

**UNIVERZITET U BEOGRADU**

**FARMACEUTSKI FAKULTET**

**Dragana B. Totošković**

**ZNAČAJ BIOHEMIJSKIH MARKERA I  
MORFOMETRIJSKIH KARAKTERISTIKA  
LEUKOCITA U LABORATORIJSKOJ  
DIJAGNOSTICI SUBKLINIČKOG  
DEFICITA VITAMINA B12**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2019**

**UNIVERSITY OF BELGRADE**

**FACULTY OF PHARMACY**

**Dragana B. Totošković**

**THE SIGNIFICANCE OF BIOCHEMICAL  
MARKERS AND MORPHOMETRIC  
CHARACTERISTICS OF LEUCOCYTES  
IN LABORATORY DIAGNOSIS OF  
SUBCLINICAL COBALAMIN  
DEFICIENCY**

**Doctoral dissertation**

**Belgrade, 2019**

**MENTOR:**

**Dr sc. Violeta Dopsaj, redovni profesor**

Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

**ČLANOVI KOMISIJE:**

**Dr sc. Violeta Dopsaj, redovni profesor**

Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

**Dr sc. Dragomir Marisavljević, redovni profesor**

Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

**Dr sc. Duško Mirković, redovni profesor**

Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

U Beogradu, \_\_\_\_\_

*Za uspešan završetak ove studije neizmernu zahvalnost dugujem:*

*Svom mentoru, prof dr sc. Violeti Dopsaj na velikoj pomoći tokom izrade doktorske disertacije, na korisnim savetima i ukazanom poverenju.*

*Koleginici dr sc. Jeleni Martinović na dragocenoj pomoći u eksperimentalnom radu, stručnim sugestijama i prijateljskim savetima.*

*Članovima svoje porodice na bezgraničnoj ljubavi i podršci, a naročito svojoj sestri Oliveri Totošković na profesionalno urađenoj lekturi doktorske disertacije.*

*Posebno želim da se zahvalim svom suprugu Borisu i njegovoj porodici na bezuslovnoj podršci i beskrajnom strpljenju.*

# **Značaj biohemijskih markera i morfometrijskih karakteristika leukocita u laboratorijskoj dijagnostici subkliničkog deficita vitamina B12**

## **Rezime**

**UVOD:** Subklinički deficit vitamina B12 (engl. Subclinical Cobalamin Deficiency, SCCD) podrazumeva da je koncentracija jednog ili više biomarkera statusa vitamina B12 izvan granica referentnog opsega u odsustvu kliničkih manifestacija deficita. Do sada se mali broj studija bavio ovim oblikom nedostatka kobalamina kod starijih pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12, a koji nemaju kliničku sliku deficita. Otkrivanje ranih promena u statusu vitamina B12 značajno je za ovu populaciju, jer se neurološki simptomi deficita mogu javiti u odsustvu hematoloških simptoma i mogu biti ireverzibilni, ukoliko se terapija ne primeni na vreme. Kako se SCCD potvrđuje isključivo na osnovu laboratorijskog testiranja statusa vitamina B12, značajno je analizirati odnos rutinskih i novih biomarkera (metilmalonske kiseline (MMA) i morfometrijskih parametara leukocita) u populaciji sa rizikom za pojavu deficita kobalamina.

**CILJEVI:** Cilj studije jeste ispitivanje značaja biohemijskih markera i morfometrijskih karakteristika leukocita u laboratorijskoj dijagnostici subkliničkog deficita vitamina B12 u odsustvu kliničkih simptoma. Takođe, cilj rada je i utvrđivanje povezanosti metilmalonske kiseline sa postojećim parametrima za ispitivanje statusa vitamina B12 i morfometrijskim parametrima neutrofila i monocita, dobijenih na Coulter® LH750 hematološkom analizatoru, kao potencijalno ranih markera promena u statusu vitamina B12.

**MATERIJALI I METODE:** Studija je obuhvatila 590 pacijenata sa rizikom za deficit kobalamina, kao i 148 zdravih dobrovoljaca. Pacijenti sa rizikom za deficit kobalamina bili su stariji od 60 godina i/ili osobe sa gastrointestinalnim smetnjama i simptomima. Za potrebe studije urađene su sledeće analize: krvna slika sa morfometrijskim parametrima leukocita, kobalamin, folat, folat u eritrocitima, antitela protiv unutrašnjeg faktora, homocistein (Hcy), serumsko gvožđe, solubilni transferinski receptori, feritin,

transferin, ukupni kapacitet vezivanja gvožđa, saturacija transferina gvoždem, haptoglobin, laktat dehidrogenaza, kreatinin, procenjena brzina glomerularne filtracije. Analiza MMA je urađena je za 177 pacijenata čije su vrednosti kobalamina  $< 300$  pmol/L i/ili vrednosti Hcy  $> 8$   $\mu$ mol/L.

**REZULTATI:** Zastupljenost koncentracija kobalamina koje označavaju deficit ( $< 150$  pmol/L) bila je 33%, dok je iscrpljene rezerve vitamina B12 (150–221 pmol/L) imalo 28% pacijenata sa rizikom za deficit kobalamina. Koncentracije Hcy  $\geq 15$   $\mu$ mol/L imalo je 46% pacijenata, dok je 68% pacijenata, kojima je urađena analiza MMA, imalo vrednosti MMA u serumu  $> 210$  nmol/L. Niske koncentracije folata ( $< 10$  nmol/L) imalo je 14% pacijenata. Kada su u pitanju međusobni odnosi koncentracija biomarkera statusa vitamina B12 utvrđeno je da je najznačajniji prediktor vrednosti MMA kobalamin sa 9.2%, zatim starost sa 8.2% i kreatinin sa 4.7%. Najznačajniji prediktor vrednosti Hcy bio je kreatinin sa 23.9%, zatim folat sa 3.8%, starost sa 2% i kobalamin sa 1.7%. Ispitivanje statusa vitamina B12 prema polu pokazalo je da se muški i ženski pol nisu razlikovali prema zastupljenosti koncentracija kobalamina  $< 150$  pmol/L i 150–221 pmol/L, folata  $< 10$  nmol/L, MMA  $> 210$  nmol/L ( $P > 0.05$ ), ali se jesu razlikovali prema zastupljenosti koncentracija Hcy  $\geq 15$   $\mu$ mol/L ( $P < 0.001$ ). Muškarci su imali veću zastupljenost koncentracija Hcy  $\geq 15$   $\mu$ mol/L, ali su muškarci imali i veću zastupljenost smanjene funkcije bubrega ( $P < 0.001$ ) i bili su statistički značajno stariji od žena ( $P < 0.001$ ). Analiza statusa vitamina B12 i folata u odnosu na funkciju bubrega pokazala je da su pacijenti sa smanjenom funkcijom bubrega imali statistički značajno veću zastupljenost koncentracija MMA  $> 210$  nmol/L ( $P < 0.001$ ) i Hcy  $\geq 15$   $\mu$ mol/L ( $P < 0.001$ ), dok se zastupljenost koncentracija kobalamina  $< 150$  pmol/L i 150–221 pmol/L, kao i folata  $< 10$  nmol/L nije razlikovala ( $P > 0.05$ ). Kada je u pitanju odnos anemije i biomarkera statusa vitamina B12 i folata utvrđeno je da status folata i kobalamina nije povezan sa prisustvom anemije ( $P > 0.05$ ), već su najznačajniji prediktori anemije bili deficit gvožđa ( $P < 0.001$ ) i smanjena funkcija bubrega ( $P < 0.001$ ). Za morfometrijske parametre neutrofila i monocita utvrđeno je da se nisu razlikovali između zdravih dobrovoljaca muškog i ženskog pola, kao i starijih i mlađih od 60 godina ( $P > 0.05$ ). Uočeno je da su povećane vrednosti standardne devijacije provodljivosti neutrofila (NeC-SD) povezane sa koncentracijama kobalamina  $< 150$  pmol/L ( $P < 0.001$ ) i koncentracijama folata  $< 10$  nmol/L ( $P < 0.001$ ). U odsustvu

deficita folata, povećane vrednosti NeC-SD bile su povezane i sa vrednostima MMA > 210 nmol/L, bez obzira na funkciju bubrega (P < 0.05). Međutim, i pacijenti sa izolovano sniženim vrednostima kobalamina (< 221 pmol/L), bez povećane MMA, imali su statistički značajno više vrednosti NeC-SD (P = 0.03). Homocistein nije bio povezan sa morfometrijskim parametrima neutrofila i monocita. Razlike prema Hcy su se javljale ukoliko su postojale razlike prema polu, starosti ili kreatininu. Izolovani deficit gvožđa je bio povezan sa standardnom devijacijom rasipanja svetlosti neutrofila (NeS-SD) (P < 0.05). Deficit gvožđa nije uticao na povezanost NeC-SD sa niskim koncentracijama kobalamina. Statističkom analizom ROC krive utvrđeno je da se parametar NeC-SD može koristiti za prepoznavanje pacijenata sa koncentracijama kobalamina < 150 pmol/L ili folata < 10 nmol/L, koje, prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji, označavaju deficit ovih vitamina (AUC = 0.776, P < 0.001). Za NeC-SD izdvojila se cut off vrednost 5.0 sa osetljivošću 78.5% i specifičnošću 55.4%. Parametar NeC-SD može prepoznati koncentracije MMA > 210 nmol/L kod pacijenata sa smanjenom bubrežnom funkcijom (AUC = 0.735, P = 0.001), kao i kod pacijenata bez smanjene funkcije bubrega (AUC = 0.736, P = 0.001). I za klasifikaciju pacijenata prema MMA > 210 nmol/L dobijena je ista cut off vrednost 5.0 za NeC-SD. U prisustvu smanjene funkcije bubrega osetljivost i specifičnost iznosile su 75.5% i 58.8%, a u prisustvu normalne bubrežne funkcije 71.4% i 58.8%. Dobijene površine ispod krive u ROC analizi za MMA > 210 nmol/L nisu se razlikovale od površine ispod krive za koncentracije kobalamina < 221 pmol/L bez povećane MMA (AUC = 0.783, P < 0.001). Cut off vrednost od 5.0 za NeC-SD imala je blago povećanu osetljivost (79%) za izolovano smanjene koncentracije kobalamina u odnosu na MMA > 210 nmol/L. Specifičnost je bila ista (58.8%).

**ZAKLJUČAK:** Ovom studijom je utvrđeno da pacijenti sa subkliničkim deficitom vitamina B12 imaju promene u morfologiji neutrofila pre pojave makrocitoze ili makrocitne anemije. Morfološke promene neutrofila izražene su kroz povišene vrednosti standardne devijacije provodljivosti neutrofila i povezane su sa sniženim koncentracijama kobalamina i povećanim vrednostima metilmalonske kiseline. Vrednosti standardne devijacije provodljivosti neutrofila povezane su i sa niskim koncentracijama folata, zbog čega se ovaj morfometrijski parametar neutrofila može smatrati ranim hematološkim markerom deficita vitamina B12 i folata. U odsustvu

inflamatornih stanja, kao i bolesti i terapije koje utiču na broj i morfologiju leukocita, na osnovu dobijene cut-off vrednosti za standardnu devijaciju provodljivosti neutrofila mogu se selektovati pacijenti sa rizikom za deficit vitamina B12 i normalnom srednjom zapreminom eritrocita, kojima je nakon krvne slike potrebno odrediti nivo kobalamina i folata. S obzirom na to da nema razlike u povezanosti metilmalonske kiseline i kobalamina sa promenjenom morfologijom neutrofila, metilmalonska kiselina nema prednost nad kobalaminom u ispitivanju statusa vitamina B12 kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12 i normalnom srednjom zapreminom eritrocita.

**Ključne reči:** subklinički deficit kobalamina, vitamin B12, folat, metilmalonska kiselina, homocistein, morfometrijski parametri neutrofila i monocita

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Medicinska biohemija

**UDK broj:** 577.164.1:[616-074/.078:615.4(043.3)]



# **The significance of biochemical markers and morphometric characteristics of leucocytes in laboratory diagnosis of subclinical cobalamin deficiency**

## **Abstract**

**INTRODUCTION:** In the absence of clinical manifestations, concentration of one or more biomarkers of vitamin B12 status out of reference range is considered as subclinical cobalamin deficiency (SCCD). So far, the small number of studies have explored SCCD in elderly patients at risk of vitamin B12 deficiency, but without clinical picture. The recognition of early changes in cobalamin status is important for this population because neurological symptoms of deficiency can be present without hematological manifestations. Also, neurological symptoms of deficiency can be irreversible without timely therapy. Considering that SCCD depends solely on laboratory testing of vitamin B12 status, it is important to analyse relationship between biomarkers routinely used and novel markers (methylmalonic acid (MMA) and morphometric parameters of leucocytes) in the population at risk of cobalamin deficiency.

**AIMS OF STUDY:** The study objective is the research of significance of biochemical markers and morphometric parameters of leucocytes in laboratory diagnosis of subclinical cobalamin deficiency in the absence of clinical manifestations. Also, the study aim is to analyse relationships between methylmalonic acid and biomarkers routinely used, and morphometric parameters of neutrophils and monocytes, obtained by Coulter® LH750 hematology analyser, as potential early markers of changes in vitamin B12 status.

**MATERIALS AND METHODS:** The study population included 590 patients at risk of cobalamin deficiency and 148 healthy volunteers. The patients at risk of cobalamin deficiency were older than 60 years and /or had gastrointestinal symptoms or disorders. For the study purpose, the following tests were done: complete blood count with morphometric parameters of leucocytes, cobalamin, folate, red blood cell folate, intrinsic factor antibody, homocysteine (Hcy), serum iron, soluble transferrin receptors,

ferritin, transferrin, total iron binding-capacity, transferrin saturation, haptoglobin, lactate dehydrogenase, creatinine, estimated glomerular filtration rate. Methylmalonic acid test was performed for 177 patients with cobalamin  $< 300$  pmol/L and/or homocysteine (Hcy)  $> 8$   $\mu$ mol/L.

**RESULTS:** The percentage of patients with low cobalamin levels ( $< 150$  pmol/L), that represent cobalamin deficiency, was 33% and 28% of patients at risk of cobalamin deficiency had depleted cobalamin stores (150–221 pmol/L). The concentrations of Hcy  $\geq 15$   $\mu$ mol/L and MMA  $> 210$  nmol/L were present in 46% and 68% of patients at risk of vitamin B12 deficiency, respectively. The percentage of patients with low folate levels ( $< 10$  nmol/L) was 14%. The most significant predictor of MMA levels was cobalamin which explained 9.2% of MMA variance. The age of patients explained 8.2% and creatinine concentration 4.7% of MMA variance. The most significant determinant of Hcy levels was creatinine with 23.9%, then folate with 3.8%, age with 2% and cobalamin with 1.7%. Men and women did not differ according to distribution of cobalamin levels  $< 150$  pmol/L and 150–221 pmol/L, folate  $< 10$  nmol/L and MMA  $> 210$  nmol/L ( $P > 0.05$ ). There was the difference according to distribution of Hcy  $\geq 15$   $\mu$ mol/L ( $P < 0.001$ ). Men had significantly higher percentage of Hcy  $\geq 15$   $\mu$ mol/L compared to women, but they were significantly older ( $P < 0.001$ ) and had significantly higher percentage of reduced renal function ( $P < 0.001$ ). Patients with reduced renal function had significantly higher percentage of MMA  $> 210$  nmol/L ( $P < 0.001$ ) and Hcy  $\geq 15$   $\mu$ mol/L ( $P < 0.001$ ) than patients with normal renal function. The distribution of cobalamin  $< 150$  pmol/L, cobalamin 150–221 pmol/L and folate  $< 10$  nmol/L did not differ between these patients ( $P > 0.05$ ). There was no association between cobalamin and folate status and presence of anemia ( $P > 0.05$ ). The most significant determinants of low hemoglobin levels were iron deficiency ( $P < 0.001$ ) and reduced renal function ( $P < 0.001$ ). There was no gender and age differences in morphometric parameters of neutrophils and monocytes among healthy volunteers ( $P > 0.05$ ). The results indicated association between increased values of neutrophil conductivity standard deviation (NeC-SD) and cobalamin  $< 150$  pmol/L ( $P < 0.001$ ), and folate  $< 10$  nmol/L ( $P < 0.001$ ). In the absence of folate deficiency, the increased values of NeC-SD were associated with MMA  $> 210$  nmol/L, regardless of renal function ( $P < 0.05$ ). However, patients with low cobalamin levels ( $< 221$  pmol/L) and without raised level of MMA,

also had significantly higher values of NeC-SD ( $P = 0.03$ ). Homocysteine was not associated with morphometric parameters of neutrophils and monocytes. The Hcy differences were related to age, gender and creatinine. Isolated iron deficiency was associated with the standard deviation of neutrophil light scattering (NeS-SD) ( $P < 0.05$ ). Iron deficiency did not affect the association of NeC-SD with low cobalamin concentrations. Receiver operating curve analysis revealed that NeC-SD can be used for patient classification according to cobalamin  $< 150$  pmol/L and folate  $< 10$  nmol/L levels, which have been suggested by World Health Organisation as cut off values for vitamin deficiency (AUC = 0.776,  $P < 0.001$ ). The cut off value for NeC-SD was 5.0 with 78.5% of sensitivity and 55.4% of specificity. Parameter NeC-SD can recognise concentrations of MMA  $> 210$  nmol/L in patients with reduced renal function (AUC = 0.735,  $P = 0.001$ ) as well as in patients with normal renal function (AUC = 0.736,  $P = 0.001$ ). The NeC-SD cut off for MMA  $> 210$  nmol/L was the same as for cobalamin  $< 150$  pmol/L. The sensitivity and specificity for patients with reduced renal function were 75.5% i 58.8% and for patients with normal renal function 71.4% i 58.8%, respectively. There was no difference between these areas under the curve and area under the NeC-SD curve for cobalamin  $< 221$  pmol/L without elevated MMA (AUC = 0.783,  $P < 0.001$ ). Cut off value of NeC-SD was the same for cobalamin  $< 221$  pmol/L, but the sensitivity was slightly higher (79%) compared to sensitivity for MMA  $> 210$  nmol/L. The specificity was equal, 58.8%.

**CONCLUSION:** Patients with subclinical cobalamin deficiency have changes in neutrophil morphology before occurrence of macrocytosis or macrocytic anemia. The changes are manifested as increased values of neutrophil conductivity standard deviation which are associated with low cobalamin and high methylmalonic acid levels. The values of neutrophil conductivity standard deviation are also associated with low folate levels, which makes this morphometric parameter an early hematology marker of cobalamin and folate deficiency. In the absence of inflammatory conditions, as well as diseases and therapies, which influence the number and morphology of leucocytes, based on obtained cut off values for neutrophil conductivity standard deviation, patients at risk of cobalamin deficiency and normal mean corpuscular volume of erythrocyte can be selected for cobalamin and folate testing after analysis of complete blood count. Considering that there were no differences between association of cobalamin and

methylmalonic acid with changes in neutrophil morphology, methylmalonic acid does not have the advantage in evaluation of vitamin B12 status in patients at risk of cobalamin deficiency with normal mean corpuscular volume of erythrocyte.

