TOKU TERAPIJE METFORMINOM

Holotranskobalamin predstavlja biološki raspoloživu frakciju vitamina B12 u cirkulaciji. U prethodnom periodu (kraj 20. i početak 21. veka) smatralo se da se holotranskobalamin pri deficitu vitamina B12, brže snižava i predstavlja pouzdaniji i senzitivniji pokazatelj deficita kobalamina, u odnosu na ukupni vitamin B12. O tome govori Herbert u svojoj teoriji razvoja deficita vitamina B12 (četiri stadijuma: normalni balans, negativni balans, deplecija i deficit B12 vitamina) [118]. Ova teorija je zasnovana na dve činjenice, srazmerno manjem udelu holotranskobalamina, u ukupnom pulu vitamina B12 u krvi koji se zbog bioraspoloživosti pri deficitu vitamina B12 prvi snižava kao i značajno kraćem poluživotu ovog molekula (6 minuta) u cirkulaciji. Prema ovoj teoriji, sniženje nivoa holotranskobalamina će nastati ranije u odnosu na pad koncentracija ukupnog vitamina B12 i/ili pojave kliničke simptomatologije deficita navedenog vitamina [118]. Na osnovu Herbertovog modela, određivanjem nivoa holotranskobalamina, može se postaviti dijagnoza negativnog balansa vitamina B12, kao ranog stadijuma deficita vitamina B12 kada još uvek nisu ispoljeni simptomi i znaci karakteristični za deficit ovog vitamina.

Kada se pojavio komercijalni pribor za određivanje, holotranskobalamin je predstavljen kao marker aktuelnog statusa vitamina B12 koji je nezavisan od skorašnje intestinalne apsorpcije ovog vitamina [119]. Nakon toga, dobijani su oprečni rezultati koji su ukazali na potrebu za pre ispitivanjem mesta i uloge holotranskobalamina u dijagnostičkom algoritmu deficita

vitamina B12. Neki podaci u literaturi ukazuju na podjednaku pouzdanost određivanja ukupnog vitamina B12 i B12 aktiva u ranoj dijagnostici deficita vitamina B12 [114, 117].

Prema novijim rezultatima kliničkih ispitivanja da primena metformina kod pacijenata T2DM-a dovodi do značajnije redukcije ukupnog vitamina B12 i njegove zastupljenije frakcije vezane za haptokorin, nego holotranskobalamina, u toku i kraćih vremenskih intervala od 3 meseca [87, 120]. Šestomesečna studija kod pacijenata sa sindromom policističnih jajnika lečenih metforminom je pokazala jedino značajnu redukciju ukupnog vitamina B12, dok se vrednosti holotranskobalamina nisu menjale tokom posmatranog vremenskog perioda [121].

Rezultati ove studije jasno pokazuju veoma sličan intenzitet i obrazac (trend) kontinuiranog pada, kako ukupnog, tako i B12 aktiva. Budući da ne postoji statistički značajna razlika između ispitivanih pokazatelja statusa vitamina B12 u pogledu intenziteta relativnog pada vrednosti u prvom kvartalu kao i tokom jednogodišnjeg ispitivanja, moglo bi se grubo zaključiti da se ne bi mogla dati prednost u proceni deficita vitamina B12 ni određivanju ukupnog vitamina B12, ni merenju transkobalamina. Takođe, visok stepen njihove povezanosti (korelacije) u sva četiri vremenska trenutka ispitivanja ukazuje na sličnu dijagnostičku vrednost u detekciji i praćenju hipovitaminoze B12 ova dva upoređivana laboratorijska testa.

Međutim, ipak postoje razlike koje se moraju verifikovati. Iako su razlike nesignifikantne, rezultati pokazuju da je intenzitet relativnog pada u prvom kvartalu i tokom jednogodišnjeg praćenja metforminske terapije, za ukupni vitamin B12 veći u odnosu na holotranskobalamin. Ovo je u potpunoj suprotnosti s Herbertovom teorijom kao i

preporukama proizvođača laboratorijskih testova za određivanje holotranskobalamina kao ranog pokazatelja deficita vitamina B12. Analiza individualnih trenda pada ukupnog vitamina B12 pokazuje da je kod svih ispitanika prisutan kontinuiran sukcesivni pad vrednosti ovog vitamina u sva četiri momenta ispitivanja. Za razliku od toga, kod više od polovine ispitanika prisutan je diskontinuitet snižavanja koncentracija holotranskobalamina, što jasno ukazuje na interferenciju nekog činioca na koncentraciju B12 aktiva. Tu se pre svega misli na neposredan uticaj unosa namirnica koje sadrže vitamin B12 i dovode do tranzitornog porasta nivoa holotranskobalamina. Na ovu činjenicu ukazuju i drugi autori koji osporavaju osnovne postavke Herbertove teorije [118]. U suštini ova teorija u proceni hipovitaminoze B12 daje prednost određivanju B12 aktiva u odnosu na merenje ukupnog vitamina B12 jer polazi od pretpostavke da nivo bioraspoloživog B12 aktiva bolje i brže odražava status B12 u organizmu. Međutim, u cirkulaciji se uporedo sa holotranskobalaminom nalazi i veća rezervna frakcija vitamina B12 vezanog za haptokorin. Bez obzira što nisu poznati mehanizmi interakcija između ove dve frakcije kobalamina u krvi, sasvim je izvesno da su prisutne, kao i u svim biološkim sistemima koji raspolažu bioraspoloživom supstancom u krvi i rezervnim odeljkom iste supstance. Pri narušavanju homeostaze te supstance u krvi (deficit vitamina B12), aktivira se kompenzatorni mehanizam koji ima za cilj da što duže obezbedi fiziološki biohemizam u ćelijama, održavajući optimalne koncentracije bioraspoložive frakcije, a na račun rezervnog odeljka iz koga se regrutuje supstanca i preusmerava u bioaktivni odeljak. Osnovna postavka Herbertove teorije da se pri deficitu vitamina B12 prvo snižava nivo holotranskobalamina je pogrešna, jer se u takvim stanjima prvo smanjuje rezervna frakcija vitamina B12, da bi se što duže održao bioaktivni odeljak ovog vitamina.

Imajući u vidu činjenicu da izmerena koncentracija vitamina B12 u krvi sadrži samo informaciju o pretpostavci da će se u ćelijama odvijati katalitički efekti vitamina B12, biološki efekat vitamina B12 se ovom analizom ne meri. Određivanje porasta nivoa homocisteina i MMA, kao pokazatelja bioloških efekata vitamina B12 u ćeliji se svakako može smatrati mnogo značajnijim pokazateljima deficita ovog vitamina. Bez obzira na moguće brojne primedbe, u toku ovog istraživanja je porast koncentracija homocisteina (dinamski funkcioni test) korišćen kao najznačajniji indikator deficita vitamina B12. Modifikovana regresiona analiza je pokazala da ukupni vitamin B12 ima statistički značajnu predikciju homocisteina, ali ne i određivanje B12 aktiva. Ovaj podatak ukazuje da određivanje ukupnog vitamina B12, kao dijagnostičkog testa u proceni nivoa porasta homocisteina, odnosno intracelularnog metaboličkog deficita vitamina B12 u toku terapije metforminom ima bitno višu kvalitativnu dijagnostičku vrednost od određivanja holotranskobalamina.

5.5. VREMENSKI ZAVISAN PAD VITAMINA B12 I B12 AKTIVA

S obzirom da je ovom studijom obuhvaćeno 50 ispitanika obolelih od T2DM-a, koji su tokom godinu dana bili na identičnoj i nepromenjivoj, dnevnoj dozi metformina od 2000 miligrama, ispitivan je jedino uticaj vremena na intenzitet promena vrednosti ukupnog vitamina B12 kao i B12 aktiva.

Jednostrukom analizom varijanse ponovljenih merenja u toku jednogodišnjeg praćenja dinamike promena nivoa ukupnog vitamina B12 utvrđeno je da postoji statistički značajan uticaj vremena odnosno dužine primene metformina na promenu, tj. pad vrednosti ukupnog vitamina B12 (Vilkosov pokazatelj lamda=0.353, p=0.000). Slični rezultati, utvrđeni su i za vrednosti B12 aktiva (Vilkosov pokazatelj lamda= 0.549, p=0.000).

Ting i autori su utvrdili da je povišen rizik za nastanak deficita vitamina B12 usko skopčan sa dužinom ekspozicije metforminu [82]. Tom prilikom utvrđena je statistički značajna, inverzna relacija između dužine trajanja primene metformina i nivoa vitamina B12 u krvi. Prema navedenoj studiji, ispitanici koji su uzimali metformin duže od 5 godina imali su viši rizik za nastanak deficita kobalamina [82]. Slične rezultate je objavila i Irska grupa autora, kao i grupa autora iz Novog Zelanda, ukazujući na značajnu redukciju vitamina B12 u krvi, nakon kontinuirane upotrebe meformina u vremenu, dužem od 5 godina [122, 123]. Joyce i autori su za kritičnu cut-off godinu definisali 3. godinu upotrebe metformina i povezali je s povišenim rizikom za nastanak deficita vitamina B12 [124].

Pored toga, postoje objavljeni radovi u kojima nije utvrđena nezavisna relacija između dužine ekspozicije metforminu i intenziteta pada ukupnog vitamina B12 i/ili B12 aktiva [83].

Prema rezultatima studije objavljene tokom 2015. godine, dužina ekspozicije metforminu nije povezana niti s vrednostima ukupnog vitamina B12, niti B12 aktiva [83]. Ovakav rezultat jeste posledica adjusmenta u odnosu na godine života, polnu pripadnost te dužinu trajanja dijabetesa u odgovarajućem regresionom modelu. Slične rezultate je objavila i Koreanska grupa autora [125]. Prema njihovoj opservaciji, relacija između dužine ekspozicije metforminu i niskih nivoa vitamina B12 u krvi, se može objasniti malapsorpcijom navedenog vitamina uslovljenom brojem godina života tj. starošću ispitanika.

U ovoj studiji je primenom MANOVA-e utvrđeno odsustvo statistički značajne interakcije između merenja ukupnog vitamina B12 tokom četiri vremenska trenutka i godina starosti pacijenata. Slično kao kod ukupnog B12, ne postoji statistički značajna interakcija između merenja B12 aktiva tokom 4 vremenska trenutka i godina starosti pacijenata ($p=0.369$). Rezultati takođe, ukazuju da godine života ispitanika nemaju prediktivnu moć u utvrđivanju razlika u vrednostima B12 ($p=0.164$) i B12 aktiva ($p=0.504$) tokom posmatranog vremenskog intervala. Na osnovu toga bi se moglo zaključiti da su promene u vrednostima i ukupnog vitamina B12 i B12 aktiva, unutar prve godine primene metformina, nastale nezavisno od starosti ispitanika, a samim tim i nezavisno od apsorpcionog kapaciteta vitamina B12 u terminalnom ileumu uslovljenog starošću.

U većini publikovanih radova, govori se o dominantnom uticaju veličine dnevne i/ili kumulativne doze primenjenog metformina na nastanak deficita vitamina B12. U različitim regresionim modelima, doza metformina se izdvojila kao nezavisan riziko-faktor u nastanku niskih nivoa vitamina B12, kako ukupnog tako i biološki aktivnog, B12 aktiva [83]. Slične rezultate su objavili i De Groot-Kamphuis i saradnici [107]. Međutim, kako su svi ispitanici ove studije, bili izloženi identičnoj, dnevnoj dozi metformina, nije bilo moguće ispitivati

uticaj doze ovog leka na status vitamina B12 u krvi. Uniformnost po pitanju primenjenog metformina na dnevnom nivou, proizlazi iz činjenice, da je to jedna od najčešćih, u praksi, preskribovanih doza ovog leka. Prema rezultatima drugih studija, utvrđena je dozna zavisnost između pada nivoa vitamina B12 i razvoja deficita ovog vitamina, s porastom primenjene doze za 1g dnevno [82]. S druge strane, prema rezultatima studije iz 2016. godine, kontinuirana primena metformina u dozi višoj od 1000 miligrama na dan se smatra rizičnijom za nastanak deficita vitamina B12, u odnosu na primenu dnevne doze koja je niža od graničnih 1000 miligrama [113]. S obzirom da su svi ispitanici u ovoj studiji bili na dvostruko višoj dnevnoj dozi metformina, neophodno je uzeti u obzir navedenu činjenicu, prilikom davanja preporuka za biohemijski skrining deficita vitamina B12 kod pacijenata s T2DM.

5.6. INTERAKCIJE VITAMINA B12 I B12 AKTIVA

Linearnom korelacionom analizom utvrđena je visoko statistički značajna pozitivna povezanost između ukupnog vitamina B12 i B12 aktiva tokom sva, četiri pregleda ($r=0.619-0.730$; $p=0.000$).

Ustanovljena korelacija je u saglasnosti s do sada objavljenim rezultatima u literaturi [83]. S obzirom da je koncentracija B12 aktiva sadržana u ukupnoj cirkulišućoj koncentraciji vitamina B12 a koja se kao takva i određuje primenom istoimenog testa, za očekivati je bilo dobijanje visoko statistički značajne pozitivne relacije. B12 aktiv predstavlja laboratorijski test kojim se određuje biološki raspoloživa frakcija kobalamina formirana u kompleks kobalamin-transkobalamin II.

Tokom ispitivanja, posmatrana je relacija između pada vrednosti ukupnog vitamina B12 i B12 aktiva između prvog (P1) i četvrtog (P4) merenja, kao krajnjih tački ispitivanja. Prosečan pad vrednosti ukupnog vitamina B12 je iznosio 25.29 % tokom godinu dana primene metformina. Veoma sličan procenat redukcije utvrđen je i za vitamin B12 aktiv (23.25 %) [81, 107]. Dobijeni rezultat je u saglasnosti sa, do sada, objavljenim rezultatima kliničkih studija. U zavisnosti od dizajna studije, dužine trajanja kao i primenjene doze metformina, nivo pada ukupnog kobalamina u krvi se kretao u rasponu od 4 % do 24 % [81, 107].