**Key words:** subclinical cobalamin deficiency, vitamin B12, folate, methylmalonic acid, homocysteine, morphometric parameters of neutrophils and monocytes

**Scientific field:** Pharmacy

**Scientific topic:** Medical Biochemistry

**UDK number:** 577.164.1:[616-074/.078:615.4(043.3)]

## **LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU**

**ABCD4** – engl. ATP-binding cassette sub-family D member 4

**AdoCbl** – adenzilkobalamin

**AI** – engl. Adequate Intake, adekvatan dnevni unos

**At-IF** – antitela protiv unutrašnjeg faktora

**ATP** – adenzin trifosfat

**ATR** – adenzil transferaza

**AUC** – engl. Area Under Curve, površina ispod krive

**BCSH** – engl. British Committee for Standards in Haematology, Britanski odbor za standarde u hematologiji

**C** – eng. conductivity, provodljivost

**cb12** – engl. combined indicator of B12 status, kombinovani indikator statusa vitamin B12

**Cbl** – kobalamin

**cb1A** – gen za MMAA

**cb1B** – gen za MMAB

**cb1C** – gen za MMACHC

**cb1D** – gen za MMADHC

**cb1E** – gen za reduktazu MS

**cb1F** – gen za LMBD1

**cb1G** – gen za MS

**cblJ** – gen za ABCD4

**CIA** – hemiluminiscentni imunotest

**CNCbl** – cijanokobalamin

**CPD** – eng. Cell Population Data, morfometrijske karakteristike leukocita

**CRP** – C-reaktivni protein

**CUBAM** - receptor za kompleks unutrašnji faktor-kobalamin

**CV** – koeficijent varijacije

**DMB** – 5,6-dimetil-benzimidazol

**DNK** – deoksiribonukleinska kiselina

**dT** – deoksitimidin

**dTMP** – deoksitimidin monofosfat

**dU** – deoksiuridin

**dUMP** – deoksiurudin monofosfat

**EDTA** – etilen diamino tetraacetat

**EFSA** – engl. European Food Safety Authority, Evropsko telo za bezbednost hrane

**eGFR** – engl. Estimated Glomerular Filtration Rate, procenjena brzina glomerularne filtracije

**EIA** – enzimimunotestovi

**FBCM** – engl. Food Bound Cobalamin Malabsorption, nemogućnost oslobađanja kobalamina iz hrane

**FDA** – engl. Food and Drug Administration, Američka agencija za hranu i lekove

**FPIA** – fluorescentno polarizacioni imunotest

**FUT2** – gen za  $\alpha(1,2)$ fukoziltransferazu

**GC-MS** – gasna hromatografija masena spektrometrija

**GTP** – guanozin trifosfat

**Hap** – haptoglobin

**HC** – haptokorin

**HC-Cbl** – kompleks haptokorina i kobalamina

**Hct** – hematokrit

**Hcy** – homocistein

**HIBCH** – gen za 3-hidroksi-izobutiril-CoA hidrolazu

**His** – histidin

**Holo-TCII** – holotranskobalamin II

**HPLC** – tečna hromatografija pod visokim pritiskom

**ID-GC-MS** – izotop diluciona gasna hromatografija masena spektrometrija

**ID-LC-MS/MS** – izotop diluciona tečna hromatografija tandem masena spektrometrija

**ID-MS** – izotop diluciona masena spektrometrija

**IF** – unutrašnji faktor

**IP** – interval pouzdanosti

**IR** – interkvartilni raspon

**JCTLM** – engl. Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine, Zajednički odbor za sledljivost u laboratorijskoj medicini

**Krea** – kreatinin

**LC-MS/MS** – tečna hromatografija tandem masena spektrometrija

**LHD** – laktat dehidrogenaza

**LMBD1** – engl. probable lysosomal cobalamin transporter

**Max** – maksimum

**MCM** – metilmalonil-CoA mutaza

**MCV** – engl. Mean Corpuscular Volume, srednja zapremina eritrocita

**MD** – medijana

**MDRD** – engl. Modification of Diet in Renal Disease

**MetCbl** – metilkobalamin

**Min** – minimum

**MMA** – metilmalonska kiselina

**MMAA** – engl. Methylmalonic aciduria type A protein

**MMAB** – engl. Corrinoid adenosyltransferase

**MMACHC** – engl. Methylmalonic aciduria and homocystinuria type C protein

**MMADHC** – engl. Methylmalonic aciduria and homocystinuria type D protein

**MoC** – srednja vrednost provodljivosti monocita

**MoC-SD** – standardna devijacija provodljivosti monocita

**MoS** – srednja vrednost rasipanje svetlosti monocita

**MoS-SD** – standardna devijacija rasipanja svetlosti monocita



**MoV** – srednja vrednost zapremine monocita

**MoV-SD** – standardna devijacija zapremine monocita

**MS** – metionin sintaza

**mut** – gen za MCM

**NAD** – nikotinamid adenin dinukleotid

**NADH** - redukovani nikotinamid adenin dinukleotid

**NeC** – srednja vrednost provodljivosti neutrofila

**NeC-SD** – standardna devijacija provodljivosti neutrofila

**NeS** – srednja vrednost rasipanja svetlosti neutrofila

**NeS-SD** – standardna devijacija rasipanja svetlosti neutrofila

**NeV** – srednja vrednost zapremine neutrofila

**NeV-SD** – standardna devijacija zapremine neutrofila

**NHANES** – engl. National Health and Nutrition Examination Survey

**NIST** – engl. National Institute of Standards and Technology, Nacionalni institut za standarde i tehnologiju

**PGA** – pteroilglutaminska kiselina

**RBC folat** – folat u eritrocitima

**RDW** – engl. Red Cell Distribution Width, koeficijent varijacije veličine eritrocita

**S** – engl. scatter, rasipanje

**SAH** – S-adenozil-L-homocistein

**SAT** – saturacija transferina gvožđem

**SCCD** – engl. Subclinical Cobalamin Deficiency, subklinički deficit kobalamina

**SD** – standardna devijacija

**SRM** – standardni referentni materijal

**sTfR** – solubilni transferinski receptori

**TCEP** – tris[2-karboksietil] fosfin

**TCII** – transkobalamin II

**TCII-Cbl** – kompleks transkobalamina II i kobalamina

**TCN2** – gen za transkobalamin II

**THF** – tetrahidrofolat

**TIBC** – ukupni kapacitet vezivanja gvožđa

**TPTZ** – 2,4,6-tri-(2-piridil)-5-triazin

**TRF** – transferin

**UK NEQAS** – engl. United Kingdom National External Quality Assessment Service, Britanska nacionalna služba za spoljašnju kontrolu kvaliteta

**V** – engl. volume, zapremina

**VCS** – eng. volume, conductivity, scatter, zapremina, provodljivost, rasipanje

**vit B12** – vitamin B12

**WHO** – engl. World Health Organisation, Svetska zdravstvena organizacija

**WHO IS** – engl. World Health Organisation International Standard, internacionalni standard Svetske zdravstvene organizacije

**Xsr** – srednja vrednost

## Sadržaj

<b>1. Uvod</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Struktura i sinteza vitamina B12</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Metabolizam vitamina B12</b>	<b>5</b>
1.2.1. Apsorpcija, transport i ekskrecija vitamina B12	5
1.2.2. Intraćelijski metabolizam vitamina B12	7
<b>1.3. Deficit vitamina B12</b>	<b>11</b>
1.3.1. Klinički deficit vitamina B12	11
1.3.2. Subklinički deficit vitamina B12	14
1.3.3. Mehanizam nastanka deficita vitamina B12	16
1.3.4. Prevalenca deficita vitamina B12	18
<b>1.4. Laboratorijska dijagnostika deficita B12</b>	<b>19</b>
1.4.1. Hematološki testovi	19
1.4.2. Biohemijski testovi	32
<b>1.5. Funkcionalni laboratorijski testovi za ispitivanje statusa vitamina B12</b>	<b>48</b>
1.5.1. Šilingov test	48
1.5.2. Potencijalna zamena za Šilingov test	50
1.5.3. Deoksiuridin supresivni test	51
<b>1.6. Ostali testovi za ispitivanje statusa vitamina B12</b>	<b>52</b>
<b>1.7. Testovi za ispitivanje statusa folata</b>	<b>54</b>
<b>1.8. Monitoring statusa vitamina B12 i dijagnostika deficita</b>	<b>59</b>

<b>2. Ciljevi rada</b>	<b>64</b>
<b>3. Materijali i metode</b>	<b>65</b>
<b>3.1. Izbor ispitanika</b>	<b>65</b>
<b>3.2. Uzorkovanje</b>	<b>66</b>
<b>3.3. Laboratorijske analize</b>	<b>67</b>
3.3.1. Krvna slika i morfometrijski parametri neutrofila i monocita	68
3.3.2. Test za C-reaktivni protein	68
3.3.3. Test za vitamin B12	68
3.3.4. Test za folat i folat u eritrocitima	69
3.3.5. Test za antitela na unutrašnji faktor	70
3.3.6. Test za homocistein	70
3.3.7. Test za metilmalonsku kiselinu	70
3.3.8. Test za serumsko gvožđe	71
3.3.9. Test za solubilne transferinske receptore	71
3.3.10. Test za feritin	71
3.3.11. Test za transferin, ukupni kapacitet vezivanja gvožđa i saturacija transferina gvoždem	71
3.3.12. Test za haptoglobin	72
3.3.13. Test za laktat dehidrogenazu	72
3.3.14. Test za kreatinin i procenjena brzinu glomerularne filtracije	72
<b>3.4. Statistička obrada podataka</b>	<b>74</b>

<b>4. Rezultati</b>	<b>78</b>
<b>4.1. Opšti podaci o pacijentima sa rizikom za deficit vitamina B12</b>	<b>78</b>
<b>4.2. Biomarkeri statusa vitamina B12 i folata</b>	<b>84</b>
4.2.1. Vitamin B12	84
4.2.2. Folat	87
4.2.3. Homocistein	89
4.2.4. Metilmalonska kiselina	93
<b>4.3. Status gvožđa</b>	<b>96</b>
<b>4.3.1. Povezanost anemije sa statusom gvožđa, kobalamina i folata, i smanjenom funkcijom bubrega</b>	<b>98</b>
<b>4.4. Morfometrijski parametri neutrofila i monocita</b>	<b>100</b>
4.4.1. Povezanost morfometrijskih karakteristika neutrofila i monocita sa koncentracijama vitamina B12, folata i homocisteina	103
4.4.2. Povezanost morfometrijskih karakteristika neutrofila i monocita sa metilmalonskom kiselinom i funkcijom bubrega	111
4.4.3. Povezanost morfometrijskih karakteristika neutrofila i monocita sa anemijom i deficitom gvožđa	120
<b>5. Diskusija</b>	<b>131</b>
<b>5.1. Biomarkeri statusa vitamina B12 i uticaj drugih faktora</b>	<b>133</b>
<b>5.2. Povezanost anemije sa statusom vitamina B12 u odnosu na funkciju bubrega</b>	<b>137</b>
<b>5.3. Uticaj pola i starosti na morfometrijske parametre neurofila i monocita</b>	<b>138</b>

<b>5.4. Uticaj vitamina B12, folata i homocisteina na morfometrijske parametre neutrofila i monocita -----</b>	<b>140</b>
<b>5.5. Uticaj metilmalonske kiseline i funkcije bubrega na morfometrijske parametre neutrofila i monocita -----</b>	<b>143</b>
<b>5.6. Uticaj anemije i statusa gvožđa na morfometrijske parametre neutrofila i monocita -----</b>	<b>147</b>
<b>6. Zaključci-----</b>	<b>150</b>
<b>7. Literatura-----</b>	<b>153</b>

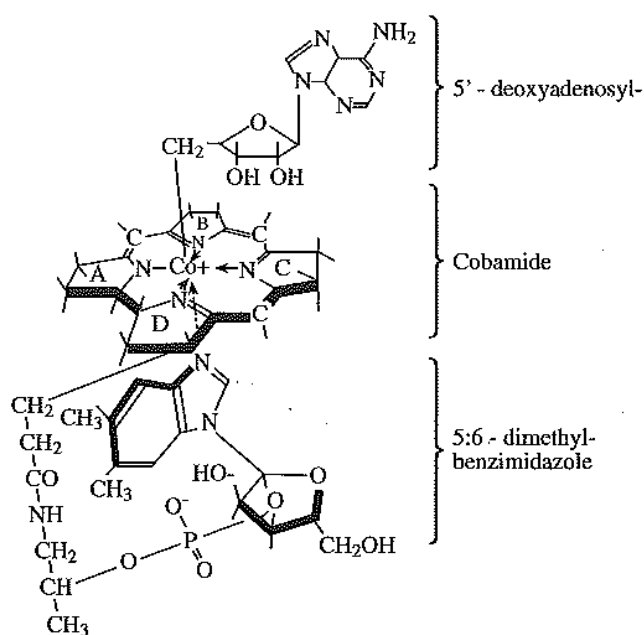
## 1. Uvod

Posledice deficita vitamina B12 odavno su prepoznate i opisane, dok je sam vitamin B12 kasnije otkriven. Lekari Combe, Addison i Biermer nezavisno su jedan od drugog opisali makrocitnu anemiju u XIX veku (1, 2, 3, 4), ali nisu znali zbog čega nastaje i kako se leči. Tek početkom XX veka Minot i Murphy uspeali su da u homogenizatu sirove jetre otkriju postojanje tzv. anti-perniciozne anemije faktora i da omogućće identifikaciju vitamina B12 (2). Nakon otkrića da sirova jetra sadrži lek za pernicioznu anemiju (2), kako ju je Biermer nazvao zbog njenog fatalnog ishoda (4), dve grupe istraživača okupljenih oko Smitha iz Engleske (5) i Rickesa iz USA (6) nezavisno su jedni od drugih izolovali iz jetre jedinjenje u obliku crvenih kristala i nazvali ga vitamin B12. Sledeća faza istraživanja bila je usmerena ka utvrđivanju strukture vitamina B12 i za to je zaslužna Dorothy Crowfoot Hodgkin sa svojim saradnicima. Oni su otkrili trodimenzionalnu strukturu cijanokobalamina i adenzilkobalamina (7–10). Zatim je ustanovljena njegova kofaktorska uloga (11). Značaj adenzilkobalamina za metilmalonil-CoA mutazu ubrzo je utvrđen (12, 13). Usledilo je otkriće i metilkobalamina (14) i njegovog značaja za metionin-sintazu (15). Sama struktura adenzilkobalamina utvrđena je 1961 (10), dok je struktura metilkobalamina ustanovljena čak dve decenije kasnije (16).

### 1.1. Struktura i sinteza vitamina B12

Naziv vitamin B12 (vit B12) odnosi se na grupu fiziološki aktivnih jedinjenja koja se hemijski klasifikuju kao kobalamini. Kobalamini (Cbl) po strukturi pripadaju korinoidima. Glavnu strukturnu jedinicu korinoida predstavlja korinsko jezgro koje se sastoji od 4 pirolova prstena (A, B, C, D). Korinsko jezgro je preko 4 atoma azota iz pirolovih prstena povezano sa jonom Co u vitaminu B12 (Slika 1) (17, 18). Kompleks korinskog prstena i Co naziva se kobamid (17). Nakon vezivanja 4 atoma azota, na Co preostaju još 2 mesta za uspostavljanje koordinativnih veza sa ligandima. Donji ( $\alpha$ ) ligand vezan za Co jeste azot iz 5,6-dimetil-benzimidazol (DMB) fosforibozila ili nukleotidna petlja (17–19). Takođe,  $\alpha$  ligand je vezan i za korinski prsten preko

propionamid bočnog lanca prstena D i fosfata iz DMB-a (17–20). Gornji ( $\beta$ ) ligand je promenljiv i može biti: metil grupa, hidroksilna grupa, voda, cijano grupa, 5'-deoksiadenozil (17–20). Vitamin B12 razlikuje se od ostalih korinoida (hema, hlorofila) po nedostatku metinskog mosta između parcijalno hidrogenizovanih pirola A i D, oksidacionom stanju prstena, broju i vrsti bočnih lanaca vezanih za korinski prsten i atomu metala u centru prstena (21).



**Slika 1. Struktura 5'-deoksiadenozilkobalamina<sup>1</sup>**

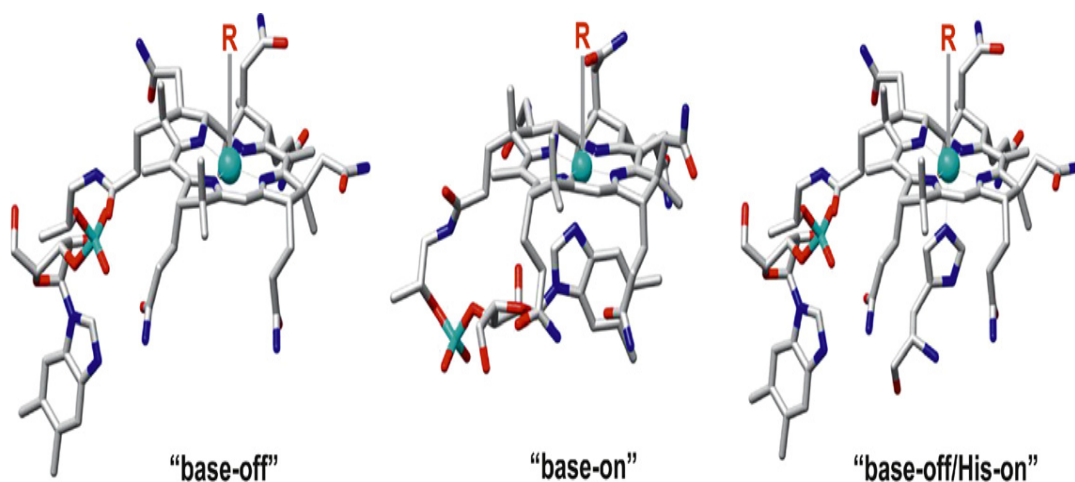
Fiziološka aktivnost kobalamina zasniva se na: oksidacionom stanju Co, da li je DMB vezan za Co i prirodni  $\alpha$  liganda (19).

U organizmu se kobalamin javlja u vidu dva konformaciona oblika: oblik sa vezanom nukleotidnom petljom (base-on stanje) i oblik bez vezane nukleotidne petlje za Co (base-off stanje), ali nukleotidna petlja ostaje vezana za korinski prsten (19). Konformacija sa nukleotidnom petljom javlja se u kompleksu sa transportnim proteinima, a bez nje u interakciji sa vitamin B12 zavisnim enzimima: metionin-

<sup>1</sup>Shenkin A, Baines M, Fell SG, Lyon TDG. Vitamin and trace elements. In: Burtis AC, Ashwood RE, Bruns ED, editors. Tietz Textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 4th ed. Missouri: Elseviers Inc, 2006:1100–1105 (17)



sintazom (MS) i metilmalonil-CoA mutazom (MCM) (22). U enzimima je za Co umesto N iz nukleotidne petlje vezan histidin, tzv. base-off/His-on konformacija (19).



**Slika 2. Konformacije kobalamina<sup>2</sup>**

U zavisnosti od oksidacionog stanja Co postoji: kob(I)alamin, kob(II)alamin, kob(III)alamin (19). Kob(I)alamin obično nema ligande, veoma je reaktivan nukleofil i lako se oksiduje u kob(II)alamin (19, 24). Kob(II)alamini nemaju gornji ligand, već samo vezanu nukleotidnu petlju (19). Izuzetak je kob(II)alamin koji se vezuje za adenziltransferazu i koji nema oba liganda (19, 25). Adenzilkobalamin (AdoCbl), metilkobalamin (MetCbl), cijanokobalamin (CNCbl) i hidroksikobalamin su kob(III)alamini sa vezanom nukleotidnom petljom (19).