Prema rezultatu ove jednogodišnje studije, u proseku, vrednosti vitamina B12 su bile niže za oko jednu četvrtinu u odnosu na vrednosti pre započete primene 2000 miligrama metformina dnevno. Međutim, svi ispitanici su započeli studiju s različitim vrednostima

vitamina B12 u krvi, te različitim rezervama ovog vitamina u tkivima. Poznato je da se u jetri nalazi preko 90 % tkivnih rezervi kobalamina [126]. Upravo zbog navedene činjenice nije moguće definisati decidno granicu značajnog pada vitamina B12. Bilo je pacijenata koji su na samom početku studije imali vrednosti ovog vitamina u krvi u rasponu nisko normalnih vrednosti (150.0-220.0 pmol/L), te bi se kod njih i manji pad od 25 % mogao posmatrati laboratorijski ali i potencijalno, klinički značajnim.

Linearnom korelacionom analizom, utvrđena je statistički značajna pozitivna povezanost, umerenog stepena između pada vrednosti ukupnog i B12 aktiva ($r=0.428$; $p=0.000$). Na osnovu rezultata navedene korelacione analize, nastale promene, odnosno padovi u vrednostima srednjih aritmetičkih sredina ukupnog vitamina B12 i B12 aktiva, dešavaju se u istom smeru.

Analizom vrednosti razlika ukupnog vitamina B12 i B12 aktiva, između prvog i četvrtog merenja ispitivano je postojanje zavisnosti relacije između navedene dve varijable. U tu svrhu, za značajan pad vrednosti ukupnog vitamina B12 i B12 aktiva, uzet je arbitrarno, 75. percentil (84.6 pmol/L vs. 52.28 pmol/L). Hi kvadrat testom je utvrđeno da ako se posmatraju ispitanici sa značajnim padom ukupnog B12, 58.3% je imalo značajan pad B12 aktiva, odnosno ukoliko se posmatraju ispitanici koji nisu imali značajan pad ukupnog B12, njih 86.8% nije imalo ni značajan pad B12 aktiva ($hi^2=10.240$; $p=0.001$). Na osnovu veličine pada vrednosti ukupnog vitamina B12 moguće je predvideti učestalost (frekvenciju) značajnosti pada u vrednostima B12 aktiva. Istovremenim posmatranjem ispitanika s značajnim padom ukupnog vitamina B12, 58.3 % je imalo i značajan pad B12 aktiva. Preostalih 40-tak % je bilo u kategoriji nesignifikantnog pada, nepromenjenosti ili čak porasta u odnosu na početne vrednosti B12 aktiva. Značajan pad ukupnog B12 signifikantno

ukazuje na značajnost pada B12 aktiva, ali nije njegov jedini zajednički imenilac, jer na aktuelnu koncentraciju B12 aktiva može uticati više različitih faktora istovremeno (odnos između postojećih rezervi i apsorpcije u terminalnom ileumu).

5.7. ODNOSI IZMEĐU VITAMINA B12, FOLNE KISELINE I HOMOCISTEINA

Homocistein predstavlja jedan od laboratorijskih pokazatelja intraćelijskog metabolizma vitamina B12. Međutim, kako njegova produkcija zavisi, istovremeno i od prisustva i raspoloživosti folne kiseline i vitamina B6, smatra se samo jednim od markera statusa kobalamina.

U ovom ispitivanju, praćena je plazmatska koncentracija homocisteina tokom sve četiri tačke pregleda u toku godinu dana (P1, P2, P3 i P4). Tokom jednogodišnjeg ispitivanja zabeležen je kontinuiran trend porasta homocisteina u krvi. Tokom prva četiri meseca (P1-P2) utvrđen je prosečan porast koncentracija homocisteina za 0.9 $\mu\text{mol/L}$ ali bez statističke značajnosti ($p=0.139$). Studije koje su se bavile promenom nivoa homocisteina u kraćim vremenskim intervalima utvrdile su takođe nesignifikantni porast plazmatskih koncentracija homocisteina [86].

Tek nakon osam meseci (P3) primene metformina utvrđen je na granici statističke značajnosti porast nivoa homocisteina ($p=0.036$). U literaturi nisu opisani slični rezultati, do sada. Značajan statistički porast koncentracija homocisteina u plazmi registruje se nakon godinu dana primene metformina (medijana i IQR u P1: 9.95 $\mu\text{mol/L}$ (8.80-12.30) vs. P4: 12.10 $\mu\text{mol/L}$ (10.00-14.00); $p=0.000$). Izražen u procentima, tokom godinu dana primene 2000 miligrama metformina na dan, utvrđen je porast vrednosti homocisteina za 21.5 %. Nešto viši procenat porasta je registrovan u toku kliničkog ispitivanja koje je trajalo duže od godinu dana (više od četiri godine) (26 %) [42, 86]. S druge strane, objavljena je studija u kojoj nije utvrđen statistički značajan porast homocisteina nakon i višegodišnje primene

metformina [127]. Oprečni rezultati u literaturi bi se mogli objasniti činjenicom da su ispitanici bili izloženi različitim, dnevnim dozama metformina, zatim da je vremenski interval u kojem je posmatrana promena homocisteina bio različite dužine, kao i da nivoi homocisteina nisu zavisni isključivo od statusa vitamina B12.

Jedan od razloga za promenu vrednosti homocisteina u krvi bi se mogao sadržati i u činjenici da je ispitivanje sprovedeno na pacijentima obolelim od T2DM-a. Poznato je da T2DM pacijenti mogu imati normalne vrednosti homocisteina u krvi. Dokle god T2DM nije praćen i dijabetesnom nefropatijom, koncentracije homocisteina su značajno niže u odnosu na grupu nedijabetičnih ispitanika [117, 128]. Potencijalni mehanizmi kojim se objašnjavaju niže vrednosti homocisteina u krvi jesu perzistentna hiperglikemija koja dovodi do povećanja aktivnosti enzima transulfuracije ali i glomerularna hiperfiltracija, koja je karakteristična za početnu fazu dijabetesne nefropatije u sklopu T2DM. Tokom jednogodišnje terapije T2DM metforminom doslo je do značajne redukcije vrednosti glukoze krvi, koja bi onda posledično mogla smanjiti aktivaciju enzima transulfuracije u ciljnim ćelijama.

S druge strane poznato je da su vrednosti vitamina B6, neophodnog u procesu transulfuracije homocisteina, značajno niže kod novootkrivenih pacijenata obolelih od T2DM-a [129].

Takođe, dokazano je da se sa poboljšanjem metaboličke kontrole T2DM-a smanjuje i intenzitet glomerularne hiperfiltracije što bi moglo doprineti povećanju urinarne eliminacije homocisteina [130]. U toku trajanja ove studije nisu utvrđene promene u procenjenoj vrednosti jačine glomerulske filtracije (primenjena je formula MDRD; 89.07 ± 23.93 vs 90.27 ± 25.99 ml/min/1.73 m²; p=0.612). Kako je bubrežna eliminacija jedan od

determinišućih faktora plazmatske koncentracije homocisteina, određivani aktuelni nivoi homocisteina su, najvećim delom, bili odraz metaboličkog statusa vitamina B12 u ćelijama.

Na osnovu rezultata regresionog modela na panel podacima, utvrđeno je da su vrednosti ukupnog vitamina B12, folne kiseline kao i vremenskog intervala od poslednja četiri meseca (P3-P4) značajni faktori u predikciji vrednosti homocisteina. Veoma je bitno napomenuti da u navedenom regresionom modelu vitamin B12 aktiv nije imao statistički značajnu predikciju nivoa homocisteina, što jasno ukazuje da u odnosu na ukupni vitamin B12 ima manju dijagnostičku vrednost u proceni metaboličke aktivnosti vitamina B12 u ćeliji, odnosno intracelularnog nivoa vitamina B12.

Pošavši od činjenice da na aktuelni nivo homocisteina u krvi utiče i status folata, ispitivanjem je sprovedeno, istovremeno, i praćenje koncentracija folne kiseline tokom četiri, osam i dvanaest meseci primene metformina (P1, P2, P3 i P4). Tokom trajanja ispitivanja, svi ispitanici su imali vrednosti folne kiseline u krvi unutar referentnog intervala, bez i jednog slučaja registrovanog deficita folne kiseline. Takođe, u toku ispitivanja vrednosti folne kiseline su redukovane, ali bez statističke značajnosti ($X \pm SD$ u P1: 17.28 ± 8.26 nmol/L vs. P4: 15.35 ± 7.76 nmol/L; $p=0.546$), što je u saglasnosti s do sada objavljenim rezultatima [42].

Poznato je da je glavna cirkulišuća forma folne kiseline (tetrahidrofolat) biološki neaktivna i predstavlja supstrat za formiranje metil-tetrahidrofolata. Osnovni preduslovi za adekvatnu unutarćelijsku metaboličku aktivnost folne kiseline su: zadovoljavajući nivoi tetrahidrofolata u krvi, prisustvo i ekspresija folatnih transporteta kao i receptora na ciljnim ćelijama, ali i adekvatni nivoi vitamina B12 u ćelijama. Jedino u prisustvu metilkobalamina u ćelijama,

tetrahidrofolat prelazi u metil-tetrahidrofolat, metabolički aktivnu formu folne kiseline, neophodnu u procesu sinteze DNK [131]. Na osnovu navedene činjenice o direktnoj metaboličkoj zavisnosti folne kiseline od kobalamina kao i zadovoljavajućih cirkulišućih nivoa folne kiseline (što jeste slučaj u ovoj studiji, iako Srbija ne pripada državama u kojima je sprovedena sistemska fortifikacija namirnica folnom kiselinom) smatra se da je vitamin B12 značajan faktor determinacije nivoa homocisteina [132]. U odsustvu vitamina B12 dolazi do unutarćelijske akumulacije homocisteina, te posledičnog rasta i njegove plazmatske koncentracije [133].

Uslovljena metforminskom terapijom ili ne, hiperhomocisteinemija predstavlja nezavisan riziko-faktor za nastanak: kardio-vaskularnih, cerebro-vaskularnih akcidenata kao i duboke venske tromboze [134, 135], naročito u populaciji obolelih od T2DM-a. Takođe, visoke koncentracije homocisteina u krvi su povezane s povišenim rizikom za razvoj hroničnih komplikacija dijabetesa [136]. Prema rezultatima meta-analize iz 2014. godine, pacijenti oboleli od T2DM-a imaju 93 % viši rizik za razvoj dijabetesne retinopatije [137], kao i povišen rizik za nastanak edema žute mrlje [138]. Jedan od prvih opisanih slučajeva duboke venske tromboze usled metforminom indukovane hiperhomocisteinemije datira iz 2007. godine [132].

Zbog mogućih posledica hiperhomocisteinemije, indukovane terapijom, analizirane su vrednosti homocisteina u zavisnosti od koncentracija ukupnog vitamina B12 i B12 aktiva. Ispitanici su podeljeni u tri podgrupe, u zavisnosti od vrednosti koncentracija ukupnog vitamina B12. Prva podgrupa s vrednošću B12 nižom od 150.0 pmol/L; druga s granično niskim vrednostima u rasponu od 150.0-220.0 pmol/L i treća, s vrednošću iznad 220.0 pmol/L. Tom prilikom utvrđeno je da su vrednosti homocisteina bile statistički značajno

najviše u podgrupi ispitanika s biohemijskim deficitom vitamina B12, tokom sva četiri pregleda ($p=0.040$ - $p=0.000$). Ispitanici s granično niskim vrednostima ukupnog B12 (150.0-220.0 pmol/L) su imali nivoe homocisteina u rasponu prosečnih vrednosti od 11.0 do 12.1 $\mu\text{mol/L}$. Navedene vrednosti homocisteina su se kretale unutar definisanog referentnog opsega i nisu se statistički značajno razlikovale od vrednosti utvrđenih kod ispitanika s poželjnim vrednostima B12 (iznad 220.0 pmol/L). Međutim, prema literaturnim podacima, već vrednosti homocisteina iznad 10.0 $\mu\text{mol/L}$ smatraju se visoko-rizično povišenim i nose viši rizik za nastanak koronarne, arterijske bolesti [136]. Vrednosti homocisteina iznad 10.4 $\mu\text{mol/L}$ za žene, odnosno 11.4 $\mu\text{mol/L}$ za muškarce smatraju granično visokim i prema preporuci, razmatraju opciju neophodnosti suplementacije vitaminom B12 [133].

Kada je u pitanju B12 aktiv, podela je izvršena na osnovu cut-off vrednosti od 35.0 pmol/L na dve podgrupe. U trenutku započinjanja ispitivanja (P1) nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima homocisteina između te dve podgrupe ($p=0.165$). Nakon četiri, osam i dvanaest meseci od momenta početka upotrebe metformina, ispitanici s deficitom vitamina B12 (B12 aktiv < 35.0 pmol/L) su imali značajno više više vrednosti homocisteina u odnosu na ispitanike s vrednostima B12 aktiva višim od 35 pmol/L ($p<0.05$).

Daljim analiziranjem, posmatrana je interakcija između ukupnog vitamina B12 kao i B12 aktiva sa homocisteinom. Utvrđena je statistički značajna interakcija između oba parametra vitamina B12 i homocisteina, kao parametara posmatranih u vremenu ($p=0.000$). U toku jednogodišnjeg ispitivanja posmatrani padovi u vrednostima ukupnog B12 i B12 aktiva su značajno uticali na porast homocisteina. Iako je tokom godinu dana ispitivanja kontinuiran pad ukupnog vitamina B12 i B12 aktiva doprineo kontinuiranom porastu vrednosti

homocisteina u krvi, statistički značajan porast koncentracija homocisteina je utvrđen tek nakon osam meseci kontinuirane upotrebe metforminskog preparata.