Metilkobalamin i adenzilkobalamin jesu metabolički aktivni oblici vitamina B12 i predstavljaju 75–90% i 10–25% endogenog kobalamina (26). Metilkobalamin je dominantni oblik u serumu, a AdoCbl u citozolu (17). Cijanokobalamin nije prirodan oblik vitamina B12 i nema fiziološku funkciju (26), ali je hemijski stabilan i predstavlja referentno jedinjenje za određivanje serumskih koncentracija vitamina B12 (17). Manje stabilni oblici mogu se konvertovati u CNCbl i na taj način odrediti. Zbog njegove stabilnosti u vodenom rastvoru i apsorpcionih karakteristika, pogodan je za pripremu kalibratora za određivanje koncentracije kobalamina u serumu (17). Takođe, vitamin

<sup>2</sup>Banerjee R, Gherasim C, Padovani D. The tinker, tailor, soldier in intracellular B12 trafficking. *Curr Opin Chem Biol* 2009;13(4):484–491(23)

B12 se u ovom obliku koristi kao suplement u ishrani ljudi (20, 26, 27). Oblici kobalamina sa različitim gornjim aksijalnim ligandom konvertuju se u AdoCbl i MetCbl unutar ćelije (28, 29, 30).

Strukture sa drugačijim grupama vezanim za korinski prsten, supstituisanom nukleotidnom petljom ili bez nje, nazivaju se analozima kobalamina (18, 31). To su strukturno slična jedinjenja kobalaminu, ali ne mogu da obavljaju funkciju kofaktora enzima MS i MCM (32). Njihovo prisustvo u krvi u kompleksu sa haptokorinom je potvrđeno, ali ne i sa transkobalaminom II (33). Još uvek nije utvrđeno njihovo poreklo u organizmu (32). Jedna od pretpostavki je da se analozi, koje sintetišu intestinalni mikroorganizmi, pasivno apsorbuju i tako dospevaju u cirkulaciju (32). U prilog tome idu i velike količine analoga pronađene u fecesu (34). Drugo mišljenje jeste da analozi nastaju iz kobalamina u samom organizmu (32).

U in vivo uslovima samo neke bakterije i arheje mogu da sintetišu vitamin B12 (35). U in vitro uslovima Woodward i Eschenmoser su sa svojim saradnicima 1973. uspeli da sintetišu vitamin B12. Postupak sinteze je hemijski zahtevan proces koji podrazumeva oko 70 reakcija. Za industrijsku proizvodnju to je komplikovano i skupo. Zato se vitamin B12 proizvodi procesima biofermentacije u genetski modifikovanim mikroorganizmima (21). De novo sinteza vitamina B12 može se odvijati na 2 načina: aerobno i anaerobno (20, 21, 35). Ova dva puta međusobno se razlikuju ne samo prema potrebi za kiseonikom već i po tome kada se Co ugrađuje u korinski prsten (35). Najveća komponenta koju treba sintetisati jeste korinski prsten, koji nastaje od uroporfirinogena III, zajedničkog prekursora u sintezi hema, hlorofila, siroheme, F430 enzima i kobalamina. Zbog kompleksnosti strukture, više od 30 gena u bakteriji potrebno je za njegovu de novo sintezu, što predstavlja 1% bakterijskog genoma (21). Postoji i salvage put u sintezi kobalamina, koji je energetski povoljniji za bakterije i arheje, jer preuzimaju korinoide iz spoljašnje sredine (35).

Za ljude siguran izvor vitamina B12 jesu: meso, jaja, mlečni proizvodi (36). Prisustvo kobalamina u pečurkama, algama, fermentisanim proizvodima, listovima određene vrste čaja (37–40), kao i u proizvodima životinjskog porekla potiče iz

bakterija (41). Još uvek nema dovoljno podataka da bi se određene alge, pečurke i fermentisani proizvodi smatrali sigurnim izvorom kobalamina (37).

## **1.2. Metabolizam vitamina B12**

Metabolizam kobalamina u organizmu čoveka je kompleksan i još uvek nedovoljno istražen. Sastoji se od procesa apsorpcije u gastrointestinalnom traktu, transporta putem krvi, intracelularnog transporta i enzimskih reakcija u kojima je kobalamin kofaktor (42–44).

### **1.2.1. Apsorpcija, transport i ekskrecija vitamina B12**

Proces preuzimanja kobalamina u gastrointestinalnom traktu podrazumeva selektivnost, tj. apsorpciju fiziološki aktivnih molekula i izbegavanje strukturno sličnih jedinjenja koja sintetiše crevna mikroflora i/ili onih koja se unesu putem hrane (42). Da bi apsorpcija bila selektivna potrebno je normalno funkcionisanje želuca, pankreasa i tankog creva (26), dva transportna homologna proteina: haptokorin (HC) i unutrašnji faktor (IF) i receptor za kompleks unutrašnji faktor-kobalamin (CUBAM) (26, 42, 45).

U hrani je vitamin B12 uglavnom vezan za proteine. Iz tih kompleksa mora se prvo ekstrahovati, što se postiže delovanjem želudačne kiseline i pepsina (44). Oslobođeni vitamin B12 u kiseloj sredini želuca se vezuje za HC, koji potiče iz progutane pljuvačke i želuca (26, 44, 46). Pri neutralnom pH, kao što je slučaj kod pacijenata sa ahlorhidrijom, HC slabo vezuje kobalamin, tada je vitamin uglavnom vezan za IF. To može biti jedan od razloga zbog čega je deficit vitamina B12 redak kod pacijenata koji koriste inhibitore protonske pumpe (47).

Pepsin iz želudačnog soka ne učestvuje u digestiji HC-a i on u kompleksu sa kobalaminom dospeva u duodenum (47). U duodenumu pankreasne proteaze razlažu HC (46). Najosetljiviji je na delovanje tripsina, zatim himotripsina i elastaze, dok je IF relativno neosetljiv na ove enzime (48). Oslobođeni vitamin B12 vezuje se za IF (46). Ovaj protein je specifičan za kobalamin, tj. za forme koje sadrže intaktan DMB i na taj način se sprečava apsorpcija degradiranih oblika vitamina B12 (49). I sam kompleks IF-Cbl veoma je otporan na digestiju i prolazi kroz intestinum sve dok ne dođe do

receptora za IF u ileumu (50). Specifično mesto na IF snažno se vezuje za receptor pri pH vrednosti 5.4 ili većoj u prisustvu jona  $\text{Ca}^{2+}$ . Zatim ceo kompleks sa receptorom ulazi u ćeliju procesom endocitoze (50). U lizozomima se kobalamin oslobađa iz kompleksa sa IF tako što se transportni protein razlaže (50). Glavna proteaza za degradaciju IF u lizozomima jeste katepsin L (51). Vitamin B12 se može iskoristiti u ćeliji ili se dalje transportovati u krv, odnosno u ekstracelularnu tečnost (52). U razvijenim zemljama dnevno se unese 5–30  $\mu\text{g}$  kobalamina. Od toga se 1–5  $\mu\text{g}$  apsorbuje (50, 53), manje od 250 ng se izluči urinom, a neapsorbovana količina eliminiše se fecesom (50).

Izlazak kobalamina iz enterocita veoma je važan korak za njegovu dalju distribuciju u organizmu (26). Međutim, taj proces još uvek nije u potpunosti definisan (26). Najverovatniji mehanizam uključuje proteolizu IF u lizozomima i vezivanje vitamina B12 za transkobalamin II (TCII) u manje kiselom delu ćelije (54). Postoje eksperimentalni dokazi za oslobađanje kobalamina i u slobodnom obliku (55). Potrebne su dodatne studije koje će utvrditi da li vitamin B12 napušta enterocite u kompleksu sa TCII, u slobodnom obliku ili na oba načina (26).

U krvi se kobalamin nalazi vezan za HC (80%) i TCII (20%). Dok se za HC vezuju i analozi kobalamina (46), TCII se specifično vezuje za forme kobalamina koje sadrže intaktan DMB (56, 57) i odgovoran je za dopremanje vitamina B12 do ćelija (58, 59). Kompleks TCII-Cbl ulazi u ćelije tako što se vezuje za receptor (46). Receptor uvlači kompleks TCII-Cbl endocitozom pomoću klatrinom prekrivenih udubljenja i vezikula (60). U kiselom endozomu oslobađa se receptor koji se vraća na površinu ćelije (60). Kompleks TCII-Cbl se endozomom prebacuje u lizozom gde se TCII razgrađuje, a kobalamin oslobađa u citoplazmu (61).

Uloga HC-a u organizmu još uvek nije u potpunosti rasvetljena. Smatra se da je uključen u skladištenje kobalamina i u uklanjanju nefunkcionalnih korinoida. Kobinamid je strukturni analog vitamina B12 kojem nedostaje nekleotidna petlja, ne može postati aktivan kofaktor u organizmu sisara i čini oko 40% korinskih jedinjenja u plazmi (46). Iako HC u krvi vezuje mnogo više kobalamina nego TCII, nije uključen u njegovo preuzimanje od strane većine ćelija u organizmu (62). Međutim, HC

omogućava ponovno korišćenje vitamina B12 oslobođenog iz tkiva (63) i dostavlja kobalamin i analoge jetri (63, 64). Iz jetre se kobalamin oslobađa u žuč i podleže enterohepatičnoj cirkulaciji (64). Oko 1.4 µg/dan kobalamina sekretuje se u žuč, od čega se u ileumu resorbuje oko 1 µg/danu (65). U žuči je kobalamin vezan za HC, a u intestinumu se kompleks HC-Cbl tretira na isti način kao i kompleks nastao varenjem hrane (64). Kada cirkulišuće koncentracije kobalamina prevazilaze kapacitet vezujućih proteina u krvi, višak se izlučuje urinom, ali se u većini slučajeva najveći gubitak kobalamina dešava putem fecesa (17).

Prosečan sadržaj kobalamina u organizmu odraslih je 2–5 mg. Od toga se 1 mg nalazi u jetri. Bubrezi su takođe bogati kobalaminom (50). Zbog zaliha u jetri i enterohepatične cirkulacije potreban je dug period za klinički manifestni deficit ukoliko se putem hrane ne unosi kobalamin ili se ne unosi njegova dovoljna količina. Međutim, ako pacijent ima poremećen sam proces apsorpcije, deficit se pojavljuje za 5–6 godina, jer je izgubljen kobalamin i iz hrane i iz žuči (50). Prema Evropskom telu za bezbednost hrane (engl. European Food Safety Authority, EFSA), adekvatan dnevni unos (engl. Adequate Intake, AI) kobalamina iznosi za starije od 18 godina 4 µg, za trudnice 4.5 µg, za žene koje doje 5 µg (66).

### **1.2.2. Intraćelijski metabolizam vitamina B12**

Nakon prelaska iz lizozoma u citosol, kobalamini sa različitim β aksijalnim ligandom moraju se prevesti u MetCbl i AdoCbl kako bi ispunili ulogu kofaktora MS u citosolu i MCM u mitohondrijama (46, 67).

O procesima unutar ćelije saznalo se na osnovu istraživanja na fibroblastima pacijenata koji su imali urođene greške u metabolizmu kobalamina (67). Pacijenti su imali širok opseg kliničkih i biohemijskih manifestacija i bilo je potrebno da se svrstaju u genetski definisane grupe (19). U tu svrhu je korišćen komplementarni test kako bi se utvrdilo da li se mutacije dešavaju u različitim genima, a pogođeni geni su obeleženi kao komplementarne grupe: cblA, cblB, cblC, cblD (varijante cblD, cblD1, cblD2), cblE, cblF, cblJ, cblG i mut (19, 68). Komplementarna grupa je odgovorna za sintezu proteina koji učestvuje u ćelijskom metabolizmu vitamina B12 i u svakoj od njih se može javiti više mutacija. Međutim, iako su geni identifikovani, funkcije njihovih

proizvoda, kao i međusobne interakcije, još uvek nisu u potpunosti razjašnjene. Takođe, postoji mogućnost za otkrivanjem i drugih gena uključenih u metabolizam vitamina B12 (19).

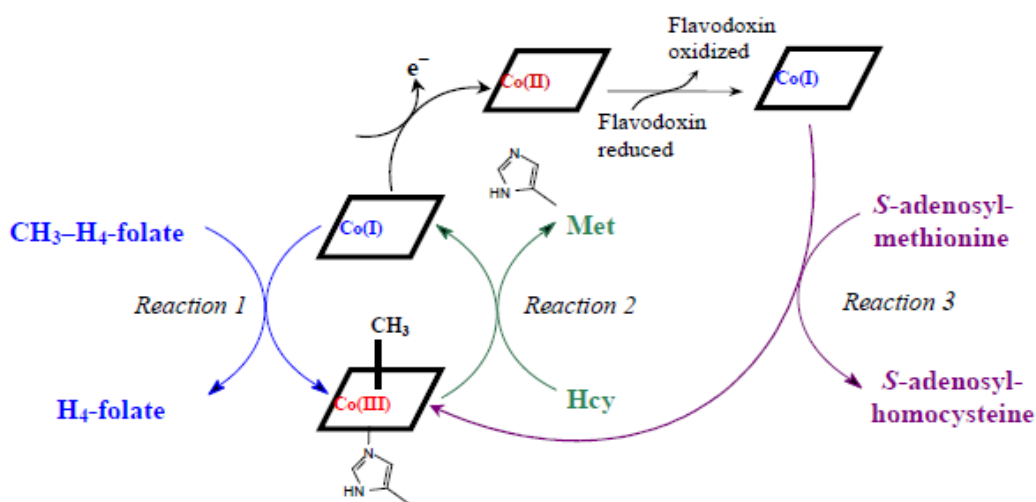
Komplementarne grupe ili geni *cbIF* i *cbIJ* kodiraju *LMBD1* (engl. probable lysosomal cobalamin transporter) i *ABCD4* (engl. ATP-binding cassette sub-family D member 4) – potencijalne transportere kobalamina iz lizozoma u citozol. Precizna uloga ovih transportera nije u potpunosti razjašnjena (46). Gen *CblC* kodira protein *MMACHC* (engl. Methylmalonic aciduria and homocystinuria type C protein), za koji se pretpostavlja da ima ulogu neposrednog akceptora kobalamina koji napušta lizozom (67). Takođe, odgovoran je za obradu gornjeg aksijalnog liganda i redukciju Co (67, 69).

Gen *cbID* kodira protein *MMADHC* (engl. Methylmalonic aciduria and homocystinuria type D protein). Pretpostavlja se da *MMADHC* ima ulogu u preuzimanju kobalamina od *MMACHC* i njegovog postavljanja na enzime *MS* i *MCM* (67). *MMADHC* se nalazi u citosolu i mitohondrijama (70). Na postojanje varijanata u poremećaju na *cbID* genu ukazali su Sourmala i saradnici koji su opisali 3 slučaja: dva pacijenta sa izolovanim deficitom *MS* (varijanta *cbID1*) i jedan pacijent sa *MCM* deficitom (varijanta *cbID2*) (71). Time je pokazano da *MMADHC* može biti odgovoran za razdvajanje metaboličkog puta vitamina B12 na citozolni i mitohondrijalni (19). Ukoliko se mutacija dogodi u 5' regionu *cbID* gena, posledica je izolovana metilmalonska acidurija (*MCM* deficit). Mutacija u središnjem regionu gena i na 3' kraju dovodi do kombinovane metilmalonske acidurije i homocistinurije (*MCM* i *MS* deficit). Mutacija u 3' regionu dovodi do izolovane homocistinurije (*MS* deficit) (19).

Za obradu kobalamina u citozolu bitne su komplementarne grupe *cbIG* i *cbIE*. Komplementarna grupa *cbIG* jeste gen *MS*. Metionin sintaza pripada metil transferazama. To je ključan enzim u ciklusu metionina. Preko metionina ćelija održava nivo S-adenozil-metionina, koji predstavlja donora metil grupe u sintezi DNA, RNA i u proteinskoj metilaciji. Metionin sintaza je uključena i u ciklusu folne kiseline (19). To je jedini enzim kod sisara koji može da koristi N<sup>5</sup>- metil-tetrahidrofolat (5-metil-THF) kao

donora metil grupe (72). U reakciji sinteze metionina iz homocisteina potreban je još jedan enzim, a to je reduktaza MS. Njen gen je obeležen kao *cblE* (46).

Kofaktor kob(I)alamin iz MS preuzima metil grupu sa 5-metil-THF pri čemu nastaje MetCbl i tetrahydrofolat (THF) (Slika 3, reakcija 1). Zatim se metil grupa prebacuje sa MetCbl na homocistein i ponovo nastaje kob(I)alamin, kao i metionin (Slika 3, reakcija 2). Pod mikroaerofilnim uslovima kob(I)alamin oksiduje se u kob(II)alamin, jednom na svakih 2000 ciklusa. Kob(II)alamin čini enzim MS neaktivnim. Zbog toga se vrši reaktivacija koja podrazumeva redukciju kob(II)alamina flavodoksinom i metilaciju u prisustvu reduktaze MS. Donor metil grupe za reaktivaciju kobal(I)amina je S-adenozil-metionin. Ponovo nastaje MetCbl i odmah se uključuje u katalitički ciklus (Slika 3, reakcija 3). Tokom ovog ciklusa Co se pojavljuje u sva tri oksidaciona stanja. Sam enzim MS prolazi kroz velike konformacione promene tokom reakcije koju katalizuje (73).



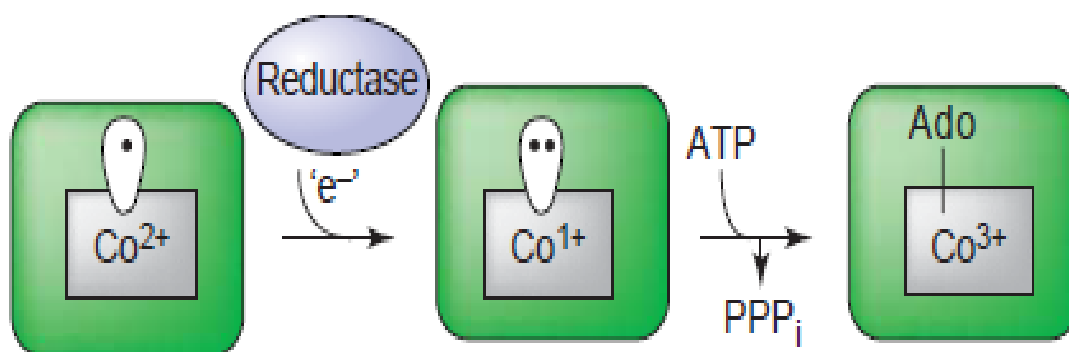
**Slika 3. Prevođenje homocisteina u metionin u prisustvu folata<sup>3</sup>**

Komplementarna grupa mut predstavlja gen za MCM (19). Istraživanja na bakterijama ukazuju da humani MCM ne funkcioniše sam, već u kompleksu sa drugim proteinima: MMAA (engl. Methylmalonic aciduria type A protein) i MMAB (engl. Corrinoid adenosyltransferase) (19). Protein MMAB je enzim ATP: kob(I)alamin

<sup>3</sup>Randaccio L, Geremia S, Demitri N, Wuerges J. Vitamin B12: Unique Metalorganic Compounds and the Most Complex Vitamins. *Molecules* 2010;15(5):3228 (73)

adenoziltransferaza (ATR), čiji je gen *cblB* (19). Enzim ATR katalizuje transfer 5'-deoksiadenozil grupe iz ATP (adenozin trifosfat) na kob(I)alamin kako bi se formirao AdoCbl (19). Protein MMAA takođe je enzim i pripada familiji guanozin trifosfataza (19). Koristići energiju GTP (guanozin trifosfat), može da „izgura” zaostali neaktivni kob(II)alamin iz aktivnog mesta enzima MCM. Njegov gen je *cblA* (46).

Da bi se dobio AdoCbl, vitamin B12 unet hranom mora prvo da se redukuje u kob(II)alamin. Na ulasku u mitohondrijalni matriks, kob(II)alamin je bez vezane nukleotidne petlje i vezuje se za enzim ATR (Slika 4). Kobalt u oksidacionom stanju +2 obično sadrži vezan DMB. Ovakvo neobično vezivanje podiže redoks potencijal kob(II)alamina na nivo moguće redukcije pomoću flavina. Time se eliminiše potreba za reduktazom koja bi kob(II)alamin prevela u reaktivni intermedijer kob(I)alamin (19, 74). Enzim ATR vrši transfer 5'-deoksiadenozil grupe iz ATP na kob(I)alamin kako bi se formirao AdoCbl (19). Enzim ATR je kod ljudi u kompleksu sa  $Mg^{2+}$ ATP i kob(II)alaminom (73). Na osnovu ATR iz bakterije *Methylobacterium extorquens*, zaključeno je da se ATP i AdoCbl vezuju negativno kooperativno. Samo se 2 od 3 aktivna mesta uvek koriste, što predstavlja alosternu strategiju kontrole dostavljanja AdoCbl. Vezivanje jednog molekula ATP za ATR pokreće izbacivanje jednog molekula AdoCbl na MCM, i to sa aktivnog mesta sa manjim afinitetom za AdoCbl. Ovakav postepen način prenosa kofaktora na enzim sprečava njegov gubitak u citozolu i prelazak u manje povoljnu konformaciju sa vezanom nukleotidnom petljom (46).



**Slika 4. Sinteza adenzilkobalamina<sup>4</sup>**

<sup>4</sup>Yamanishi M, Vlasie M, Banerjee R. Adenosyltransferase: an enzyme and an escort for coenzyme B12? Trends Biochem Sci 2005;30(6):304–308 (76)



Metilmalonil-CoA mutaza katalizuje 1,2 rearanžman, u kome se atom vodonika i grupa sa susednog ugljenikovog atoma razmenjuju (73, 75). Propionil-CoA, koji nastaje degradacijom timina, valina, metionina i masnih kiselina sa neparnim brojem ugljenikovih atoma, karboksiluje se i prelazi u (S)-metilmalonil-CoA, koji epimerizuje u R-izomer. Metilmalonil-CoA mutaza vrši rearanžman R izomera i nastaje sukcinil-CoA, koji učestvuje u ciklusu trikarboksilnih kiselina (21).

Da bi MCM dobila svoj kofaktor, mora da bude u interkciji sa ATR, kao i da ova dva enzima imaju različit afinitet prema AdoCbl (76). Nakon vezivanja metilmalonil-CoA, u AdoCbl se vrši homolitičko cepanja Co-C veze, pri čemu nastaju adenzil i kob(II)alamin radikali. Adenzil radikal izvlači H iz supstrata metilmalonil-CoA, koji prelazi u radikal, a od adenzil radikala nastaje 5'-deoksiadenozin. U metilmalonil-CoA radikalima razmenjuju se H i COS-CoA grupa sa susednih ugljenikovih atoma i nastaje sukcinil-CoA radikal. Zatim, sukcinil-CoA radikal izvlači vodonik iz 5'-adenozina i prelazi u sukcinil-CoA; adenzil radikal reaguje sa prvobitno nastalim kob(II)alamin radikalom, pri čemu ponovo nastaje AdoCbl (73). Dešava se da 5'-deoksiadenozin „pobegne” tokom reakcije koju katalizuje MCM, zbog čega nastaje neaktivni enzim. Tada se uključuje MMAA i, koristeći energiju GTP, može da „izgura” zaostali neaktivni kob(II)alamin iz aktivnog mesta enzima (46). Zatim se AdoCbl direktno prebacuje sa MMAB na kompleks MCM:MMAA-GTP u procesu koji zahteva vezivanje ATP za MMAB i hidrolizu GTP od strane MMAA (19).

### **1.3. Deficit vitamina B12**

Kada se govori o deficitu vitamina B12 potrebno je razdvojiti pojmove klinički manifestni oblik i biohemijski ili subklinički deficit kobalamina (SCCD). Kod kliničkog oblika prisutni su simptomi i znaci deficita, dok kod subkliničkog deficita samo biohemijski markeri ukazuju na deficit vitamina B12.

#### **1.3.1. Klinički deficit vitamina B12**

Dijagnoza klinički manifestnog deficita vitamina B12 postavlja se na osnovu kliničke slike i laboratorijskih testova. Kliničku sliku čine hematološki, neurološki i gastrointestinalni simptomi i znaci deficita. Hematološke manifestacije su dominantne i

obuhvataju: makrocitnu anemiju i opšte simptome same anemije (malaksalost, zamaranje, angiozne smetnje, simptomi srčane bolesti) (77). S obzirom na to da se anemija razvija postepeno, simptomi postaju izraženiji kada hematokrit značajno padne (50). U rezultatu krvne slike uočava se makrocitoza sa anemijom ili bez nje, leukopenija i trombocitopenija kod pacijenata sa težim stepenom anemije (77). Makrocitna anemija je prisutna kod manje od 20% pacijenata sa niskim koncentracijama kobalamina (78).

Na razmazu periferne krvi prisutni su anizocitoza i poikilocitoza sa makroovalocitima, hipersegmentovani neutrofil i trombociti bizarnog izgleda, a na preparatu koštane srži uočava se hipercelularnost, jedarno-citoplazmatska asinhronija, „džinovski” metamijelociti (77).

Kada se konstatuje prisustvo makrocitne anemije, potrebno je uraditi diferencijalnu dijagnostiku, jer makrocitna anemija ne mora biti posledica samo deficita kobalamina. Međutim, ona koja to jeste mora biti megaloblastne prirode (50). Sve megaloblastne anemije, bez obzira na uzrok, u osnovi imaju poremećaj u sintezi deoksiribonukleinske kiseline (DNK). Kod nedostatka kobalamina ili folne kiseline, primarni uzrok je izostanak konverzije deoksiuridin-monofosfata u deoksitimidin-monofosfat. Enzim DNK polimeraza ne pravi razliku između ova dva nukleotida i zato se u DNK ugrađuje deoksiuridin trifosfat. Čelija pokušava da ispravi grešku, ali nema potreban nukleotid, zbog čega nastaju fragmenti DNK i kasnije smrt ćelije (50). Megaloblastne anemije karakteriše normalno sazrevanje citoplazme, ali je replikacija DNK i deoba ćelija usporena, zbog čega nastaju velike, megaloblastne ćelije (77). Promene su najizraženije u ćelijama koje se brzo dele kao što su ćelije hematopoetskog sistema i epitelne ćelije gastrointestinalnog trakta (77).

Megaloblastna anemija se obično sporo razvija. Međutim, postoji i akutni oblik deficita kobalamina, kod koga se hematološke manifestacije pojavljuju tokom nekoliko dana (trombocitopenija, leukopenija, megaloblastna koštana srž). Najčešći uzročnik akutnog oblika deficita vitamina B12 jeste primena azotsuboksida kao anestetika. Primenom azotsuboksida dolazi do inaktivacije MetCbl (50).

Hematološke manifestacije izazvane nedostatkom kobalamina moguće je u velikoj meri ukloniti davanjem folne kiseline. Međutim, anemiju izazvanu deficitom

folata nije moguće korigovati kobalaminom (50). To ukazuje da je kod megaloblastne anemije izazvane nedostatkom kobalamina u osnovi poremećaj u metabolizmu folata (79).

Kod 75–90% pacijenata sa deficitom kobalamina prisutni su neurološki simptomi (80). Mogu se javiti pre hematoloških simptoma, naročito kod starijih od 60 godina (77), ili kao jedini prisutni (81). Lindebaum i saradnici su u grupi od 141 pacijenta sa neurološkim simptomima zbog deficita kobalamina ustanovili da 28.4% nije imalo anemiju ili makrocitozu, a kod 13.5% pacijenata hematokrit i srednja zapremina eritrocita (engl. Mean Corpuscular Volume, MCV) bili su normalni (82). Nije poznato zbog čega stepen izraženosti megaloblastne anemije ne prati stepen neurološke disfunkcije kod deficita kobalamina (82). Neurološki simptomi deficita kobalamina raznovrsni su (77, 83, 84), jer dolazi do demijelinizacije i aksonalne degeneracije više različitih nervnih struktura, poput perifernih nerava, zadnjih i bočnih stubova kičmene moždine i malog mozga (77). Simptomi se u početku manifestuju kao gubitak proprioceptivnih i vibratornih senzacija, izraženijih na donjim ekstremitetima, sa pojavom ataksije. Sa daljom progresijom deficita dolazi do poremećaja u osećaju dodira, bola, temperature. Od psihičkih poremećaja može se javiti paranoja, konfuzija, spastična ataksija, delirantno stanje (77). Kakve će se neurološke manifestacije javiti zavisi i od samog uzroka deficita vitamina B12 i od starosti pacijenta. Na primer, neurološka oštećenja koja se javljaju u pernicioznoj anemiji retko se sreću kod deficita vitamina B12 izazvanog njegovim smanjenim unosom. Izuzetak su novorođenčad, naročito ona koja su hranjena mlekom majki koje su striktni vegeterijanci (85).

Za razliku od hematoloških simptoma, neurološke manifestacije mogu biti ireverzibilne ukoliko dugo traju ili se hematološki simptomi leče folnom kiselinom umesto kobalaminom (77). Hematološki manifestacije deficita kobalamina mogu se ukloniti pomoću folne kiseline, ali ne i neurološki simptomi. Martin i saradnici (86) navode u svom istraživanju značajnu korelaciju između trajanja kognitivnih simptoma deficita i odgovora na terapiju.

Gastrointestinalne manifestacije obuhvataju bolnu osetljivost, blagu otečenost i izraženo crvenilo jezika, ponekad anoreksiju, blag gubitak u telesnoj težini, dijareju.

Kod deficita folne kiseline simptomi su slični, ali izraženiji, česta je dijareja, a nekad se javljaju heiloza i glositis (77).

### **1.3.2. Subklinički deficit vitamina B12**

Subklinički deficit vitamina B12 (engl. Subclinical Cobalmin Deficiency, SCCD) predstavlja promene u koncentraciji biohemijskih markera statusa kobalamina u vidu povećanih nivoa metilmalonske kiseline (MMA) i homocisteina (Hcy), tj. pada holotranskobalamina II (holo-TCII) i ukupnog kobalamina u krvi bez kliničkih manifestacija (84, 87–90).

Ralph Carmel i saradnici su tokom 80-ih godina prošlog veka otkrili SCCD u seriji studija kod pacijenata bez anemije, makrocitoze ili drugih simptoma deficita (91–95). Koristili su deoksiuridin supresioni test (92), za koji je potvrđeno da je podjednako osetljiv na deficit kobalamina, kao i MMA i Hcy (96). Njihovo otkriće je ukazalo da ranije uočene niske koncentracije kobalamina nisu bili lažno niski rezultati (97, 98).

Da li će osoba razviti klinički manifestni ili subklinički deficit zavisi od samog uzroka deficita (99). Uzrok obično diktira da li će deficit biti stalan i progresivan (npr. perniciozna anemija) ili prolazan i kratkotrajan (98). Složen metabolički put vitamina B12 od unosa u organizam do intracelularnih reakcija koje katalizuje zahteva učesće više proteina: transportera, receptora i enzima. Bilo koja od komponenti na putu kobalamina ka ćeliji, ukoliko ne funkcioniše na odgovarajući način dovodi do malapsorpcije kobalamina. I to je glavni uzrok kliničkog deficita. Zato je veoma važno da lekar obrati pažnju na postojanje simptoma i znakova drugih bolesti koje mogu dovesti do malapsorpcije vitamina B12. Uzrok SCCD je obično nepoznat (99). Klinički deficit ima progresivan tok (99), dok SCCD može biti takav da postepeno ili brzo pređe u klinički deficit, da oscilira između normalnog i subkliničkog stanja ili da dođe do potpune remisije usled poznatog ili nepoznatog razloga (98). Postoji sumnja o povezanosti SCCD i rizika za neurološku i kognitivnu disfunkciju (98). Istraživanja su ukazala na blage elektrofiziološke promene u sklopu SCCD (88). Terapija je poboljšavala stanje pacijenta (88). Potrebna su klinička ispitivanja kako bi se utvrdilo da li statistička povezanost odražava i uzročno posledičnu povezanost (98). Kod SCCD

obično ne postoji malapsorpcija kao posledica nedostatka IF (98), koji je najčešći uzrok kliničkog deficita u razvijenim zemljama (84).

Oko 30–50% slučajeva SCCD povezano je sa nemogućnošću oslobađanja kobalamina iz hrane (engl. Food Bound Cobalamin Malabsorption, FBCM) (98, 100). To je stanje sniženih vrednosti kobalamina u krvi, uz unos adekvatnih količina kobalamina, negativan Šilingov test i odsustvo anti-IF antitela (101). Osobe sa FBCM mogu da apsorbuju vitamin B12 iz oralnih preparata, ali ne mogu da ga oslobode iz hrane. To je uglavnom posledica hirurških intervencija na želucu, gastritisa, gastrične atrofije, infekcije *Helicobacter pylori* (102–105) ili upotrebe lekova kojima se blokira sekrecija želudačne kiseline (106). Dijagnoza FBCM se obično postavlja isključivanjem ostalih uzroka sniženih vrednosti kobalamina u krvi (101). S obzirom na to da je Šilingov test povučen iz upotrebe, teško je razdvojiti malapsorpciju od nemogućnosti oslobađanja kobalamina iz hrane (99).

Usled visoke prevalencije postoji veliko interesovanje za istraživanje SCCD i njegovih potencijalnih posledica (99). Činjenice i terapijske preporuke u vezi sa kliničkim deficitom ne mogu se primenjivati na SCCD, kao što se rezultati populacionih istraživanja za SCCD ne mogu primeniti na pacijente sa kliničkim deficitom (98, 107). Pacijenti sa SCCD predstavljaju poseban izazov za lekare, jer nije poznato da li će razviti klinički manifestni deficit ili ostati sa hronično niskim, ali stabilnim statusom vitamina B12, bez posledica po zdravlje (98). Prednosti ranog otkrivanja SCCD još uvek nisu poznate. Postoji mogućnost povećanog broja pogrešnih dijagnoza, jer ne postoji zlatni standard za biohemijske markere statusa kobalamina na čijim se promenama zasniva dijagnoza SCCD (98). Međutim, otkrivanje ranih promena u statusu vitamina B12 u populaciji koja ima rizik za pojavu klinički manifestnog deficita može biti značajno (90, 98). Randomizovane studije mogu biti neetične kada je u pitanju klinički deficit. Međutim, to ne važi za SCCD, gde su neophodne. Zbog usmeravanja pažnje na populacione grupe sa najvećim rizikom za deficit kobalamina, može se javiti potreba za utvrđivanjem načina kako razlikovati SCCD bez malapsorpcije od početne faze perniciozne anemije. Takođe, potrebni su raznovrsniji i senzitivniji neurološki i kognitivni testovi (98).

### 1.3.3. Mehanizam nastanka deficita vitamina B12

Victor Herbert je predložio model nastanka deficita kobalamina i način na koji se menjaju biomarkeri (108, 109). Prema tzv. Herbertovom modelu, pre nego što nastane deficit, postoje 3 faze: višak kobalamina, rani pozitivan balans i normalna faza. Zatim sledi rani negativni balans, iscrpljivanje zaliha kobalamina, poremećaj eritropoeze i anemija izazvana deficitom vitamina B12. Deo normalne faze i deo ranog negativnog balansa čine tzv. sivu zonu. Prema ovom modelu, kada uzrok deficita kobalamina počne da deluje, nivo holo-TCII počinje da se smanjuje još u normalnoj fazi. Koncentracije vitamina B12 u eritrocitima, leukocitima i jetri počinju da se smanjuju u fazi iscrpljivanja zaliha. Hipersegmenatacija neutrofila se javlja u fazi neefektivne eritropoeze, dok se makroovalociti i povećan MCV pojavljuju u fazi anemije. Homocistein i MMA su definitivno povećani u fazi anemije, dok je nepoznata njihova promena u fazi neefikasne eritropoeze (110).

Nedostatak ovog modela je taj što polazi od pretpostavke da će holo-TCII uvek biti prvi biomarker koji će ukazati na deficit, tj. da se najmanja normalna koncentracije koja označava početak deficita može univerzalno definisati za sve osobe. Prema mišljenju Goldinga (110), Herbertov model nema uporište u samoj fiziologiji metabolizma vitamina B12. U samom epicentru regulacije metabolizma kobalamina nalaze se jetra i enterohepatična cirkulacija (110).

Kako će se i da li će se holo-TCII uopšte promeniti zavisi od uzroka deficita. Golding (110) u svom preglednom članku predlaže novu hipotezu nastanka deficita i promene biomarkera. Po njegovom mišljenju model deficita sastoji se iz 3 faze: normalna, faza iscrpljivanja zaliha i metabolički deficit. Početak deficita vitamina B12 ili prelazak iz normalne faze u rani negativni balans nije definisan striktnim padom holo-TCII sa jednog nivoa na drugi, već promenom u ukupnom kobalaminu, holo-TCII ili metaboličkim markerima u odnosu na vrednosti koje su normalne za osobu (110). Dakle, model je orijentisan ka pojedincu, a ne ka populaciji.

Normalna faza je definisana adekvatnim unosom kobalamina, adekvatnim zalihama i adekvatnim metabolizmom, koji obezbeđuju normalno funkcionisanje ćelija. Faza iscrpljivanja se javlja zbog ili nedovoljnog unosa ili narušenog metabolizma

vitamina B12. Pritom se ne obezbeđuje dovoljna količina kobalamina za ćelije zbog čega zalihe počinju da se troše. U fazi metaboličkog deficita narušen metabolizam kobalamina ili iscrpljene zalihe ne mogu da obezbede dovoljno kobalamina za funkcionisanje ćelija. U ovoj fazi dolazi do pada holo-TCII i povećanja MMA ili Hcy. Prema ovom modelu bilo koji pad holo-TCII ispod nivoa koji je normalan za određenu osobu mora dovesti do porasta nivoa metaboličkih markera. Koliko će se to brzo desiti zavisi od intracelularnih depoa kobalamina. Neke ćelije imaju veće zalihe, a neke poput nervnih ćelija ili granulocita brzo potroše intracelularni kobalamin. U ovom slučaju se model deficita prema Goldingu slaže sa Herbertovim modelom (110). Prema Herbertovom modelu, čim količina kobalamina na holo-TCII opadne, dolazi do poremećene DNA sinteze u neutrofilima i hipersegmenacije jedra. Kod svih ćelija neće istovremeno doći do pojave posledica deficita kobalamina; samim tim može proći izvesno vreme dok se MMA ili Hcy ne povećaju (108).

Golding smatra da individualni pad u nivou holo-TCII predstavlja kraj faze iscrpljivanja i početak faze metaboličkog deficita (110). Veličina i brzina pada u koncentraciji holo-TCII zavise od uzroka deficita i karakteristika samog organizma. Ukoliko je uzrok deficita smanjen unos kobalamina putem hrane, smanjeno oslobađanje kobalamina iz hrane, poremećaj u intracelularnom metabolizmu vitamina B12, nivo holo-TCII počinje da pada tek kada se iscrpe rezerve u jetri i opadne nivo HC. Ukoliko dođe do naglog prekida enterohepatične cirkulacije kobalamina, npr. u slučaju hirurškog uklanjanja parijetalnih ćelija i naglog prekida u proizvodnji IF, u slučaju uklanjanja duodenuma ili terminalnog ileuma, odmah će nastupiti faza metaboličkog deficita, tj. doći će do naglog pada holo-TCII i naglog porasta MMA i/ili Hcy. U slučaju perniciozne anemije postoji postepen pad u proizvodnji IF, ali, kao u prethodnom slučaju, odmah će nastupiti faza metaboličkog deficita jer je narušena enterohepatična cirkulacija. Takođe, dolazi do gotovo istovremenog pada holo-TCII i porasta MMA i/ili Hcy, ali su promene sporije nego u prethodnom slučaju (110).