Prema navedenim rezultatima, jedini posmatrani pokazatelj unutarćelijskog metabolizma vitamina B12 koji se značajno povećao usled sniženja vitamina B12 u vanćelijskom prostoru, je homocistein. S obzirom da je navedeni porast registrovan tek nakon osam meseci primene metformina, nameće se ideja o mogućem odloženom, neželjenom dejstvu navedenog leka te posledični uticaj na porast nivoa homocisteina u krvi. Ukoliko pođemo od pretpostavke da metformin istovremeno blokira apsorpciju vitamina B12 u gastrointestinalnom traktu kao i raspoloživost iz postojećih, tkivnih rezervi, zatečene količine ovog vitamina u ciljnim ćelijama se postepeno troše, rezultujući kritičnom snižavanju intracelularnog nivoa metabolički aktivnih oblika kobalamina. Direktna posledica navedenog procesa jeste porast i akumulacija odgovarajućih metaboličkih produkata kako metilmalonične kiseline (MMA), tako i homocisteina. Osnovni nedostatak ove studije jeste laboratorijsko određivanje i kontinuirano praćenje koncentracija metilmalonične kiseline, koja se smatra senzitivnijim i pre svega, visoko specifičnim markerom intracelularnog metaboličkog statusa kobalamina. Zametnost metodologije i nedostatak odgovarajuće opreme jeste bio osnovni razlog zbog kojih nije sprovedeno određivanje metilmalonične kiseline. S obzirom da je produkcija metilmalonične kiseline isključivo zavisna od prisustva optimalnih koncentracija kobalamina u ćelijama, za očekivati bi bilo izraženije i brže promene navedenog parametra, u odnosu na homocistein.

Od momenta uvođenja metformina u terapiju T2DM-a pa do momenta ispoljavanja prvih, diskretnih, metaboličkih manifestacija deficita vitamina B12, prošlo je osam meseci. Ovo ukazuje da tih osam meseci predstavljaju latentni period tokom kojih je u efektivnim

ćelijama početna količina vitamina B12 redukovana na nivo ovog vitamina, koji ne može adekvatno da vrši metabolisanje homocisteina.

5.8. POTENCIJALNI MEHANIZMI METFORMINOM INDUKOVANE REDUKCIJE VITAMINA B12

Tokom jednogodišnje, primene metformina, utvrđen je kontinuiran trend pada prosečnih vrednosti ukupnog vitamina B12 i B12 aktiva, u vanćelijskom prostoru. Ukupni vitamin B12 predstavlja biohemijski pokazatelj ukupnih aktuelnih koncentracija kobalamina u krvi, kako onog dela vezanog za transkobalamin tako i kobalamina vezanog za haptokorin. Na osnovu podataka iz literature, kontinuiran trend pada koncentracija vitamina B12 u krvi, u toku terapije metforminom, objašnjava se mogućim kompetitivnim mehanizmom metformina na kalcijum-vezujuća mesta na nivou enterocita, blokirajući proces apsorpcije kobalamina na nivou terminalnog ileuma [107].

Vitamin B12 iz hrane se oslobađa od belančevinastih struktura, zahvaljujući hlorovodoničnoj kiselini u želucu. Zatim se slobodni vitamin B12 veže za haptokorin, poreklom iz salive i transportuje do dvanaestopalačnog creva gde se pod uticajem proteoliznih enzima pankreasnog soka odvaja od haptokorina. Nakon toga se formira kompleks kobalamina sa unutrašnjim činiocem (IF). Ovaj kompleks, Cbl-IF se putem crevnog sadržaja transportuje a zatim i vezuje za receptorski kompleks CUBAM (CUBILIN + AMN) na ćelijskim membranama terminalnog ileuma. Nakon internalizacije receptorskog (CUBILIN +AMN) i ligandskog kompleksa (Cbl-IF) u enterocit, IF se u ćeliji razgrađuje, receptorski kompleks se iz endozoma translocira na luminalnu membranu enterocita, a slobodni kobalamin se vezuje za transportni protein transkobalamin II. Blokirajuće dejstvo metformina na nivou receptorskog sistema na membrani enterocita, smanjuje stepen internalizacije vitamina B12 u

enterocit i na taj način doprinosi neposrednoj redukciji B12 aktiva (holotranskobalamina) u portnoj, a zatim i u sistenskoj cirkulaciji. Kako je holotranskobalamin deo ukupne koncentracije cirkulišućeg vitamina B12, terapijska primena metformina navedenim mehanizmom kompromitovane apsorpcije vitamina B12 dovodi do redukcije ukupnog vitamina B12 u krvi.

Međutim, rezultati ovog, ali i brojnih drugih ispitivanja su pokazali jasnu i izraženu redukciju oba parametra (ukupni i B12 aktiv), nakon samo četiri meseca ispitivanja [107, 118]. Budući da u organizmu postoje velike rezerve kobalamina dovoljne za podmirivanje potreba organizma za vitaminom B12 u toku nekoliko godina, registrovani signifikantni pad nivoa vitamina B12 u krvi već nakon nekoliko meseci najverovatnije se ne bi mogao objasniti samo metformin posredovanom blokadom apsorpcije kobalamina u terminalnom ileumu. Ovi podaci ukazuju na postojanje bar još jednog ili više dodatnih amplificirajućih efekata metformina na metabolizam vitamina B12 u cirkulaciji i relativno brzo snižavanje koncentracija ovog vitamina u krvi, u toku sprovođenja terapije metforminom.

Postojanje jasnih dokaza o prisustvu haptokorina u portnoj cirkulaciji, ukazuju da hepatociti preuzimaju deo kobalamina i njegovih analoga putem dve vrste različitih receptora: TC II-R i asijaloglikoproteinskih receptora. Unutar hepatocita, kobalamin se odvaja od svojih transportnih proteina i transformiše u aktivne forme koenzima (holotranskobalmin) ili se ponovo sekretuju putem žuči u gastrointestinalni trakt (holotranshaptokorini). Formirane rezerve u jetri predstavljaju jedan od osnovnih preduslova za nesmetanu entero-hepatičnu recirkulaciju vitamina B12. U uslovima povećanih potreba za biološki raspoloživim kobalaminom, kompenzatorno se povećava intenzitet mobilizacije vitamina B12 iz rezervi (vezanog za haptokorin) i njegov transport putem žuči u tanko crevo. Na taj način se

obezbeđuje supstrat za formiranje kompleksa Cbl-IF, ponovnu apsorpciju vitamina B12 i produkciju holotranskobalamina (mehanizam povratne sprege).

Pored tkivnih rezervi, za intaktnost hepato-enteralne recirkulacije, neophodni su i drugi preduslovi, poput: očuvane sinteze i lučenja žuči u tanko crevo kao i prisustva unutrašnjeg činioca [114]. Prema tome, stepen produkcije holotranskobalamina u okviru hepato-enteralne recirkulacije u enterocitima može zavisiti od: prisutnih rezervi ovog vitamina u jetri, fiziološkom protoku žuči kao i nivoa raspoloživog unutrašnjeg činioca u lumenu tankog creva [114]. Kako ovim ispitivanjem nisu obuhvaćeni pacijenti s narušenom produkcijom unutrašnjeg činioca, niti pacijenti s izmenjenom sintezom i sekrecijom žuči, insuficijencija hepato-enteralne recirkulacije kobalamina, najverovatnije je posledica poremećaja na nivou tkivnih rezervi i/ili apsorpcije B12 u terminalnom ileumu.

Pri razmatranju mehanizma posredstvom koga terapija metforminom dovodi do redukcije biološki aktivnog holotranskobalamina, ali i ukupnog, odnosno rezervnog vitamina B12 vezanog za haptokorin u cirkulaciji, mora se svakako uzeti u obzir i hepato-enteralna recirkulacija kobalamina. Smatra se da recirkulacija vitamina B12 predstavlja veoma značajan mehanizam održavanja homeostaze ovog vitamina u organizmu. Prema dosadašnjim saznanjima iz hepatocita, kao rezervoara vitamina B12, se u žuč izlučuje vitamin B12 pretežno vezan za haptokorin i nakon prispeća u dvanaestopalačno crevo, podleže svim metaboličkim putevima kao i vitamin B12 unešen u organizam putem hrane. S obzirom da je kod pacijenata tretiranih metforminom blokirana apsorpcija vitamina B12 u terminalnom ileumu, efekat hepato-enteralne recirkulacije će umesto korigovanja hipovitaminoze B12 imati sasvim suprotan ishod u smislu amplifikacije i produbljivanja deficita kobalamina. Da bi ova hipoteza bila tačna, korekcija hipovitaminoze B12 na račun

rezervnog odeljka vitamina B12 (prvenstveno u hepatocitima) morala bi se vršiti isključivo preko hepato-enteralne recirkulacije ovog vitamina. Egzaktni dokazi da metformin samo blokiranjem preuzimanja kobalamina u terminalnom ileumu dovodi do deficita vitamina B12, bio bi snižavanje rezervi ovog vitamina u jetri. Međutim, do sada nema podataka da se u toku terapije metforminom dešava pražnjenje depoa vitamina B12 u jetri. Naprotiv, postoje rezultati eksperimentalnih istraživanja na animalnim modelima, koji ukazuju da je saturacija hepatocita vitaminom B12 u toku terapije metforminom na visokom nivou ili čak povišena.

Pored toga, mora se imati u vidu činjenica da, mnogi podaci za razumevanje veoma složenog sistema metabolisanja i regulisanja homeostaze kobalamina u organizmu, do sada nisu poznati. Tako, ni danas se ne zna u kojim se sve ćelijama produkuje haptokorin (pljuvačne žlezde, jetra...); kakav je odnos između haptokorina u cirkulaciji i hepatocitima; da li i šta definiše nivoe interakcije između haptokorina i transkobalamina II; gde se vrši vezivanje slobodnog kobalamina za transkobalamin II (u ćeliji ili u vanćelijskoj tečnosti, ili u oba prostora). Ovo su sve izuzetno važne činjenice za razumevanje i detekciju dominantnih patofizioloških mehanizama narušavanja homeostaze vitamina B12 pri dugotrajnoj terapijskoj primeni metformina.

Fenomen akumuliranih i zarobljenih rezervi kobalamina na nivou ćelija uočen je pri istraživanjima koja su se bavila proučavanjem transportnog mehanizma kobalamina kod prokariotskih organizama. Naime, Beedholm-Ebsen i saradnici su došli na ideju da takav mehanizam može biti prisutan i kod viših organizama. Rezultati njihove eksperimentalne studije na miševima su ukazali na postojanje povezanosti između ekspresije ABCC1 gena koji kodira sintezu multidrug rezistentnog proteina-1 (MRP-1 ili ABCC1) i efluksa vitamina B12, iz enterocita, alii i drugih ćelija. Navedeni MRP-1 pripada grupi ATP vezujućih,

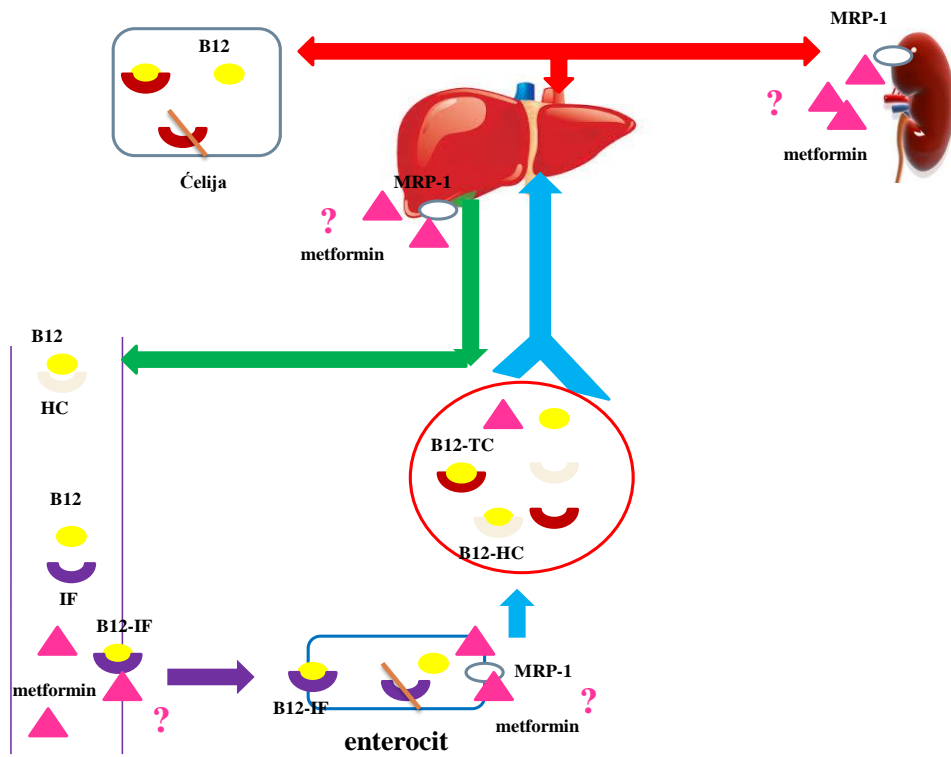
kasetnih, transportnih proteina koji učestvuje u efluksu slobodnog kobalamina kroz ćelijsku membranu [143]. Naime, smatra se da prisustvo MRP-1 na bazolateralnoj membrani enterocita omogućava alternativni put izlaska kobalamina iz enterocita [144]. Takođe, prisustvo ovog transportnog proteina je dokazano i na nivou proksimalnih, tubulskih ćelija bubrega i hepatocita. Upravo kod miševa bez ABCC1 gena utvrđen je poremećaj homeostaze kobalamina, te posledično snižene koncentracije ovog vitamina u proksimalnim tubulocitima, a istovremeno povišen nivo u enterocitima. Na eksperimentalnom modelu na miševima bez MRP-1 na nivou jetre, dokazana je značajno niža koncentracija vitamina B12 u ekstracelularnom prostoru (25 % niža u odnosu na miševe koji su imali ekspresiju MRP-1 na ćelijskoj membrani). Da je navedeni transportni protein povezan s homeostazom vitamina B12, govore rezultati studija u kojima je dokazana povišena ekspresija MRP-1 na nivou hemato-encefalne barijere kao i membrane eritrocita kod pacijenata s razvijenim hematološkim i/ili neurološkim simptomima deficita vitamina B12 [145]. Pod pretpostavkom postojanja ovog transportnog sistema i na nivou humanih hepatocita, kontinuirana primena metformina bi mogla uticati na izmenjenu ekspresiju ili aktivnost MRP-1, kao i smanjeni efluks kobalamina, te posledično, smanjenje i koncentracija ukupnog vitamina B12, ali i B12 aktiva u krvi.

Pored toga rezultati eksperimentalne studije na pacovima su doveli u međusobnu vezu primenu metformina i povećanu akumulaciju vitamina B12 u jetri. Nakon svega tri nedelje kontinuirane upotrebe metforminskog preparata, registrovan je porast koncentracije vitamina B12 u jetri za 36 % [95]. Rezultati nekih kliničkih ispitivanja ukazuju na činjenicu da metformin povećava intraćelijsku koncentraciju vitamina B12 i njegovu intracelularnu metaboličku aktivnost u grupi obolelih od T2DM-a [117]. U navedenoj studiji, T2DM

ispitanici na metforminskoj terapiji su imali više vrednosti odnosa: vitamina B12 i B12 aktiva u eritrocitima, kao i statistički značajno viši indeks metilacije (odnos tj. količnik s-adenozilmetionina i s-adenozilhomocisteina) [117].

Navedeni dokazi o akumulaciji kobalamina u ćelijama rezervnog odeljka, mogu biti polazna osnova za razmatranje postojanja jednog od dodatnih mogućih mehanizama redukcije nivoa vitamina B12 u krvi, kao posledice terapijske primene metformina. Imajući u vidu velike višegodišnje fiziološke rezerve vitamina B12 u jetri i relativno brz i značajan pad nivoa ovog vitamina u krvi nakon uvođenja terapije metforminom, može ukazivati da je hepato-enteralna recirkulacija kobalamina ovim farmakološkim sredstvom kompromitovana, ne samo na nivou apsorpcije u terminalnom ileumu, nego i blokiranjem rezervi kobalamina u hepatocitima. Ne isključuje se ni mogućnost metforminom indukovane blokade drugih, alternativnih puteva korekcije hipovitaminoze B12 na račun rezervnog odeljka kobalamina u organizmu (shema 8).

Shema 8: Mogući mehanizmi delovanja metformina na status vitamina B12 u cirkulaciji



5.9. METFORMIN I BIOHEMIJSKI POKAZATELJI ENERGETSKOG METABOLIZMA

Metformin predstavlja prvi lek izbora u medikamentnoj terapiji T2DM-a. Zbog specifičnog mehanizma dejstva, metformin se preporučuje i u situacijama blažih oblika poremećaja metabolizma glukoze (povišena glikemija našte, smanjena glikozna tolerancija) ukoliko istovremeno postoji udruženost još jednog riziko-faktora poput: gojaznosti ($ITM \geq 35.0 \text{ kg/m}^2$); pozitivne porodične anamneze za T2DM, hipertrigliceridemije, niskih vrednosti HDL-holesterola, dijagnostikovane hipertenzije ili vrednosti HbA1c više od 6 % (43 mmol/mol) [146].

Tokom jednogodišnjeg ispitivanja, praćen je efekat metformina na mehanizam glikoregulacije, kroz kontinuirano praćenje sledećih parametara: koncentracija HbA1c-a, bazalne glikemije i insulinemije, tokom sva četiri pregleda.

Nakon samo četiri meseca primene metforminske terapije registrovan je statistički značajan pad vrednosti HbA1c-a (medijana i IQR u P1: 49.94 mmol/mol (42.82-66.96) vs. P2: 43.98 mmol/mol (40.12-54.43); $p=0.001$). Tokom jednogodišnje primene metforminske terapije, vrednosti HbA1c su značajno redukovane (medijana i IQR u P1: 49.94 mmol/mol (42.82-66.96) vs. P4: 43.27 mmol/mol (39.43-53.57); $p=0.000$).

Prema sličnom obrascu su se kretale i vrednosti bazalne glikemije. Već nakon prva četiri meseca utvrđen je statistički značajan pad koncentracija bazalne glikemije (8.40 mmol/L (7.00-10.50) vs. P2: 7.40 mmol/L (6.80-9.20); $p=0.005$). Tokom drugog i trećeg, vrednosti glikemije u bazalnim uslovima se nisu značajno razlikovale od vrednosti izmerenih nakon

prvog, četvoromesečnog intervala (medijana i IQR u P3: 7.60 mmol/L (6.80-9.00) vs. P4: 7.30 mmol/L (6.80-8.50)).

Tokom godinu dana primene dnevne doze metformina od 2000 miligrama utvrđene su statistički značajne redukcije u vrednostima bazalne glikemije, insulinemije kao i gliciranog hemoglobina A1c. Poželjan hipoglikemijski efekat koji je postignut već nakon prva četiri meseca kontinuirane primene metformina je u skladu s dosadašnjim rezultatima sličnih ispitivanja [147]. Metformin ostvaruje hipoglikemijski efekat inhibišući proces glukoneogeneze u jetri, zatim smanjujući stepen apsorpcije glukoze na nivou intestinalnog trakta te povećavajući preuzimanje glukoze od strane ciljnih ćelija mišićnog i masnog tkiva [15, 148]. Takođe, novija ispitivanja govore i o antagonističkom dejstvu na glukagon ali i o interakciji na nivou inkretinske osovine, poboljšavajući aktivnost GLP-1 [33, 149].

Ova studija je obuhvatila i praćenje vrednosti izračunatih indeksa koji procenjuju stepen insulinske rezistencije i/ili senzitivnosti: HOMA-IR, HOMA-S i McAuley indeksa. Tokom jednogodišnjeg ispitivanja, utvrđen je statistički značajan pad vrednosti HOMA-IR ($p=0.000$), kao i porast HOMA-S ($p=0.001$) i McAuley indeksa ($p=0.000$).

U momentu započinjanja ispitivanja, vrednosti medijane HOMA-IR indeksa su iznosile 2.52. Na osnovu gornje cut-off vrednosti za nedijabetičnu populaciju Vojvodine (HOMA-IR > 2.0) [101], povišenu insulinsku rezistenciju je nakon godinu dana primene metformina imalo 34 % ispitanika.

HOMA-S i McAuley predstavljaju indekse za procenu osetljivosti perifernih tkiva na insulin, s tim da McAuley indeks u svoju formulu uključuje bazalne vrednosti insulina i triglicerida, ukazujući na vezu između metabolizma masti i ugljenih hidrata. Tokom jednogodišnje

studije, vrednosti indeksa za procenu insulinske senzitivnosti su kontinuirano rasle. Između ostalog, primena metformina u terapiji T2DM-a doprinosi povećanju insulinske senzitivnosti poboljšavajući tirozin-kinaznu aktivnost insulinskih receptora, aktivnost i mobilnost GLUT4 transportera kao i stimulišući glikogenogenezu [148, 150]. S druge strane, metformin na nivou masnog tkiva doprinosi povećanju procesa re-esterifikacije masnih kiselina i inhibiciji lipolize, poboljšavajući perifernu insulinsku osetljivost [150, 151].

Gojaznost i dispidemija su veoma usko povezani s T2DM. Većina pacijenata sa T2DM-om pripadaju kategoriji: predgojaznih, odnosno I stepenu gojaznosti, prema kriterijumu ITM-a Svetske Zdravstvene Organizacije [152]. Prema literaturnim podacima, 75 % do 86 % T2DM pacijenata je predgojazno [151, 152]. U zavisnosti od karakteristika posmatranih populacija, jedna trećina do jedna polovina obolelih od T2DM-a je gojazno [153, 154].

Prema rezultatima randomiziranih, kontrolisanih studija, efekat metformina na telesnu masu se značajno razlikuje. Prema UKPDS studiji, metformin ne doprinosi značajnom porastu telesne mase u odnosu na druge hipoglikemijske agense (glibenklamid, derivati sulfonilureje) [16]. S druge strane, rezultati četvorogodišnje studije su pokazali redukciju u telesnoj masi kod T2DM pacijenata lečenih metforminom a u odnosu na druge monoterapijske opcije (glibenklamid i rosglitazon) [155].

Pre momenta započinjanja ispitivanja, srednja vrednost ITM-a je iznosila 31.19 kg/m². Tokom godinu dana primene metformina nije došlo do statistički značajne promene u vrednostima telesne mase kao i ITM-a. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa do sada objavljenim rezultatima [156, 157]. Gledano u apsolutnim vrednostima, prosečna telesna masa je, tokom godinu dana ispitivanja, redukovana sa 94.69 kg na 91.30 kg. S druge strane, metformin bi

mogao biti intenzivniji reduktor telesne mase u slučajevima da se radi o pacijentima s većom vrednošću ITM-a, te većim stepenom insulinske rezistencije (svi ispitanici u ovoj studiji su pripadali kategoriji: normalno uhranjenih, predgojaznih i gojaznih I stepena (ITM: 25-34.9 kg/m²), s prosečnom vrednošću HOMA-IR od 2.52).

Pored uticaja na telesnu masu, metformin bi mogao biti odgovoran i za promenu u telesnoj kompoziciji, redistribuirajući masno tkivo od visceralnog ka subkutanom [156, 158]. Tokom jednogodišnjeg ispitivanja, utvrđen je pad izračunate vrednosti procenta masne mase kao i odnosa struk / kuk, ali bez statističke značajnosti (Fat %, p=0.988; WHR, p=1.000). Rezultati randomiziranih studija ukazuju na značajnu redukciju visceralnog, masnog tkiva, nakon 6.5 meseci primene metformina u odnosu na kontrolnu grupu, odnosno grupu s drugim oralnim hipoglikemikom [159].

Međutim, utvrđen je statistički značajan pad vrednosti indeksa visceralne adipoznosti (p=0.002) kao i indeksa lipidne akumulacije (p=0.028), na osnovu kojeg bi se moglo zaključiti i o još jednom, potencijalnom benefitu metforminske terapije.

Poznato je da metformin poboljšava metabolizam masti, snižavajući stepen masne steatoze na nivou hepatocita glodara [160]. Slični rezultati su potvrđeni i u kliničkim ispitivanjima, na ljudima [161]. Međutim, relativno skorašnja klinička ispitivanja ukazala su na potencijalan benefit koji metformin ima i na nivo cirkulišućih lipidskih materija [162]. S obzirom da ispitanici nisu bili na terapiji oralnim hipolipemicima, tokom jednogodišnje studije, praćeni su i parametri lipidnog statusa u sve četiri tačke pregleda. Registovan je statistički značajan pad koncentracija triglicerida (p=0.040) što je u saglasnosti sa do sada objavljenim rezultatima [162]. Jedan od potencijalnih mehanizama koji objašnjava ovakav

hipotrigliceridni efekat na animalnim modelima jeste selektivno preuzimanje VLDL čestica i oksidacija masnih kiselina u mrkom masnom tkivu [163]. Stimulisana je oksidacija masnih kiselina i inhibisana lipogeneza u tkivima usled metformin indukovane, povećane aktivnosti AMPK (AMP-protein kinaza) [164]. Naime, fosforilacija i aktivacija AMPK ima ključnu ulogu u regulaciji aktivnosti tri različita enzimska sistema, odgovornih za metabolizam lipida u jetri. Prvo, inhibicijom acetylCoA karboksilaze je smanjena produkcija MalonilCoA, a samim tim i produkcija masnih kiselina i VLDL čestica u jetri, a zatim redukcijom ekspresije i aktivnosti SREBP-1. Navedena dva mehanizma su dominantna u regulaciji produkcije masnih kiselina, VLDL čestica, a samim tim i nivoa triglicerida u krvi. Dokazano je da navedenim mehanizmima može doći do redukcije vrednosti triglicerida u krvi za u proseku 10-tak procenata, u zavisnosti od primenjene doze i dužine ekspozicije metforminu [165]. Prema rezultatima ove studije, dokazan je prosečan pad nivoa triglicerida za 15.6 %, tokom jednogodišnje primene metformina.

Prema rezultatima ove studije, uvrđen je statistički značajan porast HDL- holesterola (medijana i IQR: 1.09 mmol/L (0.84-1.43) vs 1.10 mmol/L (0.95-1.55); $p=0.006$) tokom godinu dana ispitivanja. Takođe, utvrđen je i pad ukupnog holesterola (medijana i IQR: 5.60 mmol/L (4.93-6.74) vs 5.43 mmol/L (4.80-6.02); $p=0.232$) i LDL- holesterola ($X\pm SD$: 3.46 ± 1.08 mmol/L vs 3.36 ± 0.91 mmol/L; $p=1.000$), ali bez statističke značajnosti. Gledano u procentima, prosečne vrednosti ukupnog kao i LDL holesterola su redukovane za 3 %. U zavisnosti od dužine ekspozicije kao i primenjene dnevne doze metformina, redukcija nivoa ukupnog kao i LDL holesterola je varirala i može se kretati u rasponu od 10-15 %. Jedan od mehanizama koji objašnjava ovaj snižavajući efekat metformina povezan je s smanjenjem

aktivnosti enzima HMGCoA reduktaze (3-hidroksi-3-metil-glutaril CoA reduktaza), čime je redukovana i sinteza holesterola [166].