Može se primetiti prema Goldingovom modelu da se nivo ukupnog kobalamina ili prvi smanjuje ili zajedno sa holo-TCII (110). To je u suprotnosti sa tvrdnjama da su MMA i Hcy osetljiviji pokazatelji deficita kobalamina i da se povećavaju pre nego što koncentracija vitamina B12 postane subnormalna (111). Međutim, Goldingov model

nastanka deficita se zasniva na individualnoj promeni nivoa biomarkera, koji mogu ostati iznad subnormalnog nivoa, a da za tu osobu predstavljaju negativan balans kobalamina (110). Ovakav pristup u interpretaciji nastanka deficita kobalamina, kada se posmatra individualna promena nivoa biomarkera i gde nema poređenja sa utvrđenim referentnim intervalima, dovodi u pitanje potrebu za zlatnim standardom u testiranju deficita kobalamina. Sa druge strane, individualni pristup zahteva da se pacijentu odrede nivoi biomarkera pre nastanka deficita kako bi se mogla uočiti promena u njihovoj koncentraciji (110). Potencijalna alternativa određivanju pojedinačnih biomarkera jeste njihovo kombinovanje u jedan (112), ali takav pristup bi trebalo proveriti na individualnom nivou uzimajući u obzir različite uzroke deficita (110).

#### **1.3.4. Prevalenca deficita vitamina B12**

U literaturi se mogu naći različiti rezultati za prevalencu deficita kobalamina. To je posledica različitih kriterijuma na osnovu kojih je deficit definisan, kao i populacije u kojoj je deficit ispitivan. Kada su u pitanju kriterijumi za utvrđivanje deficita potrebno je napraviti razliku između istraživanja prevalence sniženih ili povećanih nivoa biomarkera u krvi i prevalence prisustva simptoma i znakova deficita kobalamina. U opštoj populaciji nedostatak vitamina B12 sa klasičnim hematološkim i neurološkim manifestacijama relativno je redak. Sa druge strane, marginalni status vitamina B12 u vidu promenjenih nivoa biomarkera u odsustvu simptoma deficita jeste češći (84).

Do sada su sprovedena manja epidemiološka i nacionalna istraživanja u određenom broju zemalja. Kao kriterijum za deficit vitamina B12 korišćeni su različiti nivoi biomarkera i određivani su različitim metodama što otežava poređenje rezultata. Na primeru istraživanja sprovedenog u SAD može se videti kako prevalenca varira sa promenom koncentracija biomarkera. Na osnovu koncentracija kobalamina:  $< 148$  pmol/L,  $< 200$  pmol/L i  $< 256$  pmol/L, prevalenca nedostatka je bila 2.9%, 10.6% i 25.7%. Ukoliko se koncentracija MMA primeni kao kriterijum, prevalenca je iznosila 2.3% za MMA  $> 0.376$  nmol/L i 5.8% za MMA  $> 271$  nmol/L (113).

U populaciji starijih ispitanika u okviru Framingham studije, prevalenca je bila 11.3% za nivo kobalamina  $< 258$  pmol/L sa povećanim nivoima MMA i 5.7% sa povećanim nivoima Hcy (114). U istraživanjima sprovedenim u Velikoj Britaniji



uočeno je da prevalenca koncentracija kobalamina  $< 150$  pmol/L (203 ng/L) raste nakon 69 godina starosti (115). Prema vrednostima MMA 6% ispitanika starijih od 65 godina imalo je definitivni metabolički deficit vitamina B12 (MMA  $\geq 750$  nmol/L), a 16% verovatni metabolički deficit (MMA 450–750 nmol/L) (116).

Prevalenca deficita, kao i marginalnih vrednosti, mnogo je veća u afričkim i azijskim zemljama. Prema istraživanju McLean i saradnika (117), 40% dece školskog uzrasta u Keniji imalo je koncentraciju vitamina B12  $< 148$  pmol/L. Prema drugom istraživanju (118) koncentraciju kobalamina  $< 125$  pmol/L imalo je 30.5% dece, a koncentraciju 125–221 pmol/L 37.7% dece. U Indiji je 47% odraslih imalo kobalamin  $< 150$  pmol/L, 77% Hcy  $> 15$   $\mu$ mol/L i 73% MMA  $> 260$  nmol/L (119).

U cilju adekvatne procene prevalencije nedostatka kobalamina, Svetska zdravstvena organizacija (engl. World Health Organisation, WHO) preporučuje sprovođenje reprezentativnijih nacionalnih istraživanja, koja će primeniti standardizovane metode određivanja vitamina B12, kao i predložene univerzalne referentne vrednosti, npr. vitamin B12  $< 150$  pmol/L ili  $< 203$  ng/L (85).

## **1.4. Laboratorijska dijagnostika deficita B12**

Testovi za ispitivanje statusa kobalamina mogu se podeliti na: hematološke, biohemijske, funkcionalne i testove za utvrđivanje uzroka deficita.

### **1.4.1. Hematološki testovi**

Hematološki testovi za ispitivanje deficita vitamina B12 obuhvataju: krvnu sliku, broj retikulocita, razmaz periferne krvi i biopsiju koštane srži.

#### **1.4.1.1. Krvna slika**

U slučaju megaloblastne anemije kao posledice nedostatka kobalamina ili folata u rezultatu krvne slike uočava se: makrocitoza, anemija, leukopenija i trombocitopenija (77).

Makrocitoza označava prisustvo eritrocita čija je zapremina veća od normalne. Izražava se preko eritrocitnog indeksa, tj.  $MCV > 100$  fL (77, 120). Na oblik i veličinu eritrocita utiče više činilaca: nasledni faktori, status gvožđa, inflamacija, status kobalamina i folata, bolesti, upotreba određenih lekova (120). U zavisnosti od toga koji je izraženiji, eritrocit može biti smanjene, normalne ili povećane zapremine. Zato istovremeno prisutan nedostatak gvožđa, talasemija ili hronična inflamacija mogu prikriti promene MCV koje se očekuju kao posledica deficita kobalamina (50).

Povećan MCV nije specifičan znak megaloblastoze izazvane deficitom kobalamina i/ili folata (120). Prema istraživanju Keenana,  $MCV > 100$  fL nije osetljiv niti specifičan znak ni za jednu bolest, ali treba da probudi sumnju na postojanje patologije (121). Do sličnog zaključka došao je i Breedveld sa saradnicima (122).

Podela na megaloblastne i nemegaloblastne uzročnike olakšava evaluaciju makrocitne anemije (120). Najčešći megaloblastni uzročnici su: nedostatak vitamina B12 i folne kiseline (50), a nemegaloblastni: alkoholizam, određeni lekovi, hipotiroidizam, bolesti jetre, hemoliza, hemoragija, mijelodisplazija, splenektomija, hronične opstruktivne bolesti pluća (120). Uzroci makrocitoze, kao i njihova prevalenca, variraju u zavisnosti od populacije u kojoj su istraživani. Zato je potrebno dodatnim testovima izvršiti diferencijalnu dijagnostiku makrocitne anemije (120).

Očekivano je da je makrocitna anemija sa niskim koncentracijama kobalamina u serumu potvrda deficita vitamina B12 (80). Sa druge strane, odsustvo povećanog MCV ne može se koristiti kao siguran znak da nema deficita vitamina B12 (123). Zbog velikog životnog veka eritrocita (120 dana), hematološke manifestacije mogu biti i samo odložene, tj. mogu biti odsutne u trenutku testiranja i pojaviti se kasnije. U takvim slučajevima će koeficijent varijacije veličine eritrocita (engl. Red Cell Distribution Width, RDW) ukazati na anizocitozu (80).

Kada je pacijentov MCV u donjem delu normalnog opsega potrebno je više vremena kako bi se ispoljila makrocitoza u odnosu na pacijente sa MCV u gornjem delu normalnog opsega kod kojih će se makrocitoza pojaviti i bez anemije. Zato je za svakog pojedinačnog pacijenta bitna promena u bazičnoj vrednosti njegovog MCV koja ukoliko je  $\geq 5$  fL, ukazuje na makrocitnu promenu (80).

Međutim, ukoliko nema makrocitne anemije u rezultatu krvne slike, laboratorijska procena statusa kobalamina najčešće neće biti inicirana. Rezultat toga je značajan procenat pacijenata koji neće dobiti adekvatnu terapiju (80). Prema istraživanju Carmela (124), od 70 pacijenata sa potvrđenom pernicioznom anemijom, 19% nije bilo anemično, a 33% nije imalo makrocitozu. Razlozi odsustva hematoloških manifestacija još uvek se istražuju. Kao moguća objašnjenja navode se istovremeno prisutan deficit gvožđa, talasemija, anemija hronične bolesti (50, 125), životni vek eritrocita i individualna vrednost pacijentovog MCV (80).

Makrocitoza može biti i lažno pozitivan nalaz u krvnoj slici. To se dešava u prisustvu hladnih aglutinina, koji dovode do slepljivanja eritrocita, koji se na hematološkom analizatoru broje kao jedna velika ćelija (126). U slučaju hiperglikemije eritrociti su ispunjeni glukozom zbog čega su hipertonični u odnosu na izotoničan diluent kojim se razblažuje uzorak krvi. Voda iz diluenta ulazi u eritrocite brže nego što glukoza izlazi iz njih, ćelije bubre i nemaju dovoljno vremena da se vrate u nativni oblik. Zato se dobija lažno povećan MCV (127). U slučaju izražene leukocitoze povećan je turbiditet uzorka, zbog čega analizator precenjuje veličinu eritrocita (128).

Pod uticajem deficita vitamina B12, pored eritrocita, nalaze se i druge ćelije krvi. Prisutan je određen stepen trombocitopenije i/ili neutropenije. Pacijenti mogu imati petehije usled niskog broja trombocita ili infekcije zbog neutropenije. Nivo trombocitopenije i neutropenije, kada su prisutne, odgovara stepenu anemije (80).

#### **1.4.1.2. Broj retikulocita**

Retikulociti predstavljaju prelaznu formu između eritroblasta sa jedrom i zrelih eritrocita bez jedra. Određivanje njihovog broja koristi se za razlikovanje hipo-, hiper- i normo- regenerativnih oblika anemije, procenu aktivnosti koštane srži u normocitnim anemijama (gubitak krvi, intravaskularna hemoliza), praćenje odgovora na terapiju u deficitarnim anemijama (deficit gvožđa, vitamina B12, folne kiseline), evaluaciju anemije nakon terapije eritropoetinom (129).

U megaloblastnim anemijama, usled nedostatka folne kiseline ili kobalamina, broj retikulocita je normalan ili snižen. Povećan broj se javlja kao odgovor na terapiju ili usled akutne hemoragije, koja se pojavila tokom nedostatka vitamina (129). Porast

broja retikulocita 6. dana od početka terapije potvrđuje dobar odgovor na terapiju u slučaju deficita vitamina B12 ili folata. U slučaju neadekvatnih rezervi gvožđa odgovor može biti nejasan (65). Iako se analize broja retikulocita i razmaza periferne krvi preporučuju u evaluaciji makrocitne anemije, ne postoje posebne preporuke kada je u pitanju makrocitoza bez anemije (130).

#### **1.4.1.3. Razmaz periferne krvi**

Ukoliko se na osnovu anamneze, fizičkog pregleda i biohemijskih testova ne može posumnjati na konkretan uzrok makrocitne anemije, radi se analiza razmaza periferne krvi. U većini laboratorija to je još uvek manuelna analiza koja zahteva vreme, kao i obučenosť i iskustvo laboratorijskog osoblja za interpretaciju rezultata. Razmaz treba da potvrdi rezultat krvne slike i da uputi na mogući uzrok makrocitne anemije.

Megaloblastne promene se na razmazu periferne krvi uočavaju kao veliki i ovalni eritrociti (makroovalociti), dobro hemoglobinizovani (77). U težim oblicima megaloblastne anemije, eritrociti su i bazofilno punktirani sa ostacima jedra (Cabot prsteni i Howell–Jolly telašca). Kada je hematokrit ispod 20%, u krvi se mogu pojaviti eritroblasti sa megaloblastnim izgledom jedra (50). Prisutna je anizocitoza i poikilocitoza. Trombociti su često bizarnog izgleda (77).

Megaloblastne promene na neutrofilima izazvane deficitom kobalamina ili folata uočavaju se kao prisustvo više od 5% neutrofila sa 5 lobusa u jedru ili čak samo jednog neutrofila sa više od 5 lobusa (80). Hipersegmentiranost neutrofila se smatra najranijom morfološkom promenom u krvi u megaloblastnoj anemiji, kao i poslednjom karakteristikom koja iščezava kada se primeni terapija (80, 131).

Istovremeno prisustvo drugih uzročnika anemije, kao što su deficit gvožđa, talasemija i inflamacija mogu maskirati morfološke promene ćelija izazvane megaloblastnom anemijom (50). U rezultatu krvne slike može izostati npr. povećanje MCV, koji može biti i snižen ukoliko je komponenta koja dovodi do mikrocitoze izraženija. Razmaz može pokazivati mikrocite i makroovalocite istovremeno (dimorfna anemija) ili samo mikrocite (50). Kada je megaloblastna anemija maskirana mikrocitnom anemijom, na razmazu se mogu uočiti hipersegmentovani neutrofili, a u

koštanoj srži džinovski metamijelociti (50). Kod makrocitoze izazvane nemegaloblastnim uzročnicima, eritrociti su okrugli, prisutni su makroretikulocti (120, 132).

Da li će sve promene u krvi i u kojoj meri biti izražene zavisi od težine i trajanja deficita vitamina. Hipersegmentiranost neutrofila nije dovoljno osetljiva za umereni deficit kobalamina (133). Promene na razmazu periferne krvi obično se vide kada je prisutna anemija (130). Prema studiji Breedvelda i saradnika, 30% od 70 pacijenata je imalo megaloblastnu eritropoezu, koju je bilo teško uočiti u perifernoj krvi (122).

#### **1.4.1.4. Biopsija koštane srži**

Biopsija koštane srži predstavlja invazivnu proceduru i koristi se kada se na osnovu hematoloških i biohemijskih testova ne može ustanoviti uzrok makrocitne anemije. Međutim, u slučaju izostanka hematoloških manifestacija značaj ispitivanja koštane srži nije poznat (134).

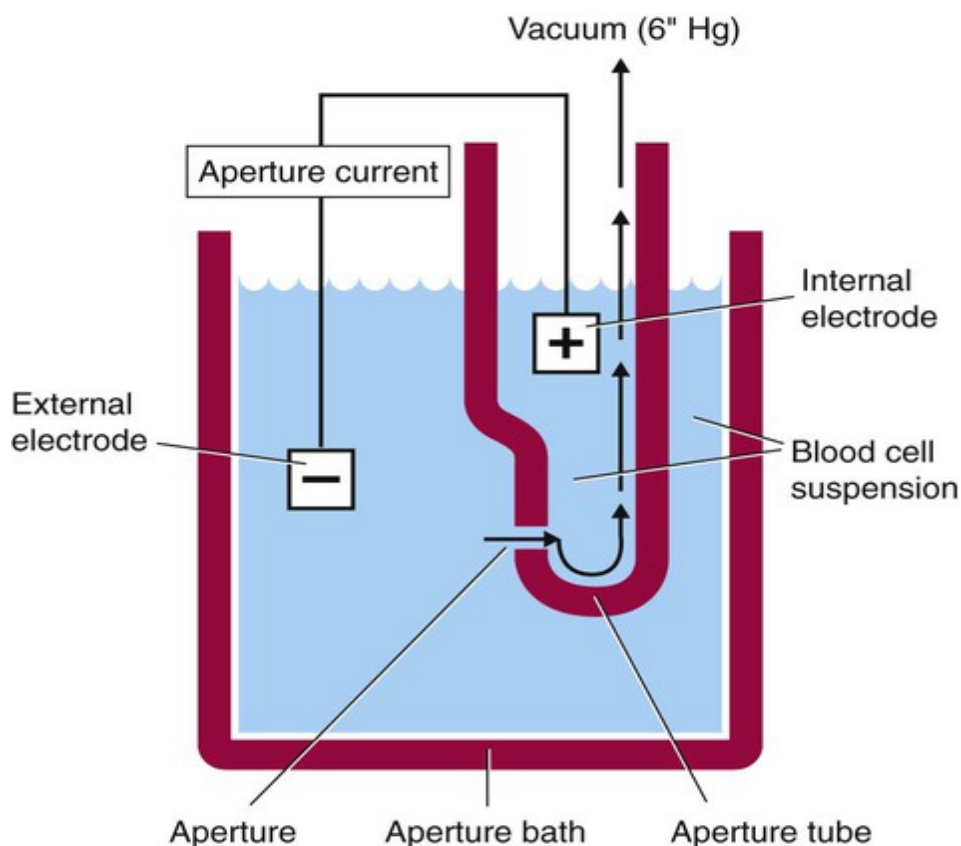
U megaloblastnoj anemiji na preparatu koštane srži uočava se hipercelularnost, naročito u eritrocitnoj lozi, depoi gvožđa su povećani. Eritrocitni prekursori su veliki i imaju jedra koja su manje zrela u odnosu na stepen zrelosti citoplazme (jedarnocitoplazmatska asinhronija). Hromatin u jedru se kondenzuje na karakterističan način, tako da jedro poprima izgled sita. Prekursori granulocita, naročito metamijelociti, veći su nego što je normalno (77).

Kod ispitivanja deficita kobalamina ili folata biopsiju treba uraditi pre ili do 24h od početka terapije (65). Ukoliko se pre biopsije primeni terapija, anemija ostaje, ali su promene u koštanoj srži nejasne. Povremeno može doći do zamene teškog oblika megaloblastne anemije akutnom leukemijom, jer su se u koštanoj srži pojavili bizarni megaloblastni prekursori leukocita (50).

#### **1.4.1.5. Morfometrijski parametri leukocita**

Razvoj protočne citometrije (engl. flow cytometry) na čijim principima danas funkcionišu pojedini hematološki analizatori omogućio je američki inženjer elektronike Wallace H. Coulter. Po njemu je automatsko određivanje broja ćelija na osnovu

promene električnog otpora (impedance) između elektroda pri usmerenom kretanju ćelija kroz mali otvor (apertura) nazvan Prvi ili Coulterov princip. Broj signala odgovara broju ćelija, a intezitet veličini ćelije. Danas, više od 98% hematoloških brojača ima implementiran Coulterov princip (135).