Na osnovu navedenih podataka može se konstatovati da meformin doprinosi poboljšanju statusa lipidnog profila kod pacijenata s T2DM-a, i na taj način, dodatno smanjuje rizik od nepoželjnih, kardiovaskularnih komplikacija i akcidenata skopčanih s izraženom aterosklerozom.

5.10. PREPORUKE ZA LABORATORIJSKO PRAĆENJE I SUPLEMENTACIJU DEFICITA VITAMINA B12 KOD PACIJENATA S T2DM LEČENIH METFORMINOM

U zavisnosti od kriterijuma koji je primenjen, incidenca deficita vitamina B12 iznosi oko 20 % u opštoj populaciji [167, 168]. S druge strane, poznato je da primena određenih lekova može uticati na status vitamina B12. Prema literaturnim podacima, kontinuirana primena metformina dovodi do malapsorpcije ovog vitamina u 10 % - 30 % slučajeva pacijenata obolelih od T2DM-a [169-173]. Prema rezultatima ove studije, kontinuirana upotreba metformina tokom godinu (2000 miligrama na dan) je dovela do pada koncentracije ukupnog vitamina B12 kod 30 % ispitanika s T2DM-a.

Činjenica je da se početak upotrebe metformina, kao leka prvog izbora u terapiji T2DM-a, u značajnom delu, poklapa s životnom dobi u kojoj postoji povišen opšti rizik za nastanak deficita vitamina B12 (inicijalno, pacijenti starosti iznad 50 godina) [174]. Na osnovu podataka o postojanju opšteg rizika, predloženo je skrining testiranje nivoa kobalamina u krvi, jednom u 5 godina nakon navršenih 50 godina, odnosno jedamput godišnje nakon 65. godine života [174]. Međutim, uticajem metformina na apsorpcioni kapacitet i status vitamina B12, rizik za nastanak deficita ovog vitamina evidentno raste. Godine 2017. ADA je ukazala na postojanje povišenog rizika za nastanak deficita vitamina B12 kod T2DM-a a usled kontinuirane upotrebe metformina, tokom dužeg perioda. Zbog navedene činjenice, ukazana je potreba za eventualno praćenje cirkulišućeg oblika ovog vitamina i posledične supstitucione terapije kobalaminom [9]. Međutim, nisu definisane konkretne smernice.

Najznačajnije posledice deficita vitamina B12 su: megaloblasna anemija, periferna neuropatija i hiperhomocisteinemija. Iako se o navedenom, neželjenom efektu metformina zna još od sedamdesetih godina prošlog veka, slučajevi navedenih kliničkih manifestacija metforminom indukovanoj deficita kobalamina, u literaturi su opisani sa decenijskim zaostatom [175]. Tek 2010. godine je prvi put opisan slučaj periferne neuropatije nastale kao posledica metformin-indukovanim deficitom vitamina B12 [176]. S obzirom da su posledice deficita vitamina B12 u najvećem procentu reverzibilne, nameće se potreba za pravovremenim laboratorijskim skriningom odnosno, eventualnom suplementacijom ovog vitamina [177, 178]. Rezultati kliničkih ispitivanja koja su se bavila efikasnošću supstitucione terapije vitaminom B12 kod pacijenata s perifernom neuropatijom, su se pokazali oprečni [179, 180]. Quereshi i autori su ukazali na postojanje poboljšanja simptoma periferne neuropatije, nakon suplementacije vitaminom B12 [181]. S druge strane, studija iz 2016. godine govori u prilog odsustva poboljšanja stanja periferne neuropatije nakon supstitucione terapije vitaminom B12 [182].

S obzirom na postojanje dokaza o značajnom padu nivoa vitamina B12 već nakon kraćeg vremenskog intervala, postoje preporuke o neophodnom skriningu T2DM pacijenata na deficit vitamina B12, već nakon 3 meseca kontinuirane primene metformina [173]. S druge strane, ideja o godišnjem skriningu na deficit vitamina B12 datira još od 1970.-tih godina [175]. Imajući u vidu brojnost populacije T2DM pacijenata na metforminskoj terapiji kao i neadekvatnu opremljenost brojnih laboratorija i visoku cenu koštanja testova vitamin B12 eseja, navedena ideja je napuštena, pogotovo u nerazvijenim kao i zemljama u razvoju. Zbog navedenih činjenica, tokom 2018.godine definisana je i preporuka o godišnjoj, preventivnoj suplementaciji vitaminom B12 u dozi od 1 miligrama, parenteralno [175].

Na osnovu rezultata ove studije, za laboratorijsku procenu nivoa deficita vitamina B12 mogu se koristiti testovi određivanja ukupnog vitamina B12 i homocisteina i to na osnovu merenja koncentracija ovih parametara pre uvođenja metforminske terapije i godinu dana nakon toga. Pad ukupnog vitamina B12 odražava ekstracelularni nivo vitamina B12 a porast koncentracije homocisteina u trećem kvartalu jednogodišnje primene metformina ukazuje na intracelularni, metabolički deficit ovog vitamina. Ova dva dinamska testa se mogu smatrati ključnim laboratorijskim ispitivanjima u praćenju dinamike razvoja i stepena deficita vitamina B12. Prema dobijenim rezultatima ove studije, pored bazalnog određivanja ukupnog vitamina B12 i homocisteina, optimalno je merenje njihovih koncentracija 12 meseci nakon toga. U posmatranom vremenskom periodu se mora voditi računa da li je došlo do značajne redukcije bubrežne funkcije koja može bitno da povisi retenciju homocisteina i doprinese porastu njegovih koncentracija u krvi. Budući da se ispitivani laboratorijski parametri crvene loze nisu značajno menjali u toku jednogodišnje terapije metforminom, njihova primena u ranoj detekciji deficita vitamina B12 ne sadrži značajne dijagnostičke informacije i kao takve ih ne treba koristiti.

Na osnovu pethodno predloženog obrasca laboratorijskog praćenja parametara metabolizma vitamina B12 kod T2DM pacijenata lečenih metforminom, moglo bi se i diskutovati u pravcu smernica kao i konkretnijih preporuka o eventualnoj supstituciji ovim vitaminom. Navedena diskusija bi mogla imati nekoliko tački uporišta. Prvo, koji pacijenti bi bili direktni kandidati za supstitucionu terapiju, a koji za kontinuirano praćenje, kliničku i laboratorijsku evaluaciju statusa kobalamina u krvi. Drugo, koja primenjena forma vitamina B12 bi bila optimalan terapijski izbor, i treće, koji bi bio optimalan način same aplikacije kobalamina.

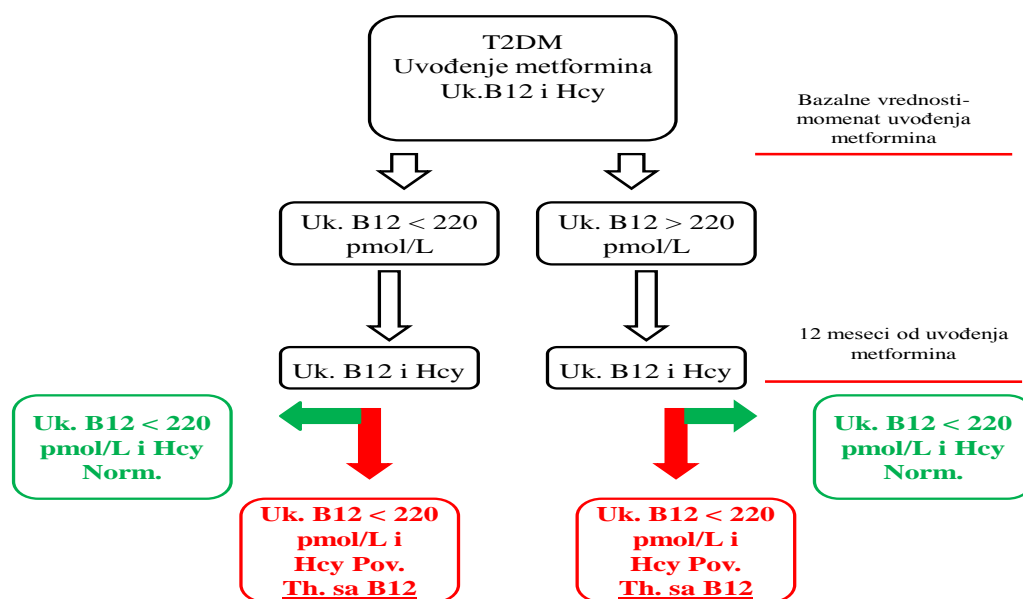
Na osnovu rezultata ispitivanja, kao i predloženog algoritma laboratorijskog praćenja vitamina B12, pacijenti koji bi imali vrednosti ukupnog vitamina B12 u krvi iznad granice poželjnih vrednosti (≥ 220 pmol/L), ne bi bili kandidati za suplementaciju ovim vitaminom. Međutim, pacijenti koji bi imali vrednosti kobalamina niže od graničnih, 220 pmol/L bi (granično niski i niski nivoi vitamina B12) mogli biti kandidati za eventualnu suplementaciju vitaminom B12, u zavisnosti od procenjenih laboratorijskih i eventualno kliničkih pokazatelja deficita metabolizma ovog vitamina. U toku ove studije nisu utvrđene hematološke promene, dok je u proceni subkliničkog deficita ovog vitamina jedini, relevantni indirektni parametar metaboličkog statusa vitamina B12, bio homocistein. Prema tome, ispitanici sa, istovremeno niskim ili granično niskim vrednostima ukupnog vitamina B12 i povišenim vrednostima homocisteina u krvi, bi mogli biti kandidati za supstituciju kobalaminskim preparatom (Shema 9).

Sam mehanizam koji dovodi do redukcije nivoa vitamina B12 u krvi kod T2DM pacijenata na metforminskoj terapiji nije jasno definisan. Pored, u literaturi, poznatog mehanizma inhibicije intestinalne apsorpcije vitamina B12, predpostavlja se i dodatni mehanizam metforminom indukovana blokadaefluksa kobalamina iz ćelija i zarobljavanje postojećih rezervi ovog vitamina u tkivnim rezervama, pre svega u hepatocitima. Zbog toga je poželjno u supstitucionoj terapiji primeniti farmake vitamina B12 na čiju farmakokinetiku ne utiču metabolički putevi vitamina B12 koji su blokirani metforminom. U supstituciji deficita vitamina B12 mogu se koristiti dve opcije, primena parenteralnih i peroralnih preparata vitamina B12. Parenteralnom primenom preparata vitamina B12 se zaobilazi dominantni put apsorpcije ovog vitamina na nivou terminalnog ileuma, ali i obezbeđuju adekvatne

koncentracije vitamina u samoj cirkulaciji, kao neophodan preduslov za postizanje optimalne koncentracije u ciljnim ćelijama.

U značajnom broju kliničkih vodiča za praćenje i lečenje deficita vitamina B12, kod kojih nije došlo do razvoja kliničke simptomatologije karakteristične za deficit ovog vitamina, daje se prednost supstitucionoj terapiji oralnim preparatima vitamina B12. Pre svega, ovaj vid terapije jeste komforniji i manje invazivan za samog pacijenta. Međutim, ono što se nameće kao pitanje jeste, da li je svrsishodno primenjivati oralne preparate vitamina B12 kod pacijenata kod kojih je kompromitovana apsorpcija usled primene metformina? Novija klinička ispitivanja su potvrdila alternativni, paracelularni mehanizam apsorpcije vitamina B12 pasivnim putem (oko 5 %). Nije u potpunosti izvesno da bi primena visokih, doza oralnih preparata vitamina B12 mogla obezbediti dnevne, optimalne koncentracije kobalamina u krvi i u ciljnim tkivima.