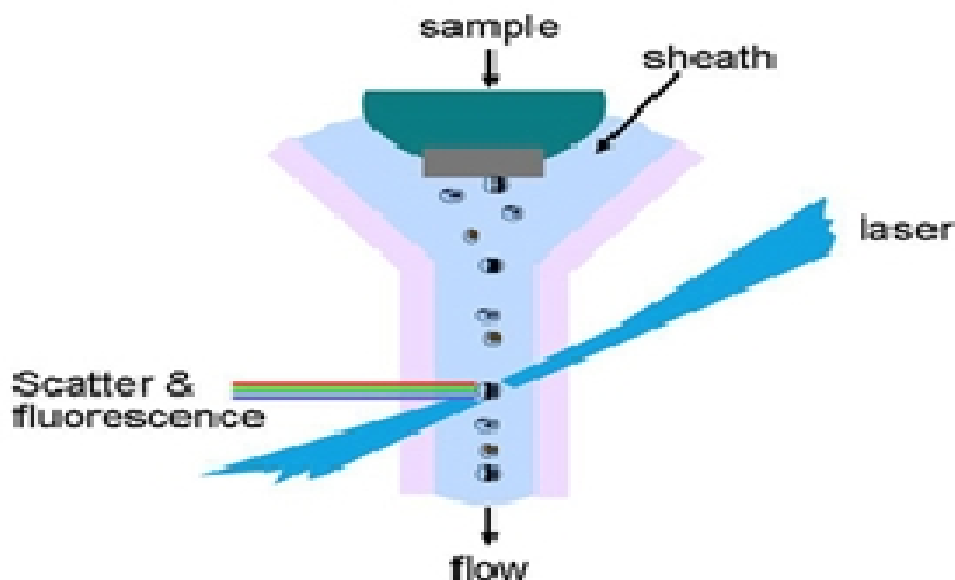


**Slika 5. Šematski prikaz Coulterovog principa<sup>5</sup>**

U osnovi protočnog citometra je komora, tzv. protočna ćelija. Postoje različite forme protočnih komora, u zavisnosti od namene. Njen zadatak je da omogući kretanje ćelija jedne za drugom do mesta merenja. Uzorak sa ćelijama se ubacuje u struju tečnosti u komori tako da se tok tečnosti ne remeti. To omogućava da se struje tečnosti i ćelija ne mešaju, kao i da struja ćelija bude uska, obično dijametra 10  $\mu\text{m}$ . Pri prolasku kroz centar komore izvor svetlosti baca zrak na ćelije koje prolaze. Većina analizatora koristi laser kao izvor svetlosti, jer proizvodi monohromatsku svetlost visokog inteziteta. Takođe, laserski zrak je uzak i na taj način se smanjuje mogućnost da više

<sup>5</sup>Longanbach S, Chapman DH, Miers MK. Automated Cell-Counting Instrumentation <https://oncohemakey.com/automated-cell-counting-instrumentation/> (136)

ćelija istovremeno bude ekscitirano jednim zrakom. Optički sistemi usmeravaju rasutu svetlost do detektora, gde se svetlosni signal prevodi u električni, a zatim obrađuje u procesoru (137).



**Slika 6. Šematski prikaz protočne ćelije<sup>6</sup>**

Na Beckman Coulter aparatima koristi se tzv. VCS tehnologija za određivanje krvne slike sa leukocitarnom formulom petodelne diferencijacije – zapremina (eng. volume, V), provodljivost (eng. conductivity, C) i rasipanje svetlosti (eng. scatter, S). Ovom tehnologijom se istovremeno analiziraju biofizičke karakteristike za više od 8000 leukocita, koji se nalaze u približno nativnom stanju (138, 139). Za određivanje zapremine ćelija koristi se promena električnog otpora ili impedance, koju ćelija izaziva prolazeći između elektroda sa konstantnim naponom. Veličina promene odgovara zapremini ćelije. Provodljivost se odnosi na propuštanje naizmenične struje u radiofrekventnom opsegu kroz ćeliju. Intezitet propuštene struje zavisi od hemijskog sastava citoplazme i zapremine jedra. Provodljivost se koriguje za zapreminu ćelije. Razlog je dužina putovanja signala kroz ćeliju. Na primer, ćelija manje zapremine, iako je slab provodnik struje, može imati sličan signal kao i velika ćelija, koja je dobar provodnik, ali signal zbog njene veće zapremine duže putuje. Nakon uklanjanja uticaja

<sup>6</sup>Ormerod MG. The Flow Cytometer. In: Ormerod MG, editor. Flow Cytometry - A Basic Introduction. <https://flowbook.denovosoftware.com/> (137)

zapremine ćelije, dobija se rezultat koji se odnosi samo na unutrašnju strukturu ćelije, tj. informacija o neprozirnosti ćelije (eng. opacity). Na ovaj način se razdvajaju ćelije slične zapremine a različite unutrašnje strukture (139).

Kada se ćelija izloži koherentnom laserskom zraku, dolazi do rasipanja svetlosti u svim pravcima. Korišćenjem odgovarajućeg detektora meri se intezitet rasute svetlosti pod određenim uglom. Izmereni signal govori o ćelijskoj granuliranosti, lobularnosti jedra i strukturi ćelijske površine. Kao i kod provodljivosti, intezitet rasute svetlosti koriguje se za zapreminu ćelije, pri čemu se dobija vrednost rotiranog rasipanja svetlosti (eng. rotated light scatter). Za svaki tip ćelije određen je optimalni ugao rasipanja svetlosti. To omogućava razdvajanje ćelija poput neutrofila i eozinofila bez upotrebe matematičkih proračuna, kao i razdvajanje ćelija koje ne sadrže granule (139).

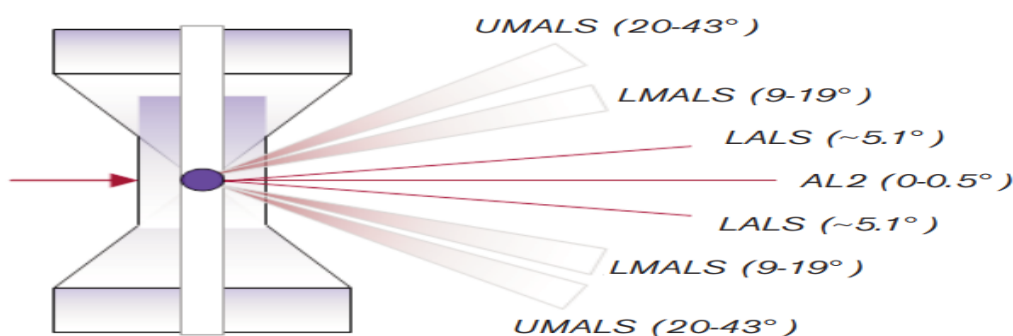
Signali koji potiču od zapremine ćelije, tj. promene otpora, njene provodljivosti i rasipanja svetlosti konvertuju se analogno-digitalno. Dobijeni podaci se koriste za diferencijaciju leukocita i generisanje alarma o povećanom/smanjenom broju subpopulacija leukocita, prisustvu atipičnih limfocita, nezrelih granulocita i blasta. Iz dobijenih podataka se izračunava srednja vrednost i standardna devijacija za zapreminu, provodljivost i rasipanje svetlosti za neutrofile, monocite, limfocite i eozinofile. Na ovaj način dobijeni parametri predstavljaju morfometrijske karakteristike leukocita (eng. Cell Population Data, CPD) (138). Srednje vrednosti govore o prosečnom rezultatu za određeni signal u određenoj subpopulaciji leukocita, dok se standardne devijacije odnose na to koliko pojedinačne vrednosti odstupaju od srednje vrednosti u okviru iste subpopulacije leukocita. Što su standardne devijacije veće, to se ćelije iste subpopulacije međusobno više razlikuju po određenoj karakteristici.

Iako je u osnovi svih Beckman Coulter brojača ćelija ista VCS tehnologija, potrebno je uvek naglasiti na kojem su hematološkom analizatoru dobijeni CPD parametri zbog mogućeg uticaja sastava reagenasa i načina rada analizatora. Novije generacije Beckman Coulter aparata, DxH serije, takođe koriste VCS tehnologiju, uz dodatno merenje rasipanja svetlosti lasera pod više uglova. Samim tim se i broj CPD parametara povećao (140).

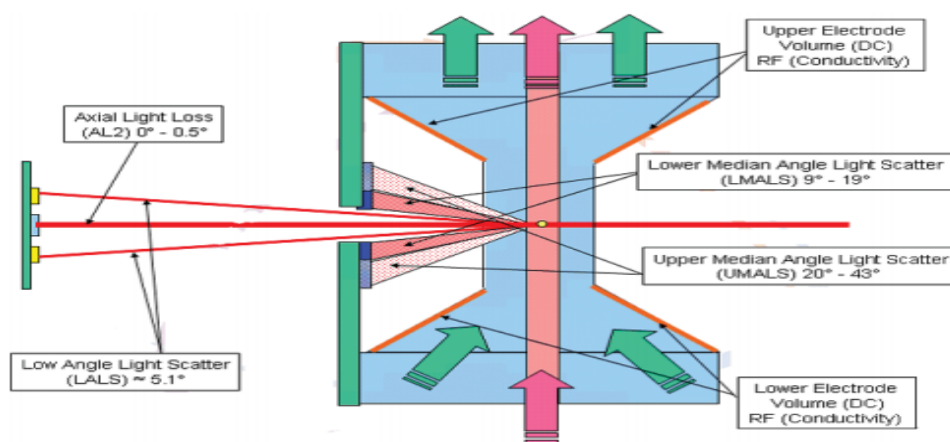


Na Slici 7A) je šematski prikaz rasipanja svetlosti od strane ćelije nakon interakcije sa laserskim zrakom, kao i uglovi pod kojima se meri intezitet rasute svetlosti na UniCel® DxH800 Coulter® Cellular Analysis System. Na Slici 7B) je šematski prikaz protočne ćelije na UniCel® DxH800 Coulter® Cellular Analysis System sa VCS mernim principima.

A)



B)



**Slika 7. A) Šematski prikaz merenja rasute svetlosti na analizatoru UniCel® DxH800 Coulter® Cellular Analysis System;<sup>7</sup> B) Šematski prikaz merenja zapremine, provodljivosti i inteziteta rasute svetlosti u protočnoj ćeliji na analizatoru UniCel® DxH800 Coulter® Cellular Analysis System.<sup>8</sup>**

<sup>7</sup>Beckman Coulter. Advancements in Technology: WBC Differential Methodology. UniCel® DxH 800 Coulter® Cellular Analysis System (140)

<sup>8</sup>Beckman Coulter. Advancements in Technology: Flow Cytometric Morphology – The Analytical Module. UniCel® DxH 800 Coulter® Cellular Analysis System (141)

Na Slici 8 je prikaz izgleda rezultata za broj leukocita i diferencijalnu formulu dobijenu na Coulter® LH750 Hematology Analyzer (Beckman Coulter, USA). Morfometrijski parametri za neutrofile, limfocite, monocite i eozinofile takođe su prikazani. Predstavljani su kao srednja vrednost (engl. mean) za zapreminu (V), provodljivost (C) i rasipanje svetlosti (S) i njihove standardne devijacije (SD).

WBC	15.59	H						
NE %	73.23	aH	NE #	11.42	H			
LY %	17.80	aL	LY #	2.77				
MO %	6.64		MO #	1.04	H			
EO %	0.92		EO #	0.14				
BA %	1.41	H	BA #	0.22	H			
NRBC %	7.14	R	NRBC #	1.11	R H			
@ Research Population Data NE LY MO EO								
	MEAN	SD	MEAN	SD	MEAN	SD	MEAN	SD
V	156.1	28.51	85.8	15.52	172.6	24.41	164.3	23.49
C	145.4	8.61	108.9	16.23	122.3	5.44	151.3	4.81
S	141.4	11.82	70.2	22.96	94.6	8.68	201.9	7.64

**Slika 8. Leukocitarna formula sa morfometrijskim parametrima na Coulter® LH750 Hematology Analyzer (Beckman Coulter, USA)<sup>9</sup>**

Na Slici 9 je prikaz CPD parametara na UniCel® DxH800 Coulter® Cellular Analysis System. Zbog merenja inteziteta rasute svetlosti pod više uglova generiše se veći broj morfometrijskih parametara za leukocite u odnosu na aparate LH serije.

<sup>9</sup> Dopsaj V. Hematološki analizatori. Principi, izvori grešaka i interpretacija rezultata. 2011.

	Ne		Ly		Mo		Eo	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
V	148	16.65	93	14.47	164	17.83	142	13.50
C	151	4.14	120	6.79	128	4.27	153	3.81
MALS	145	9.84	66	15.42	88	13.35	202	8.03
UMALS	139	11.07	67	17.59	92	12.32	214	9.74
LMALS	148	11.27	60	19.03	77	18.20	187	9.77
LALS	177	28.45	39	10.85	94	27.74	147	43.72
AL2	154	10.54	100	13.73	162	15.83	128	8.78

**Slika 9. Morfometrijski parametri leukocita na DxH800 Coulter® Cellular Analysis System.<sup>7</sup>**

Na brojačima LH serije se za svaku subpopulaciju leukocita, osim bazofila, dobijaju po 3 srednje vrednosti i njihove standardne devijacije (Slika 8), a na brojačima LxH serije po 7 srednjih vrednosti i njihove standardne devijacije. To omogućava još precizniju diferencijaciju leukocita (Slika 8).

S obzirom na to da CPD parametri predstavljaju digitalnu verziju morfologije leukocita koja se ispituje na razmazima periferne krvi (138), istražuje se njihova povezanost sa kliničkim stanjima koja utiču na veličinu i strukturu ćelija. Potencijalna korist od CPD parametara sadržana je u tome da se dobijaju automatski sa određivanjem kompletne krvne slike, bez dodatnih troškova. Rezultati nedavnih istraživanja upućuju na moguću kliničku primenu morfometrijskih parametara leukocita u rutinskom radu, što je cilj proizvođača hematoloških brojača.

Istraživanja bakterijskih infekcija, sindroma inflamatornog odgovora i sepse (142–150) pokazala su da se u ovim stanjima najznačajnije promene u CPD parametrima dešavaju na zapremini neutrofila i monocita, kao i na njihovim standardnim devijacijama. Chaves i saradnici (142) navode da su pacijenti sa sepsom imali vrednosti srednje zapremine neutrofila značajno veće od ispitanika u kontrolnoj

<sup>7</sup>Beckman Coulter. Advancements in Technology: WBC Differential Methodology. UniCel® DxH 800 Coulter® Cellular Analysis System (140)

grupi ( $156 \pm 13.5$  vs  $143 \pm 4.8$ ), dok su vrednosti srednjeg inteziteta rasipanja svetlosti bile niže kod pacijenata sa sepsom u odnosu na kontrolnu grupu ( $140 \pm 10.$  vs  $146 \pm 7.3$ ). Takođe, Chaves i saradnici su u svom drugom istraživanju (143) utvrdili da vrednosti standardne devijacije zapremine neutrofila koje su više od 23 imaju 100% specifičnost i 69% osetljivost za akutnu bakterijsku infekciju. Mardi sa saradnicima potvrđuje da vrednosti srednje zapremine neutrofila, koje su veće od 150, mogu da razdvoje sepsu od nesistemske infekcije (146). Charafeddine i saradnici su ukazali da vrednosti standardne devijacije zapremine neutrofila koje su više od 21.9 mogu da razdvoje pacijente sa infekcijom od onih bez infekcije (147).

Studije o virusnim infekcijama i limfoproliferativnim oboljenjima opisale su promene limfocitnih morfometrijskih parametara kao najznačajnije (151–153), dok su istraživanja malarije pokazala da su morfometrijski parametri limfocita i monocita značajno izmenjeni (154, 155). Zhu i saradnici (151) su kod pacijenata sa HBV infekcijom uočili značajno povećane vrednosti srednje zapremine i standardne devijacije za zapreminu limfocita, a značajno smanjene srednje vrednosti za provodljivost limfocita. Slične promene su uočene i kod morfometrijskih parametara za monocite (151). Fourcade i saradnici su utvrdili povezanost vrednosti srednje zapremine monocita  $> 181.6$ , standardne devijacije zapremine monocita  $> 19.9$ , standardne devijacije zapremine limfocita  $> 22.9$ , kao i standardne devijacije provodljivosti limfocita  $> 14.4$ , sa pozitivnim rezultatom na prisustvo plazmodijuma na razmazu periferne krvi (154).

Mijeloproliferativna oboljenja takođe utiču na morfometrijske parametre neutrofila i monocita (156, 157), a promene su veće u odnosu na pacijente sa sepsom i leukemoidnom reakcijom (158). Miguel i saradnici su uočili povezanost srednjih vrednosti rasipanja svetlosti  $< 139.3$  i provodljivosti neutrofila  $< 150.9$  sa displazijom neutrofila (156). Virk i saradnici navode da su sledeće vrednosti za CPD parametre karakteristične za akutnu mijeloidnu leukemiju u poređenju sa normalnom kontrolnom grupom: srednja zapremina neutrofila  $> 150.8$ , standardna devijacija zapremine neutrofila  $> 24.24$ , srednji intezitet rasipanja svetlosti monocita  $> 73.4$  i srednji intezitet rasipanja svetlosti limfocita  $> 54.85$  (157). Neal i saradnici su u svom istraživanju utvrdili da standardna devijacija aksijalnog gubitka svetlosti neutrofila na

hematološkom analizatoru DxH800 sa vrednostima  $> 10.75$  ima najveću dijagnostičku osetljivost za toksične promene neutrofila (hipergranulacija, Dohleova telašca, vakuolizacija) (159).

Najznačajniji rezultat koji je postignut u dosadašnjim istraživanjima o CPD parametrima jeste da je standardna devijacija zapremine monocita prepoznata kao rani marker sepse (150) i da je upotrebu kod odraslih hitno primljenih pacijenata odobrila Američka agencija za hranu i lekove (engl. Food and Drug Administration, FDA) (160). Vrednosti standardne devijacije zapremine monocita  $> 20$  zajedno sa kliničkom slikom i drugim laboratorijskim rezultatima pomažu u identifikaciji pacijenata sa sepsom ili pacijenata sa povećanim rizikom za pojavu sepse tokom 12 sati od prijema u bolnicu (160).

Do sada se mali broj istraživača bavio povezanošću morfometrijskih parametara leukocita i deficita vitamina B12 i folata. Dobijeni su različiti rezultati u zavisnosti od populacije i kriterijuma kako je deficit kobalamina definisan. Simon-Lopez i saradnici su utvrdili da su promene na srednjim zapreminama neutrofila i monocita povezane sa deficitom vitamina B12 i/ili folata (161). Za potrebe istraživanja selektovali su 108 anemičnih pacijenata i 58 normalnih ispitanika. Anemija je bila jedini kriterijum za uključivanje pacijenata. Nakon analize vitamina B12 i folata, izdvojili su pacijente sa deficitom jednog ili oba vitamina i uporedili ih sa normalnim ispitanicima, kao i sa ostalim anemičnim pacijentima bez deficita vitamina. Utvrđeno je da su vrednosti srednje zapremine neutrofila  $> 140.3$  i monocita  $> 172.3$  povezane sa niskim koncentracijama kobalamina, a da su vrednosti srednje zapremine neutrofila  $> 140.2$  i monocita  $> 169.6$  povezane sa niskim koncentracijama folata. Ostale CPD parametre nisu analizirali (161). Prema rezultatima istraživanja Risch i saradnika (162) koeficijenti varijacije zapremine neutrofila i monocita bili su povezani sa sniženim koncentracijama kobalamina u subkliničkom deficitu vitamina B12. Oni su svoje istraživanje sprovedi u populaciji starijih od 60 godina bez makrocitoze i inflamacije. Pacijenti su podeljeni prema koncentraciji holotranskobalamina. Utvrdili su povezanost ovih izračunatih CPD parametara sa koncentracijama holotranskobalamina  $< 28$  pmol/L, dok vrednosti srednjih zapremina neutrofila i monocita nisu bile povezane sa ovim vrednostima holotranskobalamina (162).

## 1.4.2. Biohemijski testovi

Biohemijski testovi za ispitivanje statusa vitamina B12 mogu se podeliti na nespecifične i specifične testove. Nespecifični testovi obuhvataju određivanje koncentracije nekonjugovanog bilirubina i aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH). Usled neefektivne eritropoeze oko 90% eritroidnih ćelija biva razoreno u koštanoj srži pre nego što dospe u cirkulaciju, zbog čega se povećava nivo nekonjugovanog bilirubina i aktivnost LDH (77). Takođe, usled ekstramedularne hemolize životni vek eritrocita je smanjen 30–50% (163).

Specifični testovi obuhvataju određivanje 2 grupe parametara: one koji direktno odražavaju nivo kobalamina u krvi i metabolite koji se akumuliraju usled neadekvatne količine kobalamina (164–166). Vitamin B12 i holotranskobalamin II predstavljaju cirkulišući kobalamin, a homocistein i metilmalonska kiselina odražavaju funkcionalni (metabolički) status (165).

### 1.4.2.1. Određivanje vitamina B12

Od 1949. do kasnih 80-ih godina prošlog veka analiza statusa vitamina B12 sastojala se samo od određivanja kobalamina u serumu. Glavni cilj je bio da se potvrdi ili isključi dijagnoza retkog, ali teškog deficitnog stanja, koje je u 94% slučajeva bilo izazvano pernicioznom anemijom ili intestinalnom bolesti koja sprečava preuzimanje IF (98). Klinički okvir za dijagnozu deficita kobalamina bila je megaloblastna anemija, koja je bila prisutna u > 70% slučajeva i/ili nešto ređe prisutna neurološka disfunkcija. Osetljivost analize vitamina B12 za klinički deficit bila je 95–97%, jer se testiranje radilo kada su se simptomi već pojavili, nakon dovoljno dugog trajanja malapsorpcije i iscrpljivanja rezervi kobalamina. Specifičnost je predstavljala veći problem zbog čestih niskih koncentracija vitamina B12, koje se nisu mogle objasniti (98).

Prvi testovi za vitamin B12 zasnivali su se na rastu mikroorganizama zahvaljujući njihovoj potrebi za kobalaminom, a čiji izvor je bila krv pacijenta (98). Mikrobiološki testovi su se pokazali osetljivim i specifičnim, ali vremenski zahtevnim (167). Uvodjenjem radioizotop dilucionih tehnika sa IF kao kobalamin vezujućim proteinom određivanje kobalamina postaje brže, a mikrobiološki testovi se potiskuju iz

upotrebe (98, 167). U novim testovima HC je interferirao, jer je vezivao nefunkcionalne analoge kobalamina i dovodio do lažno visokih rezultata kada je uzorak sadržao velike količine analoga. Zbog toga IF nije smeo biti kontaminiran HC (98, 168). Danas se mikrobiološki i testovi sa radioizotopom koriste u evaluaciji novih automatizovanih metoda i u populacionim istraživanjima kada je potrebno obezbediti dugotrajno upotrebljive rezultate (65).

Od 90-ih godina prošlog veka za određivanje kobalamina počinju da se koriste automatizovane kompetitivne metode zasnovane na luminiscenciji (167). Testovi su obično dizajnirani za serumske uzorke (65). Sastoje se od nekoliko zajedničkih koraka. Kobalamin je u krvi, tj. u serumu vezan za proteine i potrebno ga je osloboditi kako bi se odredio. Oslobođeni, nativni oblici kobalamin prevode se u stabilniji cijano-kobalamin. Sledeći korak je takmičenje između ovako dobijenog serumskog cijano-kobalamina i obeleženog cijanokobalamina iz reagensa za ograničen broj mesta na IF svinjskog porekla. Specifičnost IF za cijanokobalamin obezbeđena je prečišćavanjem IF ili blokiranjem HC tako što se dodaje kobinamid u višku koji sprečavaju da HC veže cijanokobalamin. Takođe, potrebno je sprečiti ponovno vezivanje kobalamina za endogene proteine, za šta se koristi ditiotreitol. Veoma je važno da visok titar anti-IF antitela iz uzorka pacijenta ne utiče na test. Razdvajanje vezanog i nevezanog cijanokobalamina postiže se različitim elektro- ili fizičko-hemijskim principima, kao i imunološkim metodama. Vezana obeležena frakcija cijanokobalamina se zatim detektuje na osnovu signala koji generiše obeleživač (65).

Do sada nije postignuta standardizacija u određivanju koncentracije kobalamina u krvi (167). Vitamin B12, kao i folat, predstavlja molekul koji je jednostavniji od proteina, ali poseduje karakteristike koje otežavaju njegovu standardizaciju. Prisutan je u različitim formama (vitameri) u krvi, hrani, suplementima i referentnom materijalu. Koncentracija u serumu je niska i čvrsto je vezan za proteine (169). Ipak, sprovode se određene mere, kao što je uvođenje standarda sa konsenzus vrednošću u cilju poboljšanja kvaliteta rezultata testova. Trenutno se koristi internacionalni standard WHO 03/178 (engl. World Health Organisation International Standard 03/178, WHO IS 03/178) sa konsenzus koncentracijom kobalamina 480 pg/mL ili 354 pmol/L (167, 170). Međutim, proizvođači testova često ne kalibrišu svoje testove ovim standardom, već

koriste svoj interni materijal. Razlozi su nepostojanje primarne referentne metode kojom bi se odredila koncentracija kobalamina u standardu i da su u krvi prisutne različite forme vitamina B12. Posledica je loše slaganje rezultata između komercijalnih testova (167).

Nacionalni institut za standarde i tehnologiju (engl. National Institute of Standards and Technology, NIST) u SAD razvio je standardni referentni materijal za vitamin B12 u humanom serumu, SRM 3951, koji se sastoji od pulova smrznutog humanog seruma i sadži 3 nivoa kobalamina. Cilj proizvodnje SRM 3951 jeste usaglašenost između različitih testova za kobalamin. U sklopu sertifikovanja SRM 3951 radi se i na razvoju metode zasnovane na izotop diluciono-tečnoj hromatografiji-tandem masenoj spektrometriji (ID-LC-MS/MS) za određivanje kobalamina (171).

Spoljašnja kontrola kvaliteta je pokazala da je koeficijent varijacije (CV) rezultata u okviru iste metode pri koncentraciji koja se koristi za utvrđivanje deficita iznosio 6–10%, čak i 20%. To ukazuje na značajnu sivu zonu između normalnih i niskih koncentracija. Uzroci varijacija uključuju preanalitičke, analitičke i postanalitičke faktore, kao i uzroke koji potiču od samog pacijenta (65). Prema istraživanju Britanske nacionalne službe za spoljašnju kontrolu kvaliteta (engl. United Kingdom National External Quality Assessment Service, UK NEQAS), CV između različitih testova iznosio je 5–15%, dok se bias između metoda kretao od +10% do -20% (134). Lekarima se savetuje da prilikom interpretacije rezultata uzmu u obzir pozitivnu i negativnu prediktivnu vrednost testa (65).

Drugi problem testova za vitamin B12 jeste referentni interval. Ovaj problem proističe iz izostanka standardizacije, kao i iz nedostatka zlatnog standarda u laboratorijskoj proceni statusa kobalamina. Dodatni otežavajući faktori jesu uticaj: starosti, ishrane, trudnoće, lekova. Zato je predloženo da proizvođač kroz robusne studije utvrdi referentni opseg uzimajući u obzir različite uticaje, a laboratorije mogu prikazati rezultate određivanja kobalamina korigovane u odnosu na bias testa prema konsenzus srednjoj vrednosti (134).



Kada je u pitanju uticaj starosti i pola na status vitamina B12, istraživanja su pokazala oprečne rezultate (88, 115, 172–178). Prema jednom broju studija muškarci imaju niže vrednosti vitamina B12 u odnosu na žene i podložniji su deficitu (173–175). Sa druge strane, postoje istraživanja koja ukazuju da ne postoji statistički značajna razlika između žena i muškaraca (176, 177). Svetska zdravstvena organizacija, takođe, ne navodi posebne granične vrednosti za deficit vitamina B12 za muškarce i žene (85).

Postoje studije koje ukazuju da osobe starije od 60 godina imaju veću prevalencu niskih i suboptimalnih koncentracija kobalamina (88, 115, 178). Starost se smatra faktorom rizika za pojavu deficita kobalamina, jer se starenjem povećava prevalenca oboljenja, kao i upotreba lekova koji se dovode u vezu sa deficitom vitamina B12 (43). Međutim, istraživanje McMahon i saradnika (177), koje je obuhvatilo učesnike Framingham Heart Study istraživanja, nije utvrdilo postojanje razlika prema starosti između 4 opsega koncentracija kobalamina (37–226 pmol/L, 227–290 pmol/L, 291–370 pmol/L i 371–1247 pmol/L). Svetska zdravstvena organizacija ne razdvaja pacijente prema starosti kod primene granične koncentracije za deficit vitamina B12 od 150 pmol/L (85).

Prema jednoj grupi istraživača pad u koncentraciji kobalamina u trudnoći jeste fiziološki i ne odražava deficit (179, 180), dok je prema drugim istraživačima došlo do izvesnog „naprezanja” u statusu kobalamina (181).

Studije o vitaminu B12 iz 50-ih godina prošlog veka navodile su veoma niske koncentracije kobalamina za deficit, < 90 pmol/L, jer su se najverovatnije definisale u odnosu na klinički ispoljeni nedostatak (98). U zavisnosti od metode određivanja, većina testova danas koristi koncentraciju kobalamina < 148 pmol/L (200 ng/L) za deficit (182). Njena osetljivost iznosi 95–97% za klinički deficit, dok se specifičnost procenjuje na < 80% (98).

Sa otkrićem SCCD pojavila se potreba za promenom granične koncentracije, jer se koncentracija < 148 pmol/L pokazala nedovoljno osetljivom u odnosu na MMA (182–184). Teško je proceniti osetljivost i specifičnost testova za kobalamin, kao i za ostale biomarkere u SCCD, jer se dijagnoza zasniva upravo na promeni njihovih koncentracija (98). Koncentracija kobalamina < 148 pmol/L ima osetljivost za SCCD

38–39%, koja se povećava na 55–84% ukoliko se granična koncentracija poveća na 200–300 pmol/L, dok specifičnost nije utvrđena (98). U istraživanju Clarkea i saradnika u populaciji starijih od 65 godina upoređena je koncentracija kobalamina < 200 pmol/L sa koncentracijama MMA > 450 nmol/L i > 750 nmol/L kao kriterijumima za deficit kobalamina. Dobijena je specifičnost 76% i 73%, a osetljivost 55% i 66% (116).

I danas se u ispitivanju statusa vitamina B12 počinje od određivanja nivoa kobalamina u krvi (84, 134). Na taj način se određuje i inaktivna forma vezana za HC (holohaptokorin) i aktivna forma vezana za TCII (holotranskobalamin). Zato se često obeležava kao ukupni kobalamin (134). Određivanje kobalamina je automatizovano i dostupno velikom broju laboratorija. Kao uzorak može se koristiti serum ili plazma.

Iako je kobalamin stabilan u uzorku (185), uočeni su lažno visoki rezultati u uzorcima krvi u određenim epruvetama sa gelom (186). Potrebno je izbegavati uzorke sa prisutnom hemolizom. Uticaj lipemije i hiperbilirubinemije postoji, a pri kom nivou se dešava zavisi od samog testa. Serumske koncentracije kobalamina stabilne su na sobnoj temperaturi, ali vitamin C razgrađuje kobalamin, zbog čega se serumi tretirani askorbinskom kiselinom ne mogu koristiti (65). Intraindividualni koeficijent varijacije za kobalamin kod zdravih osoba iznosi 6.7% (5.7–7.7%), dok je interindividualni koeficijent varijacije 24.1% (16.4–36.0%) (187).

Ako se izuzmu terapija i suplementacija kobalaminom, visoke koncentracije kobalamina u krvi javljaju se u kanceru, mijeloproliferativnim bolestima i bolestima jetre (65, 188, 189). Takođe, uzrok mogu biti i kompleksi imunoglobulina sa kompleksom kobalamina i transkobalamina (65). Prema Carmelu i saradnicima (190), kada se dobije visoka koncentracija vitamina B12, prvo treba proveriti da li je pacijent nedavno primio terapiju kobalaminom i funkciju bubrega. Time se pokriva 50% uzroka povećanih koncentracija kobalamina. Takođe, treba uvek imati na umu razlog određivanja nivoa kobalamina. Ako je testiranje izvršeno da bi se isključio deficit, a dobije se visoka vrednost za kobalamin, potrebno je odrediti druge biomarkere. Moguće je istovremeno prisustvo stanja koje dovodi do visokog nivoa vitamina B12, kao što je promena nivoa haptokorina u hroničnoj mijeloproliferativnoj leukemiji, i perniciozne anemije (190).

Veće koncentracije kobalamina se nalaze kod crne rase u odnosu na belu rasu (191), zatim kod žena homozigota sa varijantom gena FUT2 za  $\alpha(1,2)$ fukoziltransferazu (192). Lažno normalni rezultati opisani su kod pacijenata sa visokim titrom anti-IF antitela u slučaju perniciozne anemije (193, 194). Serumi bez anti-IF antitela nisu pogođeni interferencijom. To ukazuje na potrebu za kontrolnim uzorcima sa anti-IF antitelima (98). Kod deficita kobalamina izazvanog upotrebom azotsuboksida, nedostatkom TCII ili urođenim greškama u metabolizmu vitamina B12, nivo kobalamina je normalan (50).

Serumske koncentracije vitamina B12 mogu biti niske kod vegeterijanaca (50), osoba koje uzimaju velike doze vitamina C (195), u trudnoći (195), u deficitu haptokorina (196, 197). U težem obliku deficita haptokorina prisutne su koncentracije kobalamina  $< 100$  pmol/L, koje je teško održati u referentnom opsegu uprkos injekcijama vitamina B12 (198). Pacijenti, koji istovremeno imaju deficit kobalamina i folata, mogu imati normalne ili povećane koncentracije folata u krvi (199). Razlog je povezanost celularnog metabolizma folata i kobalamina, pri čemu se folat ne troši usled nedostatka vitamina B12 (199, 200). Žene, koje koriste hormonsku kontracepciju, imaju niže vrednosti kobalamina u krvi, koje nemaju klinički značaj (201, 202).

#### **1.4.2.2. Određivanje holotranskobalamina**

Holotranskobalamin (holo-TCII) ili aktivna frakcija kobalamina predstavlja kompleks vitamina B12 i TCII (65) i čini 5–20% ukupnog TCII (203). Zasićen je oko 10% vitaminom B12, za razliku od HC, koji je skoro u potpunosti zasićen kobalaminom (203).

Činjenica da samo vitamin B12 vezan za TCII ulazi u ćelije i biva iskorišćen za potrebe metabolizma nametnula je pretpostavku da je holo-TCII bolji marker statusa vitamina B12 u odnosu na ukupni kobalamin (203). Lindemans i saradnici su još 1983. ukazali da su koncentracije kobalamina vezanog za TCII određene koncentracijom kobalamina u tkivima (204, 205).

Postoje tri različite metode za određivanje holo-TCII koje daju slične rezultate. Prvi pristup podrazumeva jonsku precipitaciju TCII i određivanju kobalamina u precipitatu. Zatim su upotrebljena anti-TCII antitela umesto jonske precipitacije i izotop-dilucioni test za izolovani kobalamin, tzv. radioimunotest za holo-TCII. Postojao je i mikrobiološki test za određivanje izolovanog kobalamina iz kompleksa sa TCII. Drugi pristup je bio da se razdvoje apo-TCII i holo-TCII pomoću kuglica prekrivenih kobalaminom, a da se zatim holo-TCII, koji je ostao u supernatantu, odredi ELISA testom (203).

Sa pojavom ELISA i radioimunotestova za TCII, koji su bili precizniji i osetljiviji (206, 207), mogla su se vršiti dodatna istraživanja. Radioimunotest zahtevao je male količine uzorka, CV bio je < 10%, limit detekcije 10 pmol/L. Vreme potrebno za izvođenje testa iznosilo je 4 sata (65). Poređenje RIA i ELISA testova za holo-TCII pokazalo je slične rezultate. RIA rezultati su bili slični i sa rezultatima mikrobioloških testova (203). Ove testove su zamenili automatizovani imunotestovi sa specifičnim anti-holo-TCII antitelom (208).

Nexo i saradnici su opisali metod za određivanje ukupnog TCII (209) i holo-TCII (207), dok se saturacija TCII može izračunati (65). Za holo-TCII referentni opseg je 40–150 pmol/L, a za saturaciju TCII 5–20%. U deficitu saturacija TCII opada na 0.4–3% (65).

Holotranskobalamin je kao i kobalamin stabilan analit. Nisu potrebne posebne mere predostrožnosti prilikom vađenja krvi. Stabilan je na temperaturama od -70° do -20°C godinama. Ukoliko se hranom unosi normalna količina kobalamina, za određivanje holo-TCII može da se koristi uzorak nakon noćnog gladovanja, kao i uzorak nakon obroka. Međutim, ponovljeno unošenje velikih fizioloških doza vitamina B12 povećaće holo-TCII i u manjoj meri vitamin B12 u roku od 24h (203).

Holotranskobalamin II, kao i kobalamin, varira u određenoj meri u odnosu na pol i starost. Za uticaj rase podaci su limitirani. Koncentracije holo-TCII ostaju nepromenjene tokom trudnoće (203).

Holotranskobalamin se može određivati u serumu i plazmi (203, 210–213). Prema jednim istraživačima u plazmi se dobijaju nešto veće koncentracije nego u serumu, dok druga istraživanja negiraju razliku (203). Visok titar anti-IF antitela ne utiče na određivanje holo-TCII kao što je to slučaj sa imunotestovima za vitamin B12 (65). Intraindividualni CV za holo-TCII je veći u odnosu na kobalamin i iznosi 13% (11.5–15.0). Interindividualni CV iznosi 24.6% (16.3–37.7) i ne razlikuje se puno u odnosu na kobalamin (187).

Za holo-TCII trenutno ne postoji referentna metoda, ali postoji mogućnost uvođenja internacionalnog standarda. Do sada su se koristili različiti kalibratori sledjivi uobičajenim primarnim referentnim kalibratorima koje je proizveo Axis-Shield. Primarni standard je pripreman gravimetrijski od rekombinantnog humanog holo-TCII i prilagođen pomoću serumskih uzoraka u kojima je koncentracija holo-TCII određena RIA metodom. Svaka serija kalibratora koja je stavljena u prodaju bila je upoređena sa ovim kalibratorom (167). Na osnovu istraživanja Thorpe i saradnika, Odbor eksperata Svetske zdravstvene organizacije za biološku standardizaciju (engl. WHO Expert Committee on Biological Standardization) odobrio je WHO IS 03/178 kao standard za holo-TCII sa koncentracijom 107 pmol/L. WHO IS 03/178 predstavlja prvi internacionalni standard za vitamin B12, folat i holo-TCII. Koncentracija holo-TCII je u skladu je sa koncentracijom za vitamin B12 (480 pg/mL ili 354 pmol/L) jer holo-TCII sadrži 10%–30% ukupnog kobalamina u serumu osobe bez deficita (214).

U literaturi se mogu naći različite granične vrednosti holo-TCII za deficit vitamina B12 (208, 212, 213, 215). Studija Heila i saradnika upućuje na graničnu koncentraciju od 32 pmol/L za deficit kobalamina prema koncentraciji MMA > 450 nmol/L (216). Međutim, nije moguće sa sigurnošću isključiti deficit kada je koncentracija holo-TCII u opsegu 25–75 pmol/L (170). Varijacije u referentnom intervalu za holo-TCII mogu postojati usled uticaja genotipa, pola i starosti, ali potrebne su dodatne studije koje će to ispitati. Za sada se uočavaju slični referentni intervali kod radioimunotestova, ELISA testa, mikrobiloškog određivanja holo-TCII i direktnog određivanja holo-TCII (203).