Shema 9: Predloženi dijagnostički algoritam metforminom indukovanoj deficita vitamina B12 kod pacijenata s T2DM-a



6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih i prikazanih rezultata istraživanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Tokom jednogodišnjeg ispitivanja, utvrđen je kontinuiran trend pada prosečnih vrednosti ukupnog vitamina B12. Za dvanaest meseci kontinuirane primene metforminskog preparata, utvrđena je redukcija vrednosti ukupnog vitamina B12 za 25.29 %. Ovi rezultati ukazuju da metformin putem poznatog mehanizma blokade kalcijum zavisanog procesa internalizacije vitamina B12 na nivou enterocita doprinosi kontinuiranom padu koncentracija ukupnog vitamina B12 u cirkulaciji. Ne isključuje se ni alternativni mehanizam metforminom izazvane blokade efluksa kobalamina iz celularnog, rezervnog odeljka.
2. Tokom jednogodišnjeg ispitivanja, u odnosu na ukupni vitamin B12 utvrđen je veoma sličan relativni intenzitet pada i kontinuirani trend sniženja prosečnih vrednosti B12-aktiva. Za dvanaest meseci primene metformina, utvrđena je redukcija vrednosti B12 aktiva za 23.26 %. Kompromitovana apsorpcija kobalamina na nivou terminalnog ileuma imala je za posledicu sniženje koncentracija B12 aktiva. Dodatni, amplificirajući efekat na pad vrednosti B12 aktiva, metformin bi mogao izvršiti i blokiranjem efluksa kobalamina iz postojećih tkivnih rezervi, pre svega iz jetre.
3. U toku jednogodišnjeg praćenja dinamike promena nivoa ukupnog vitamina B12 i holotranskobalamina, utvrđen je statistički značajan uticaj vremena na pad vrednosti ovih parametara. Ovaj podatak ukazuje da je duža primena metformina kod T2DM

- ispitanika direktno povezana sa povišenim rizikom od nastanka deficita vitamina B12.
4. Kontinuirani trend porasta vrednosti koncentracija homocisteina u krvi, s statistički značajnim porastom vrednosti homocisteina tek nakon osam meseci odnosno trećeg kvartala jednogodišnje primene metformina, pokazuje da se zatečene količine vitamina B12 u ciljnim ćelijama postepeno redukuju i troše, do nivoa vitamina B12 u ćelijama koji nije u mogućnosti adekvatno da metaboliše homocistein, što za posledicu ima akumulaciju homocisteina kako u ćelijskom, tako i u vanćelijskom prostoru. Zbog toga se prvih osam meseci ispitivanja može smatrati latentnim periodom ispoljavanja deficita vitamina B12 u ciljnim ćelijama, u kome se još ne detektuje metabolički deficit ovog vitamina.
 5. Modifikovana regresiona analiza je pokazala da ukupni vitamin B12 ima statistički značajnu predikciju homocisteina, ali ne i određivanje B12 aktiva. Ovaj podatak ukazuje da ukupni vitamin B12 kao dijagnostički test ima značajno višu dijagnostičku vrednost od određivanja holotranskobalamina u proceni porasta nivoa homocisteina, tokom terapije metforminom.
 6. U momentu započinjanja ispitivanja, biohemijski deficit ukupnog vitamina B12 je imalo 6 % ispitanika. Nakon godinu dana kontinuirane primene metforminskog preparata, kod 15 (30 %) ispitanika je utvrđen biohemijski deficit ukupnog vitamina B12.
 7. Korelacionom analizom panel podataka u toku jednogodišnje studije, utvrđena je statistički značajna interakcija homocisteina sa ukupnim vitaminom B12, odnosno holotranskobalaminom. Ova analiza ukazuje da je porast homocisteina posledica pada vitamina B12, a ne da su to dva slučajno registrovana trenda promena

- koncentracija vitamina B12 i homocisteina kod T2DM pacijenata na terapiji metforminom.
8. U trenutku započinjanja ispitivanja i uvođenja metforminske terapije, biohemijski deficit vitamina B12, na osnovu određivanja B12 aktiva (cut off od 35 pmol/L) je imalo 6 % ispitanika. Nakon godinu dana ispitivanja, taj procenat je iznosio 8 %.
 9. U toku jednogodišnjeg ispitivanja, nisu utvrđene statistički značajne promene u vrednostima parametara crvene krvne loze (broj eritrocita, hematokrit, koncentracija hemoglobina i MCV). Metforminom indukovani pad vrednosti vitamina B12 u krvi, tokom godinu dana, nije doveo do ispoljavanja hematoloških manifestacija deficita ovog vitamina. Postojeće rezerve u ćelijama su bile suficijentne, te nisu dovele do narušavanja fiziološke eritropoeze u toku ispitivanja.
 10. Svojim polivalentnim biološkim efektima u smislu inhibicije procesa glukoneogeneze u jetri, redukcije stepena apsorpcije glukoze na nivou intestinalnog trakta, povećavanja preuzimanje glukoze od strane ciljnih ćelija, ali i antagonističkim delovanjem na glukagon, kontinuirana jednogodišnja primena metformina ispoljila je poželjan metabolički efekat koji se ogleda u statistički značajnom padu bazalnih vrednosti glikemija, insulinemija kao i vrednosti HbA1c.
 11. U toku jednogodišnjeg ispitivanja, utvrđen je statistički značajan pad vrednosti indeksa za procenu insulinske rezistencije HOMA-IR. Nakon završetka ispitivanja, povišenu insulinsku rezistenciju imalo je samo 17 (34 %) ispitanika, u odnosu na početnih 33 (66 %). Značajna redukcija stepena insulinske rezistencije posledica je kontinuirane upotrebe metformina koji stimuliše glikogenogenezu, poboljšava tirozin-kinaznu aktivnost na nivou insulinskih receptora, kao i aktivnost i mobilnost GLUT4 transportera.

12. U toku jednogodišnjeg ispitivanja, utvrđen je statistički značajan pad vrednosti triglicerida u krvi. Aktivacija AMPK metforminom odgovorna je za redukciju sinteze VLDL čestica u jetri, a posledično i vrednostima triglicerida u krvi.
13. Utvrđen je statistički značajan porast vrednosti HDL holesterola u krvi. Takođe, registruje je pad vrednosti ukupnog i LDL holesterola u krvi. Metforminom indukovano sniženje aktivnosti enzima 3-hidroksi-3-metil-glutaril CoA reduktaze doprinosi redukciji sinteze holesterola.
14. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja, u okviru laboratorijske procene deficita vitamina B12, može se predložiti određivanje ukupnog vitamina B12 i homocisteina pre uvođenja metformina u terapiju tipa 2 dijabetes melitusa i dvanaest meseci nakon toga. Na osnovu nivoa jednogodišnjeg pada koncentracija ukupnog vitamina B12 i porasta vrednosti homocisteina, kao i drugih kliničkih i laboratorijskih parametara, može se razmatrati opcija uvođenja supstitucione terapije vitaminom B12 ili dalja opservacija nivoa vitamina B12 u krvi i ćelijskom prostoru.

7. LITERATURA

1. Nacionalni vodič za dijagnostikovanje i lečenje diabetes mellitus-a. Drugo izmenjeno i dopunjeno izdanje. 2012. Available from <https://www.zdravlje.gov.rs>.
2. Fauci AS, Kasper DL, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL et al. Harrison's principles of Internal medicine. 17th edition. New York-Toronto; The McGraw-Hill Companies: 2008.
3. Spellman CW. Islet cell dysfunction in progression to diabetes mellitus. J Am Osteopath Assoc. 2007; 107(3):S1-S5.
4. Cornier MA, Dabelea D, Hernandez TL, Lindstrom RC, Steig AJ, Stob NR. The Methabolic Syndrome. Endocrine Reviews. 2008; 29(7):777-822.
5. Schweiger M, Schreiber R, Haemmerle G, Lass A, Fledelius C, Jacobsen P, et al. J Biol Chem. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. 2006; 281(52):40236-41.
6. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M et al. The Diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the american Association for the study of liver diseases. Hepatology. 2018; 67(1):328-57.
7. Cernea S, Dobreanu M. Diabetes and beta cell function: from mechanisms to evaluation and clinical implications. Biochimica Medica. 2013; 23(3):266-80.

8. World Health Organization Definition. Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in Diagnosis of Diabetes Mellitus: Abbreviated Report of a WHO Consultation. Geneva, World Health Org., 2011.
9. American Diabetes Association: Standards of Medical Care in diabetes – 2017. *Diabetes Care*. 2017; 40(1):1-147.
10. AACE/ACE Comprehensive type 2 diabetes Management algorithm. *Endocr Pract*. 2018; doi: 10.4158/CS-2017-0153.
11. Aguayo-Rojas LB, Gomes MB. Metformin: an old but still the best treatment for type 2 diabetes. *Diabetology and Metabolic Syndrome*. 2013; 5(6):1-15.
12. Johnson JA, Majumdar SR, Simpson et al. Decreased mortality associated with the use of metformin compared with sulfonylurea monotherapy in type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2002; 25:2244-8.
13. Scheen AJ: ADOPT study: which first-line glucose – lowering oral medication in type 2 Diabetes? *Rev Med Liege*. 2007; 62:48-52.
14. Deacon CF, Mannucci E, Ahren B. Glycemic efficacy of glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors as add-on therapy to metformin in subjects with type 2 diabetes - a review and meta analysis. *Diabetes Obes Metab*. 2012; 14(8):762-7.
15. Foretz B, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Violet B. Metformin: From Mechanisms of action to therapies. *Cell Metabolism*. 2014; 20(2):953-66.
16. UK Prospective diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes

- (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998. 352:854-65.
17. Witters L. The blooming of the French lilac". *J Clin Invest*. 2001; 108(8):1105–07.
 18. Werner E, Bell J. The preparation of methylguanidine, and of $\beta\beta$ -dimethylguanidine by the interaction of dicyandiamide, and methylammonium and dimethylammonium chlorides respectively. *J Chem Soc Trans*.1922; 121:1790–95.
 19. Saeedi R, Parsons HL, Wambolt RB et al. Metabolic actions of metformin in the heart can occur by AMPK-independent mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; 294(6):2497-506.
 20. Bailey CJ, Day C. Metformin: its botanical background. *Practical Diabetes International*. 2004; 21(3):115-17.
 21. Wang YW, He SJ, Feng X, Cheng J, Luo YT, Tan l et al. Metformin: a review of its potential indications. *Drug Des Devel Ther*. 2017; 11:2421-9.
 22. American Diabetes Association. Prevention or delay of type 2 diabetes: Standards of medical care in diabetes-2018. *Diabetes Care*. 2018; 41(1):S1-S54.
 23. Ben Sahra I, Le Marchand BY, Tanti JF, Bost F. Metformin in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug?. *Mol Cancer Therapeutics*. 2010; 9(5):1092-99.
 24. Socha P, Horvath A, Vajro P, Dziechciarz P, Dhawan A, Szajewska H. Pharmacological interventions for nonalcoholic fatty liver disease in adults and in children: a systematic review. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2009; 48(5):587-96.
 25. Jones G, Macklin J, Alexander W. Contraindications to the use of metformin. *BMJ*.

- 2003; 326(7379):4-5.
- 26.** Thomsen HS, Morcos SK. (2003). Contrast media and the kidney: European Society of Urogenital Radiology (ESUR) guideline. *Br J Radiol.* 2003; 76(908):513-18.
- 27.** Miller RA, Chu Q, Xie J, Foretz M, Viollet B, Birnbaum MJ. Biguanides suppress hepatic glucagon signaling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature.* 2013; 494:256-60.
- 28.** Viollet B, Gugas B, Garcia SN, Leclerc J, Forety M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci.* 2012; 122:253-70.
- 29.** Koo SH, Flechner L, Qi L, Zhang X, Scretton RA, Jeffries S et al. The CREB coactivator TORC2 is key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature.* 2005; 437:1109-11.
- 30.** Caton PW, Nayuni NK, Kieswich J, Khan NQ, Yaqoob MM, Corder R. Metformin suppresses hepatic gluconeogenesis through induction of SIRT1 and GCN5. *J Endocrinol.* 2010; 205:97-106.
- 31.** Fantus IG; Brosseau R. Mechanism of action of metformin: insulin receptor and postreceptor effects in vitro and in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986; 63(4):898-905.
- 32.** Burcelin R. The antidiabetic gutsy role of metformin uncovered? *Gut.* 2013; 63(5):706-07.

33. Maida A, Lamont BJ, Cao X, Drucker DJ. Metformin regulates the icretin receptor axis via pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in mice. *Dibetologia*. 2011; 54:339-49.
34. Bahne E, Hansen M, Bronden A, Sonne DP, Vilsboll T, Knop FK. Involvement of glucagon-like peptide-1 in the glucose-lowering effect of metformin. *Diabetes Obes Metab*. 2016; 18(10):955-61.
35. McCreight LJ, Bailey CJ, Pearson ER. Metformin and the gastrointestinal tract. *Diabetologia*. 2016; 59:426-35.
36. Hundal R, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V; Chandramouli V, et al. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2000; 49(12):2063-69.
37. Proctor WR, Bourdet DL, Thakker DR. Mechanisms Underlying Saturable Intestinal Absorption of Metformin. *Drug Metabolism and Disposition*. 2007; 36:1650-8.
38. Pryor R, Cabreiro F. Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets. *Biochem J*. 2015; 471(1):307-22.
39. Gong L, Goswami S, Giacomini KM, Altman RB, Klein TE. Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet gnomics*. 2012; 22(11):820-7.
40. Robert F, Fendri S, Hary L, Lacroix C, Andréjak M, Lalau JD. Kinetics of plasma and erythrocyte metformin after acute administration in healthy subjects. *Diabetes Metab*. 2013; 29(3):279-83.

41. Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR. Metformin: an update. *Ann Intern Med.* 2002; 137(1):25-33.
42. De Jager J, Kooy A, Lehert P, Wulffele MG, Van der Kolk J, Bets D et al. Long term treatment with metformin in patients with type 2 diabetes and risk of vitamin B12 deficiency: randomised placebo control trial. *BMJ.* 2010; 340:2181-8.
43. Hostalek U, Gwilt M, Hildemann S. Therapeutic use of metformin in prediabetes and diabetes prevention. *Drugs.* 2015; 75(10):1071-94.
44. Gjedde S, Christiansen A, Pedersen SB, Rungby J. Survival following a metformin overdose of 63 g: a case report. *Pharmacol Toxicol.* 2003; 93(2):98-9.
45. Liu A, Coleman SP. Determination of metformin in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 2009; 877(29):3695-700.
46. Rifai N, Horvat AR, Withwe CT et al. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular diagnostics.* 6th Edition. Elsevier inc: 2018.
47. Scott JM, Molloy AM. The Discovery of Vitamin B12. *Annals of Nutrition and Metabolism.* 2012; 61(3):239-45.
48. Allen LH. How common is vitamin B-12 deficiency? *Am J Clin Nutr.* 2009; 693-6.
49. Dali-Youcef N, Andres E. An update on cobalamin deficiency in adults. *Q J Med.* 2009; 102:17-28.

-
- 50.** Seetharam B, Yammani RR. Transcellular transport of cobalamin (Cbl; vitamin B12) in an ileal cell. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2003; 5:1-18.
- 51.** Loikas S, Lopponen M, Suominen P, Moller J, Irjala K, Isoaho R et al. RIA for serum holo-transcobalamin: method evaluation in the clinical laboratory and reference interval. *Clin Chem*. 2003; 49:455-62.
- 52.** Wuerges J, Garau G, Geremia S, Fedosov SN, Petersen T. Structural basis for mammalian vitamin B12 transport by transcobalamin. *PNAS*. 2006; 103(12):4386-91.
- 53.** Qadros EV. Advances in understanding of cobalamin assimilation and metabolism. *British Journal of haematology*. 2009; 148:195-204.
- 54.** Langan RC, Zawistoski KJ. Update on Vitamin B12 Deficiency. *American Family Physician*. 2011; 83:1423-30.
- 55.** Banerjee RV, Matthews RG. Cobalamin-dependent methionine synthase. *The FASEB Journal*. 1990; 4(5):1450-9.
- 56.** Carmel R. Diagnosis and management of clinical and subclinical cobalamin deficiencies: Why controversies persist in the age of sensitive metabolic testing. *Biochimie*. 2013; 95:1047-55.
- 57.** Van Asselt DZ, Bloom HJ, Zuiderent R, Wevers RA, Jakobs C, Van den Broek WJ et al. Clinical significance of low cobalmin levels in older hospital patients. *Neth J Med*. 2000; 57:41-9.

-
- 58.** Wolters M, Strohle A, Hahn A. Cobalamin: a critical vitamin in elderly. *Prev Medicine*. 2004; 39:1256-66.
- 59.** Smith P. Vitamin B12 deficiency: Causes, Evaluation and Treatment. *TSMJ*. 2009; 9:36-8.
- 60.** Andres E, Affenberger S, Vinzio S, Kurtz JE; Noel E, Kaltenbach G et al. Food-cobalamin malabsorption in elderly patients: clinical manifestations and treatment. *Am J Med*. 2005; 118:1154-9.
- 61.** Pautas E, Cherin P, De Jaeger C, Godeau P. Vitamin B12 deficiency in the aged. *Presse Med*. 1999; 28:1767-70.
- 62.** Stabler SP. Vitamin B12 Deficiency. *NEJM*. 2013; 368(2):149-60.
- 63.** Carmel R, Agrawal YP, Failures of cobalamin assays in pernicious anemia. *NEJM*. 2012; 367:385-6.
- 64.** Aparicio-Ugarriza R, Palacios G, Alder M, Gonzales-gross M. A review of the cut-off points for the diagnosis of vitamin B12 deficiency in the general population. *Clin Chem Lab Med*. 2015; 53(8):1149-59.
- 65.** Bor MV, Nexø E, Hvas AM. Holo-transcobalamin concentration and transcobalamin saturation reflect recent vitamin B12 absorption better than does serum vitamin B12. *Clin Chem*. 2004; 50:1043-9.
- 66.** 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):129-37.

- 67.** Obeid R, Herrmann W. Holotranscobalamin in laboratory diagnosis of cobalamin deficiency compared to total cobalamin and methylmalonic acid. *Clin Chem Lab Med.* 2007; 45:1746-50.
- 68.** Nexo, E, Hoffmann-Lucke E. Holotranscobalamin, a marker of vitamin B-12 status: analytical aspects and clinical utility. *Am J Clin Nutr.* 2011; 94(1):359-65.
- 69.** Refsum H, Nurk E, Smith, AD, Ueland PM, Gjesdal CG, Bjelland I et al. The Hordaland Homocysteine Study: a community-based study of homocysteine, its determinants, and associations with disease. *The Journal of Nutrition.* 2006; 136(6):1731-40.
- 70.** Persichilli S, Gervasoni J, Iavarone F, Zuppi C, Zappacosta B. A simplified method for the determination of total homocysteine in plasma by electrospray tandem mass spectrometry. *J Sep Sci.* 2010; 33:3119-24.
- 71.** Blom HJ, Vaan Rooij A, Hogeveen M. A simple high-throughput method for the determination of plasma methylmalonic acid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med.* 2007; 45(5):645-50.
- 72.** Klee GG. Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs. vitamin B(12) and folate review. *Clin Chem.* 2000; 46:1277-83.
- 73.** Mao X, Xing X, Xu R, Gong Q, He Y, Li S et al. Folic acid and vitamins D and B12 correlate with homocysteine in Chinese patients with type-2 diabetes mellitus, hypertension or cardiovascular disease. *Medicine.* 2016; 95(6):1-8.
- 74.** De Silva N. Iron, B12 and folate. *Medicine.* 2013; 41(4):204-7.

-
- 75.** Devalia V, Hamilton MS, Molloy AM. Guidelines for the diagnosis and treatment of cobalamin and folate disorders on behalf of the British Committee for Standards in Haematology. *BJH*. 2014; 166:496-513.
- 76.** Guidelines for Investigation & Management of vitamin B12 deficiency. Royal United Hospital Bath NHS Trust. Author: Drs CJC Knechtli & JN Crowe.1-6.
- 77.** Ruston D, Hoare J, Henderson L, Gregory J, Bates C, Prentice A et al. The national diet & nutrition survey: adults aged 19 to 64 years: Nutritional status (anthropometry and blood analytes). Blood pressure and physical activity. London: TSO; 2004.
- 78.** Eussen AJ, Nilsen RM, Midttun O, Hustad S, Tjssennagger N, Meyer K et al. North-south gradients in plasma concentrations of B-vitamins and other components of one-carbon metabolism in Western Europe: results from European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study. *Br J Nutr*. 2013; 110:363-74.
- 79.** Tomkin GH, Hadden DR, Weaver JA, Montgomery DA. Vitamin-B12 status of patients on long-term metformin therapy. *BMJ*. 1971; 2(5763):685-7.
- 80.** Bauman WA, Spungen AM, Spencer S, herbert V, Jayatilleke E. Increased intake of calcium reverses vitamin B12 malabsorption induced by metformin. *Diabete Care*. 2000; 23(9):1227-31.
- 81.** Wulffele MG, Kooy A, Lehert P, bets D, Ogterop JC, Borger van der Burg B et al. Effects of short-term treatment with metformin on serum concentrations of homocysteine, folate and vitamin B12 in type 2 diabetes mellitus: a randomised, placebo-controlled trial. *J Intern Med*. 2003; 254:455-63.

82. Ting RZ, Szeto CC, Chan MHM, Ma KK, Chow KM. Risk factors of vitamin B12 deficiency in patients receiving metformin. *Arch Intern Med.* 2006; 166:1975-9.
83. Beulens JWJ, Hart HE, Kuijs R, Kooijman-Buiting MJ, Rutten GEHM. Influence of duration and dose of metformin on cobalamin deficiency in type 2 diabetes patients using metformin. *Acta Diabetol.* 2015; 52:47-53.
84. Caspary WF, Creutzfeldt W. Analysis of the inhibitory effect on biguanides on glucose absorption. *Diabetologia.* 1971; 7:379-85.
85. Scarpello JHB, Hodgson E, Howlett HCS. Effect of metformin on bili salt circulation and intestinal motility in type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 1998; 15:651-6.
86. Sahin M, Tutuncu NB, Ertugrul D, Tanaci N, Guvener ND. Effects of metformin or rosglitazone on serum concentrations of homocysteine, folate, and vitamin B12 in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications.* 2007; 21:118-23.
87. Leung S, Mattman A, Snyder F, Kassam R, Meneilly G, Nexo E. Metformin induces reduction in plasma cobalamin and haptocorin bound cobalamin levels in elderly diabetic patients. *Clin Chem.* 2010; 43:759-60.
88. Chapman LE, Darling AL, Brown JE. Association between metformin and vitamin B12 deficiency in patients with type 2 diabetes: A sistematic review and meta-analysis. *Diabetes Metab.* 2016; 42(5):316-27.
89. Niafar M, Hai F, Porhomayon J, Neder ND. The role of metformin on vitamin B12 deficiency: a meta-analysis review. *Intern Emerg Med.* 2015; 10:93-102.
90. Qilin L, Li S, Quan H, Li J. Vitamin B12 Status in Metfromin Treated Patients:

- Systematic Review. 2014; 9(6):1-6.
- 91.** Homocysteine Studies Collaboration. (2002). Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: A meta-analysis. *Journal of the American Medical Association*. 2002; 288(16): 2015-22.
- 92.** Jacobsen DW. Determinants of hyperhomocysteinemia: A matter of nature and nature. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1996; 64:641-2.
- 93.** Reinstatler L, Qi YP, Williamson RS, Garn JV, Oakley GP. Association of biochemical B12 deficiency with metformin therapy and vitamin B12 supplements: the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2006. *Diabetes Care*. 2012; 35:327-33.
- 94.** Fonseca VA, Fink LM, Kern PA. Insulin sensitivity and plasma homocysteine concentrations in non-diabetic obese and normal weight subjects. *Atherosclerosis*. 2003; 167(1):783-6.
- 95.** Greibe E, Miller JW, Foutouhi SH, Green R, Nexø E. Metformin increases liver accumulation of vitamin B12 – an experimental study in rats. *Biochimie*. 2013; 95:1062-5.
- 96.** Aroda VR, Edelstein SL, Goldberg RB, Knowler WC, Marcovina SM, Orchard TJ et al. Long-term Metformin Use and Vitamin B12 Deficiency in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *JCEM*. 2016; 101:1754-61.

- 97.** Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285:2486-97.
- 98.** Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča u kliničkoj praksi Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Gojaznost Nacionalni vodič za lekare u primarnoj zdravstvenoj zaštiti. Beograd, 2004.
- 99.** Browning LM, Hsieh SD, Ashwell M: A systematic review of waist-to-height ratio as a screening tool for the prediction of cardiovascular disease and diabetes: 0.5 could be a suitable global boundary value. *Nutr Res Rev* 2010; 23:247-69.
- 100.** HOMA calculator software. Available from: <https://www.dtu.ox.uk/homacalculator/>
- 101.** Nikolić S, Ćurić N, Ilinčić B, Mijović R, Benz D. Significance and Role of Homeostetic Model Assesment models in the Evaluationof Glycose regulation Mechanism. *Medicinski pregled*. 2017;70(5-6): 155-61.
- 102.** Jackson LB, Henshaw MH, Carter J, Crowhury SM. Sex-specific lean body mass predictive equations are accurate in the obese paedriatic population. *Ann Hum Biol*. 2016; 43(5):417-22.
- 103.** Amato M, Giordano C, Galia M, Criscimanna A, Vitabile S, Midiri M. Visceral Adiposity Index - A reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk. *Diabetes Care*. 2010; 33(4):920-2.
- 104.** Prado Teixeira Nascimento JX, Costa Chein MB, Lopes de Sousa RM, Ferreira S, Navarro PA, Oliveira Brito LM. Importance of lipid accumulation product index as a marker of CVD risk in PCOS women. *Lipids Health Dis*. 2015; 14:62.

-
- 105.** McAuley K, Williams S, Mann J, Walker R, Lewis-Barned N, Temple L, et al. Diagnosing Insulin Resistance in the General Population. *Diabetes Care*. 2001; 24:460-4.
- 106.** Mazokopakis EE, Starakis IK. Recommendations for diagnosis and management of metformin-induced vitamin B12(Cbl) deficiency. *Diabetes Res Clin Pract*. 2012; 97(3):359-67.
- 107.** Groot-Kamphuis DM, Van Dijk PR, Groenier KH, Houweling ST, Bilo HJG, Kleefstra N. Vitamin B12 deficiency and the lack of its consequences in type 2 diabetes patients using metformin. *The Netherlands Journal of Medicine*. 2013; 71(7):386-90.
- 108.** Litwak L, Goh SY, Hussein Z, Malek R, Prusty V, Khamseh ME. Prevalence of diabetes complications in people with type 2 diabetes mellitus and its association with baseline characteristics in the multinational A1chieve study. *Diabetol Metab Syndr*. 2013; 5(1):2-10
- 109.** Reinstalter L, Qi YP, Williamson RS, Garn JV, Oakley GP. Association of biochemical B12 deficiency with metformin therapy and vitamin B12 supplements: The National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2006. *Diabetes Care*. 2012; 35(2):327-33.
- 110.** Nervo M, Lubini A. Vitamin B12 in metformin-treated diabetic patients: a cross-sectional study in Brasil. *Rev da Assoc*. 2011; 57(1):46-9.
- 111.** Gupta K, Jain A, Rohatgi A. An observational study of vitamin B12 levels and peripheral neuropathy profile in patients of diabetes mellitus on metformin therapy. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2018; 12:51-8.

- 112.** Herman LS, Nilsson BO, Wettre S. Vitamin B12 status of patients treated with metformin: a cross-sectional cohort study. *Br J Diabetes Vasc Dis.* 2004; 4(6):401-6.
- 113.** Rosemary Minja. Prevalence of low serum vitamin b12 levels and associated factors in type 2 diabetic patients on metformin therapy at MHN diabetic clinic. *MMed (Internal Medicine) Dissertation Muhimbili University of Health and alied Sciences.* October 2016.
- 114.** Golding PH. Holotranscobalamin (HoloTC, Active B12) and Herbert's model for the development of vitamin B12 deficiency: a review and alternative hypothesis. *Springer Plus.* 2016; 5:2-20.
- 115.** Iftikhar R, Kamran SM, Qadir A, Iqbal Z, Bin Usman H. Prevalence of vitamin B12 deficiency in patients of type 2 diabetes mellitus on metformin: a case control study from Pakistan. *Pan Afr Med J.* 2013; 25:16-67.
- 116.** Callagan TS, Hadden DR, Tomkin GH. Megaloblastic anaemia due to vitamin B12 malabsorption associated with long-term metformin treatment. *Br Med J.* 1980; 280:1214-5.
- 117.** Obeid R, Jung J, Falk J, Herrmann W, Geisel J, Friesenhahn-Ochs B et al. Serum vitamin B12 not reflecting vitamin B12 status in patients with type 2 diabetes. *Biochimie.* 2013; 95:1056-61.
- 118.** Herbert V. Staging vitamin B-12(cobalamin) status in vegetarians. *Am J Clin.* 1994; 59(5):1213-22.
- 119.** Chen X, Remacha AF, Sarda MP, Carmel R. Influence of cobalamin deficiency compared with that of cobalamin absorption on serum holo-transcobalamin II .*Am J Clin Nutr.* 2005; 81:110-4.

- 120.** Karmi O, Zayed A, Baragethi S, Qadi M, Ghanem R. Review: Medical lab technology measurement of vitamin B12 concentration: A review on available methods. 2011; 2(2):23-32.
- 121.** Greibe E, Trolle B, Bor MV, Lauszus FF, Nexø E. Metformin lowers serum cobalamin without changing other markers of cobalamin status: a study on women with polycystic ovary syndrome. 2013; 5:2475-82.
- 122.** Marar O, Thomson C. The prevalence of vitamin B12 deficiency in patients with type 2 diabetes mellitus on metformin. RCSI. 2011; 4(1):16-20.
- 123.** Haeusler S. The prevalence and treatment of metformin associated B12 deficiency in patients with type 2 Diabetes Mellitus in New Zealand. Available from <http://hdl.handle.net/10063/3302>; 2014.(Master Theses).
- 124.** Chan Chee Wun Joyce, Chan Hoi Yan Florence, Wong Ho Nam Howard and Yeung Chun Yip (2011). Characteristics of Vitamin B12 Deficiency in Adult Chinese Patients with Type 2 Diabetes and the Implication of Metformin, Topics in the Prevention, Treatment and Complications of Type 2 Diabetes, Prof. Mark Zimering (Ed.), ISBN: 978-953-307-590-7, InTech,
Available from: <http://www.intechopen.com/books/topics-in-the-prevention-treatment-and-complications-of-type-2-diabetes/characteristics-of-vitamin-b12-deficiency-in-adult-chinese-patients-with-type-2-diabetes-and-the-imp>.
- 125.** Ko SH, Ko SH, Ahn YB, Song KH, Han KD, Park YM et al. Association of vitamin B12 deficiency and metformin use in patients with type 2 diabetes mellitus. J Korean Med Sci. 2014; 29(7):965-72.
- 126.** Oh R, Brown D. Vitamin B12 deficiency. Am Fam Physician. 2003; 67:979-86.

127. Sugihara T, Koda M, Okamoto T, Miyoshi K, Matono T, Oyama KH et al. Falsely elevated serum vitamin B12 levels were associated with severity and prognosis of chronic viral liver disease. *Yonago Acta Medica*. 2017; 60:31-9.
128. Čabarkapa V, Đerić M. Homocysteinemia as biomarker in kidney disease. Chapter in book: *Biomarkers in Kidney Disease* (patel VB, Preedy VR. DOI 10.1007/978-94-007-7743-9_2-1.
129. Ahn HJ, Min KW, Cho YO. Assessment of vitamin B(6) status in Korean patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *Nutr Res Pract*. 2011; 5(1):34-9.
130. Jin Y, Moriya T, Tanaka K, Matsubara M, Fujita Y. Glomerular hyperfiltration in non-proteinuric and non-hypertensive Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2006; 71(3):264-71.
131. De Silva, Davis B. Iron, B12 and folate. *Clin Sciences*. 2013; 41(4):204-7.
132. Lin HY, Chung CY, Chang CS, Wang ML, Lin JS, Shen MC. Hyperhomocysteinemia, deep vein thrombosis and vitamin B12 deficiency in a metformin –treated diabetic patient. *J Formos Med Assoc*. 2007; 106:774-8.
133. Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, Rogers G, Bowman BA et al. Serum total homocysteine concentrations in the third National Health and nutrition Examination Survey (1991-1994): population reference ranges and contribution of vitamin status to high serum concentrations. *Ann Intern Med*. 1999; 131:331-9.
134. Herrmann W, Obeid R. Utility and limitations of biochemical markers of Vitamin B12 deficiency. *Eur J Clin Invest*. 2013; 43:231-7.
135. Green R, Miller JW. Vitamin B12 deficiency is the dominant nutritional cause of hyperhomocysteinemia in a folic acid-fortified population. *Clin Chem Lab Med*. 2005; 43:1048-51.

136. Jacobsen DW. Homocysteine and vitamins in cardio-vascular disease. *Clin Chem.* 1998; 44:1833-43.
137. Xu C, Wu Y, Liu G, Liu X, Wang F et al. Relationship between homocysteine level and diabetic retinopathy: a systematic review and meta-analysis. *Diagn Pathol.* 2014; 9:167-7.
138. Li J, Zhang H, Shi M, Yan L, Xie M. Homocysteine is linked to macular edema in type 2 diabetes. *Curr Eye Res.* 2014; 39:730-5.
139. Carmel R. Biomarkers of cobalamin (vitamin B-12) status in the epidemiologic setting: a critical overview of context, applications, and performance characteristics of cobalamin, methylmalonic acid, and holotranscobalamin II. *Am J Clin Nutr.* 2011; 94(1):348-58.
140. Chen X, Ramacha AF, Sarda MP, Carmel R. Influence of cobalamin deficiency compared with that of cobalamin absorption on serum holotranscobalamin II. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81:110-4.
141. Carmel R. Measuring and interpreting holo-transcobalamin (holo-transcobalamin II). *Clin Chem.* 2002; 48:110-4.
142. Pawlak R. Vitamin B12 for diabetes patients treated with metformin. *J Fam Med Dis Prev.* 2017; 3(3):1-7.
143. Beedholm-Ebsen R, Van de Wetering K, Hardlei T, Nexø E, Borst P, Moestrup SK. Identification of multidrug resistance protein- 1(MRP1/ABCC1) as a molecular gate for cellular export of cobalamin. *Blood.* 2010; 115(8):1632-9.
144. Seetharam B, Yammani RR. Cobalamin transport proteins and their cell-surface receptors. *Expert Rev Mol Med.* 2003; 5(18):1-18.

145. De Wolf CJ, Yamaguchi H, Van der Heijden et al. cGMP transport by vesicles from human and mouse erythrocytes. *FEBS J.* 2007; 274(2):439-50.
146. Nathan DM, Davidson MB, DeFronzo RA, Heine RJ, Henry RR, Pratley R et al. American Diabetes Association. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: implications for care. *Diabetes Care.* 2007; 30:753-9.
147. Kooy A, De Jager J, Lehert P, Bets D, Wulffele MG, Donker AJM, Stehouwer CDA. Long term effects of metformin on metabolism and microvascular and macrovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Arc Intern Med.* 2009; 169:616-25.
148. Natali A, Ferrnini E. Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetologia.* 2006; 49:434-41.
149. Mulherin AJ, Oh AH, Kim H, Lauffer LM, Brubaker PL. Mechanisms underlying metformin-induced secretion of glucagon-like peptide-1 from the intestinal L cell. *Endocrinology.* 2011; 152:4610-9.
150. Giannarelli R, Aragona M, Coppelli A, Del Prato S. Reducing insulin resistance with metformin: the evidence today. *Diabetes Metab.* 2003; 29(4):28-35.
151. Gunton JE, Delhanty PJD, Takahashi SI, Baxter RC. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *JCEM.* 2003; 88(3):1323-32.
152. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. WHO Technical Report Series 894, Geneva 2000. Available from <http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/en/index.html>.

-
- 153.** Gomes MB, Giannella ND, Mendonca E, Tambascia MA, Fonseca RM Rea RR et al. Nation wide multicenter study on the prevalence of overweight and obesity in type 2 diabetes mellitus in the Brazilian population. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006; 82:280-4.
- 154.** Daousi C, Casson IF, Gill GV, MacFarlane IA, Wilding JP, Pinkney JH. Prevalence of obesity in type 2 diabetes in secondary care: association with cardiovascular risk factors. *Postgrad Med J.* 2006; 50:136-44.
- 155.** Kahn SE, Haffner SM, Heise MA, Herman WH, Holman RR, Jones NP et al. Glycemic durability of rosiglitazone, metformin , or glyburide monotherapy. *N Engl J Med.* 2006; 355:2427-43.
- 156.** Golay A. Metformin and body weight. *International Journal of Obesity.* 2008; 32:61-72.
- 157.** Dornan TL, Heller SR, Peck GM, Tattersall RB. Double-blind evaluation of efficacy and tolerability of metformin in NIDDM. *Diabetes Care.* 1991; 14:342-4.
- 158.** Kurukulasuriya R, Banerji MA, Chaiken R, Leboviz H. Selective decrease in visceral fat associated with weight loss during metformin treatment in African americans with type 2 diabetes [abstract]. *Diabetes.* 1999.48:A315.
- 159.** Virtann KA, Hallsten k, Parkkola R, Janatuinen T, Lonnqvist F, Viljanen T et al. Differential effects of rosiglitazone and metformin on adipose tissue distribution and glucose uptake in type 2 diabetic subjects. *Diabetes.* 2003; 52:283-90.
- 160.** Woo SL, Xu H, Li H, Zhao J, Guo X, Guo T et al. Metformin ameliorates hepatic steatosis and inflammation without altering adipose phenotype in diet-induced obesity. *PloS One.* 2014; 9(3):e91111.

161. Marchesini G, Brizi G, Tomassetti S, Zoli M, Melchionda N. Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet*. 2001; 358:893-4.
162. Geerling JJ, Boon MR, Van der Zon GC, Van den Berg SA, Van den Hoek AM, Lombes M. Metformin lowers plasma triglycerides by promoting VLDL-triglyceride clearance by brown adipose tissue in mice. *Diabetes*. 2014; 63:880-91.
163. Foretz M, Guigas L, Pollak M, Viollet B. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab*. 2014; 20:953-66.
164. Fullerton MD, Galic S, Marcinko K, Sikkema S, Pulinilkunnil T, Chen ZP et al. Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nat Med*. 2013; 19:1649-54.
165. Xu T, Brandmaier S, Messias AC et al. Effects of metformin on metabolite profiles and LDL cholesterol in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2015; 38(10):1858-67.
166. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*. 2009; 32(1):193-203.
167. Andres A, Loukili NH, Noel E, Kaltenbach G, Abdelgheni MB, Perrin AE et al. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *Can Med Assoc J*. 2004; 171(3):251-9.
168. Andres E, Vidal-Alaball J, Federici L, Loukili NH, Zimmer J, Kaltenbach G. Clinical aspects of cobalamin deficiency in elderly patients. Epidemiology, causes, clinical manifestations, and treatment with special focus on oral cobalamin therapy. *Eur J Intern Med*. 2007; 18:456-2.

- 169.** Marwan AA. Metformin and vitamin B12 deficiency: Where do we stand? *J Pharm Sci.* 2016; 19(3):382-98.
- 170.** Aljabra RJ, Al-Noimi FA, Bataya NM, Telfah HA, Andrawes ST, Alrabbaei H, Abeeleh JA. Study of vitamin B12 deficiency and its relation with metformin treatment among diabetics in Prince Rashid Hospital. *European Scientific Journal.* 2015;11(27):24-9.
- 171.** Raizada N, Jyotsna VP, Sreenivas V, Tandon N. Serum vitamin B12 levels in type 2 diabetes patients on metformin compared to those never on metformin: A cross sectional study. *Indian J of Endocr and Metab.* 2017; 21:424-8.
- 172.** Sun-Hye K, Sun-Hee K, Yu-Bae A, Ki-Ho S, Kyung-Do H, Yong-Moon P, Seung-Hyun K, Hye-Soo K. Association of vitamin B12 deficiency and metformin use in patients with type 2 diabetes. *J Korean Med Sci.* 2014; 29:965-72.
- 173.** Zalaket J, Wehbe T, Jaoude EA. Vitamin B12 deficiency in diabetic subjects taking metformin: A cross sectional study in a Lebanese cohort. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism.* 2018; 11:9-13.
- 174.** Dharmarajan TS, Adiga GU, Norkus EP. Vitamin B12 deficiency. Recognizing subtle symptoms in older adults. *Geriatrics.* 2003; 58(3):287-98.
- 175.** Mahajan R, Gupta K. Revisiting metformin: Annual vitamin B12 supplementation may become mandatory with long-term metformin use. *Journal of Young Pharmacists.* 2018; 2(4):428-9.
- 176.** Bell DS. Metformin-induced vitamin B12 deficiency presenting as a peripheral neuropathy. *South Med J.* 2010; 103:265-7.

-
- 177.** Wahlen A, Haenni A, Johansson HE. Do we need to measure vitamin B12 and magnesium in morbidly obese patients with type diabetes mellitus? *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 2017; 10:141-4.
- 178.** Kibirige D, Mwebaze R. Vitamin B12 deficiency among patients with diabetes mellitus: is routine screening and supplementation justified? *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*. 2013; 12(17):1-6.
- 179.** Olt S, Oznas O. Investigation of the vitamin B12 deficiency with peripheral neuropathy in patients with type 2 diabetes mellitus treated using metformin. *North Clin Istanbul*. 2017; 4(3):233-6.
- 180.** Zagar BR, Longyhore DS. Evaluating the association between vitamin B12 deficiency and peripheral neuropathy in patients with diabetes. *International Journal of Medicine and Pharmacy*. 2014; 2(2):1-10.
- 181.** Quereshi SA, Ainsworth A, Winocour PH. Metformin therapy and assesment for vitamin B12 deficiency: is it necessary? 2011; 28(7):302-4.
- 182.** Jayabalan B, Low LL. Vitamin B12 supplementation for diabetic peripheral neuropathy. *Singapore Med J*. 2016; 57:55-9.