Za transkobalamin je poznato da postoje genotipovi koji se razlikuju po koncentraciji ukupnog transkobalamina, npr. TCN2 776C→G. Uticaj na koncentraciju holo-TCII je manje izražen, mada neke studije ukazuju da je uticaj genotipa ipak značajan (203). Česta genetska varijanta u kojoj prolin zamenjuje arginin može uticati na funkciju holo-TCII (217–219). Osobe koje su homozigoti sa minor alelom rs35838082 za holo-TCII imaju lažno niske vrednosti holo-TCII kada se testiraju Active-B12 Axis-Shield Diagnostics Ltd testom (220).

Trudnoća ne utiče na nivo holo-TCII, zbog čega je bolji biomarker od kobalamina za procenu statusa vitamina B12 kod trudnica (203). Međutim, prednost holo-TCII nad kobalaminom u ispitivanju statusa vitamina B12 u trudnoći nije u potpunosti potvrđena (98).

Transkobalamin je protein male molekulske mase i kao takav može da se filtrira u glomerulima. Zato smanjena funkcija bubrega dovodi do povećanja koncentracije holo-TCII. Druge studije navode marginalnu vezu između bubrežne funkcije i nivoa holo-TCII (203).

S obzirom na to da je transkobalamin reaktant akutne faze očekuje se da njegova koncentracija raste u akutnim inflamatornim stanjima. Određena istraživanja ukazuju da se to dešava samo kada dolazi do aktivacije makrofaga. Druga stanja koja mogu da dovedu do povećanja holo-TCII su bolesti jetre i autoantitela na transkobalamin (203).

Holotranskobalamin je parametar koji poseduje određene karakteristike koje ga čine pogodnim da postane prvi test u proceni statusa vitamina B12. Takođe, trebalo bi da bude pokazatelj ranih promena u statusu vitamina B12, tzv. ranog negativnog balansa vitamina B12. Međutim, dosadašnja istraživanja imaju oprečne rezultate u pogledu predloga da je holo-TCII bolji parametar od kobalamina. Najbitnije razlike između istraživanja odnose se na dužinu njegovog poluživota, korelaciju sa kobalaminom, granične vrednosti za deficit i nedavnu apsorpciju kobalamina. Poslednje dve stavke čine srž problema u vezi sa prihvatanjem holo-TCII kao superiornijeg markera statusa vitamina B12 (110). Da li vrednosti holo-TCII ukazuju na zalihe vitamina B12 ili na nedavnu apsorpciju kobalamina? Ili oboje? Iako smanjena apsorpcija jeste uvod u deficit, ona može postojati kratkotrajno bez pojave deficita.

Ukoliko bi holo-TCII bio marker oba procesa onda bi izgubio dijagnostičku specifičnost (110). Holotranskobalamin ima isti problem kao i kobalamin kada je u pitanju granična vrednost za deficit, što ne ide u prilog tome da je bolji marker statusa vitamina B12 (110). Ukoliko između holo-TCII i kobalamina postoji visoka korelacija to znači da holo-TCII neće biti bolji marker statusa od samog vitamina B12. Sa druge strane, i izostanak korelacije ne znači da je bolji marker (110).

Kao i sa bilo kojim drugim parametrom za procenu statusa vitamina B12, tako i za holo-TCII postoji problem nedostatka zlatnog standarda. Dosadašnje procene testova za holo-TCII u najvećoj meri su se zasnivale na statističkom poređenju sa MMA kao zlatnim standardom uprkos njenoj nedefinisanoj specifičnosti (98). U kliničkom deficitu nizak nivo holo-TCII ima približno istu osetljivost i specifičnost kao i kobalamin, dok su u SCCD osetljivost i specifičnost 2%–6% više u odnosu na kobalamin (98). Za sada važi preporuka WHO da se u epidemiološkim istraživanjima koristi vitamin B12 (85).

### **1.4.2.3. Određivanje homocisteina**

Homocistein je aminokiselina sa sulfhidrilnom grupom. U ćelijama se nalazi u koncentraciji  $< 1 \mu\text{mol/L}$ , a u plazmi  $5\text{--}15 \mu\text{mol/L}$  (65, 221). U krvi je  $< 2\%$  slobodnog Hcy,  $80\%$  je vezano za proteine, a ostatak je vezan za druge molekule sa sulfhidrilnom grupom. Homocistein formira disulfidne veze sa drugim molekulom homocisteina, cisteinom, sa sulfhidrilnom grupom proteina pri čemu nastaju oksidovane forme Hcy: homocistin, mešani disulfid homocistein-cistein i Hcy vezan za protein (65). Predstavlja metabolički marker deficita vitamina B12, jer se porast koncentracije javlja kao posledica nemogućnosti prevođenja Hcy u metionin usled nedostatka kobalamina (65). Homocistein se može određivati u serumu i plazmi (222).

Za određivanje Hcy koristile su se različite metode:

- jonoizmenjivački analizator aminokiselina (223);
- radioenzimsko određivanje (65);
- kapilarna gasna hromatografija (224);
- kapilarna gasna hromatografija-masena spektrometrija (225);
- tečna hromatografija elektrosprej tandem masena spektrometrija (226);
- tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC) sa fluorescentnim hromoforom (65).

Za hromatografske metode postoji gravimetrijski pripremljen standard za Hcy i druga slična tiol jedinjenja kao odnos sa stabilnim unutrašnjim standardom, npr. 2-merkaptotetilamin. Odnos signala koji potiče od Hcy iz uzorka i unutrašnjeg standarda koristi se za određivanje nepoznate koncentracije (65).

Razvoj enzimskih testova, kao i imunotestova, omogućio je određivanje Hcy u rutinskom radu laboratorija (65). Prvo je potrebno oslobodi vezani Hcy iz kompleksa sa proteinima i prevesti sve oblike prisutne u krvi u Hcy, pri čemu se meri ukupni Hcy (65). Slobodni Hcy se pomoću hidrolaze prevodi u S-adenozil-L-homocistein (SAH) u prisustvu viška adenzina (65). Metode se dalje razlikuju prema načinu razdvajanja i detekcije SAH:

- fluorescentno polarizacioni imunotest (FPIA);
- hemiluminiscentni imunotest (CIA);
- ELISA;
- enzimimunotestovi (EIA);
- lateks aglutinacioni imunotestovi;
- imunoturbidimetrijski testovi (65).

Jedna od novijih metoda je određivanje Hcy ciklusom enzimskih reakcija sa amplifikacijom detekcionog signala (65).



Za većinu imunotestova se kao standard za kalibraciju koristi SAH koji može biti rastvoren u puferovanom vodenom rastvoru ili dodat u modifikovani humani serum. Sam standard ne podleže istim procesima kao i Hcy iz uzorka, ali se prednost ogleda u njegovoj stabilnosti. Za neke enzimске metode postoje gravimetrijski pripremljeni standardi (65).

Kada se uporede enzimski testovi sa imunotestovima i HPLC postoje male, ali značajne razlike u vrednostima Hcy (227–231). Preciznost unutar serije je prihvatljiva za sve tri grupe metoda, ali je poređenje između laboratorija otkrilo veliku nepreciznost u grupi HPLC metoda (231).

Prema Zajedničkom odboru za sledljivost u laboratorijskoj medicini (engl. Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine, JCTLM), metode ID-GC-MS i ID-LC-MS/MS označene su kao referentne za određivanje Hcy u humanom serumu (65, 232). Standardni referentni materijal 1955 proizveo je NIST u SAD, a vrednosti Hcy određene su referentnim metodama (233–236). Sertifikovane vrednosti za Hcy iznose: nivo I  $3.98 \pm 0.18 \mu\text{mol/L}$ , nivo II  $8.85 \pm 0.60 \mu\text{mol/L}$  i nivo III  $17.7 \pm 1.1 \mu\text{mol/L}$  (233). Liofilizovan materijal sa vrednostima Hcy određeni referentnim metodama još uvek nije dostupan (65).

Uzorkovanje i priprema uzorka mogu bitno uticati na rezultat određivanja Hcy (222). S obzirom na to da je Hcy u značajnom procentu vezan za proteine u krvi, venepunkciju ne bi trebalo vršiti nakon venske staze ili ležanja pacijenta. Plazma je bolji uzorak od seruma, jer Hcy može izaći iz ćelija tokom koagulacije uzorka i dovesti do 10% viših vrednosti u serumu (65). Koncentracija Hcy, takođe, raste u plazmi ukoliko se ne odvoji od ćelija krvi. Povećanje je temperaturno zavisno (237). Zato uzorke treba čuvati na ledu i centrifugirati ih što pre (65).

Ne postoji konsenzus oko referentnog ospega za Hcy. Većina laboratorija uzima  $15 \mu\text{mol/L}$  kao graničnu vrednost za hiperhomocisteinemiju. Ipak, laboratorije bi trebalo da odrede svoje referentne vrednosti (134).

Povećanje nivoa Hcy se smatra osetljivim indikatorom kliničkog deficita vitamina B12 (90, 111, 166, 238). Homocistein i MMA imaju uporedljivu osetljivost na klinički deficit kobalamina i mogu se koristiti za praćenje terapije (166, 239). Nivo Hcy se povećava na početku deficita, pre simptoma, i progredira ukoliko se ne primeni terapija (90). Smanjenje povećanih nivoa Hcy nakon terapije kobalaminom je potvrda deficita, koji može biti i subklinički (65). U zemljama u kojima se hrana obogaćuje folatom, neadekvatan status kobalamina je dominantan nutritivni faktor hiperhomocisteinemije (238). Sa druge strane, u zemljama koje ne obogaćuju hranu folnom kiselinom, folat objašnjava 15% varijacije u koncentraciji Hcy, dok na kobalamin otpada 4% (240). Povećani nivoi Hcy u krvi nisu specifični samo za deficit kobalamina i folata već se javljaju i u deficitu vitamina B6, u slučaju smanjene bubrežne funkcije, hipotiroidizma (84). Starost i pol, takođe, utiču na vrednosti Hcy (84, 241). Polimorfizam gena za metilen-tetrahidrofolat reduktazu (C677T), dovodi do toga da homozigoti, koji čine 10% populacije na zapadu, imaju 25% veće koncentracije Hcy u odnosu na gornju granicu referentnog opsega. Na nivo Hcy utiče i pušenje, prekomerno konzumiranje kafe, lekovi kao što je levodopa (65).

#### **1.4.2.4. Određivanje metilmalonske kiseline**

Metilmalonska kiselina je jedna od nekoliko dikarboksilnih kiselina prisutnih u krvi i urinu (65). Određivanje MMA u urinu kao prvi koristan metabolički test za deficit vitamina B12 pojavio se 60-ih godina prošlog veka (242). Tada se MMA određivala gasnom hromatografijom (GH) (98, 242), a 1979. pojavila se gasna hromatografija–masena spektrometrija (GH/MS) kao osetljivija metoda za određivanje dikarboksilnih kiselina u urinu (98, 243). Zatim je kapilarna gasna hromatografija–masena spektrometrija sa različitim modifikacijama omogućila tačno i precizno određivanje malih koncentracija ovog analita u serumu (98, 244, 245). Tečna hromatografija i kapilarna elektroforeza takođe se mogu koristiti za analizu MMA (246, 247).

Referentna metoda za određivanje MMA još uvek nije ustanovljena i NIST trenutno nastoji da je razvije, kao i referentne materijale. Materijali SRM 909 sa vrednošću MMA 170 nmol/L i SRM 1950 sa koncentracijom MMA 300 nmol/L pogodni su za upotrebu, ali ne i SRM 3591, koji ima vrednost MMA 35 nmol/L (248).

Metilmalonska acidurija je osetljiv indikator deficita vitamina B12 (249), osim kada je uzrokovana greškom u metabolizmu (50). Normalno se metilmalonat ekskretuje u tragovima, 0–3.4 mg/danu. Terapija kobalaminom normalizuje ekskreciju za nekoliko dana (50). Koncentracija MMA u urinu je veća nego u plazmi, potrebno ju je normalizovati za koncentraciju kreatinina u urinu i korigovati zbog efekta bubrežnog oštećenja ili dehidracije (65).

Na nivo MMA ne utiče ishrana i može se određivati u istom uzorku kao i vitamin B12 (65). Međutim, MMA ima određena ograničenja, tj. njena specifičnost nije u potpunosti ispitana (98). Istraživanje sprovedeno u Norveškoj identifikovalo je godine, pol, kreatinin i kobalamin kao glavne determinante koje objašnjavaju 16% varijacije u nivou MMA (250). Studija Lewerin i saradnika pokazala je da kobalamin predviđa samo 2% vrednosti MMA u serumu, dok cistatin C kao marker bubrežne funkcije predviđa 8% vrednosti (240). Prekomerni razvoj bakterija u crevima može biti uzrok povećanih vrednosti MMA uprkos terapiji vitaminom B12 kod pacijenata sa sindromom kratkog creva (251). Tokom trudnoće dolazi do povećanja koncentracije MMA (252–254).

Osobe koje su heterozigoti za naslednu metilmalonsku acidemiju nemaju značajno povećane nivoe MMA u serumu (255). S druge strane, čest polimorfizam rs291466 HIBCH gena (gen za 3-hidroksi-izobutiril-CoA hidrolaza) je kobalamin nezavisna determinanta koncentracije MMA u plazmi, što utiče na njen značaj kao indikatora statusa vitamina B12 kod starijih kada se primene važeće granične vrednosti. Postoji značajna povezanost između ove genetske varijante i povećanih nivoa MMA u krvi (256). Takođe, mutacija u genima za mitohondrijalnu sukcinil-CoA sintetazu dovodi do povećanja koncentracije MMA (257).

Više studija se bavilo određivanjem referentnog opsega za MMA (250, 258, 259). Granične koncentracije za deficit kobalamina se kreću od 210 nmol/L do 480 nmol/L. Najčešće korišćena koncentracija je 270 nmol/L (98, 99). Za definisanje graničnih vrednosti korišćeni su različiti pristupi:

- određivanje prelomne tačke kada vrednost MMA počinje da raste, a vrednost vitamina B12 da opada (98);
- 2 ili 3 standardne devijacije od srednje vrednosti (98);
- određivanje na uzorku pacijenata sa popunjenim zalihama kobalamina (98, 250, 259, 260).

Dobijeni različiti rezultati za granične vrednosti MMA za deficit kobalamina posledica su različitih populacija u kojima su vršena istraživanja i kriterijuma za definisanje deficita vitamina B12 (250).

Povećane vrednosti metilmalonske kiseline i/ili Hcy u serumu smatraju se najpouzdanijim indikatorima nedostatka kobalamina kod pacijenata bez kongenitalnih poremećaja u njihovom metabolizmu (50). Njihove koncentracije su povećane u više od 90% pacijenata sa kliničkim deficitom i rastu pre nego što serumski nivo kobalamina postane subnormalan (50). Lindenbaum i saradnici navode u svom istraživanju da su MMA i/ili Hcy bili povećani u više od 95% slučajeva hematološkog relapsa kod pacijenata sa pernicioznom anemijom i gastrektomijom, dok je serumski kobalamin bio snižen u 69% slučajeva. U odsustvu hematološkog relapsa vrednost MMA povećavala se dva puta češće nego što je koncentracija kobalamina opadala. Takođe su uvidom u medicinsku dokumentaciju uočili da je kod određenog broja pacijenata sa klinički manifestnim deficitom koncentracija kobalamina u serumu bila veća od 148 pmol/L, dok su MMA i Hcy bili povišeni (111). Pad u koncentraciji MMA koji prati terapiju kobalaminom još uvek nije standardizovan kao funkcionalni test, iako može pružiti potvrdu deficita, kao i kontrolu terapije (84).

Uprkos većoj osetljivosti MMA u odnosu na vitamina B12, određivanje koncentracije MMA nije test od koga se prvo kreće u ispitivanju statusa vitamina B12. Razlog je pre svega velika osetljivost samog kobalamina za klinički manifestni deficit, kao i bolje ispitan uticaj drugih faktora na njegove vrednosti u odnosu na druge

biomarkere (99). Takođe, potreba za posebnom aparaturom i cena testa otežavaju širu primenu određivanja MMA (134). Određivanje MMA se obično primenjuje kada postoji sumnja na deficit kobalamina, ali je sam kobalamin u referentnom opsegu ili kada se nivo kobalamina nalazi u tzv. sivoj zoni (134). Koncentracije MMA u referentnom opsegu idu u prilog normalnom statusu vitamina B12, čak i kada je koncentracija kobalamina niska (98).

Za razliku od klinički manifestnog oblika deficita, teško je utvrditi osetljivost MMA za SCCD, jer ne postoji biomarker koji predstavlja zlatni standard u odnosu na koji bi se izvršilo poređenje. U SCCD vrednosti MMA obično su umereno povišene, retko prelaze 800 nmol/L (98). Povećani nivoi MMA češće se sreću u epidemiološkim istraživanjima nego niske koncentracije kobalamina (98). Hvas i saradnici su analizirali razloge za upotrebu MMA kao testa za deficit vitamina B12 (261). Zaključak njihovog istraživanja je da korist od primene MMA kao skrining testa nije utvrđena, kao i da davanje terapije na osnovu umereno povećanih vrednosti MMA najverovatnije vodi ka prekomernoj upotrebi vitamina B12 (261). Jedan od zaključaka NHANES (engl. National Health and Nutrition Examination Survey) istraživanja sprovedenog u SAD jeste da se u epidemiološkim istraživanjima kobalamin i MMA određuju istovremeno kako bi se izbegle lažno pozitivne dijagnoze deficita vitamina B12 (248).

#### **1.4.2.5. Kombinovanje biomarkera u jedan indikator**

S obzirom na sve nedostatke pojedinačne upotrebe biomarkera statusa vitamina B12, razvijen je matematički model koji kombinuje četiri biomarkera u jedan, tzv. kombinovani indikator statusa vitamina B12 (engl. combined indicator of B12 status, cB12) (112, 170, 262). Određuje se putem formule:

$$cB12 = \log_{10}[(\text{holo-TCII} \times \text{koncentracija B12 u srumu}) / (\text{MMA} \times \text{Hcy})] - (\text{starosni faktor}) \quad (112)$$

Navedena formula predstavlja Fedosov skor zdravlja (engl. Fedosov's wellness score). Rezultati se interpretiraju kao visoko normalan, normalan, nisko normalan, deficit, težak deficit (170). Prednost cB12 je u tome što ne zavisi od referentnih intervala i može se korigovati za status folata i godine pacijenta. Kombinovani indikator

je pokazao veću povezanost sa koncentracijama hemoglobina, kognitivnom funkcijom i provodljivošću kroz periferne nerve u odnosu na pojedinačne biomarkere. Potrebno je potvrditi njegov klinički značaj (84).

Međutim, cena istovremenog određivanja četiri biomarkera isključuje mogućnost rutinske primene cB12 (170). Model sa dve ili tri varijable takođe postoji i procenjeno je da ima prihvatljivu grešku u poređenju sa modelom sa četiri varijable (170). Za model od tri varijable najbolje je koristiti vitamin B12, holo-TCII i MMA ili kombinovati vitamin B12 ili holo-TCII sa MMA i Hcy. Kada se koristi model od dve varijabe, najmanja greška u odnosu na model sa četiri varijable pravi se kombinovanjem holo-TCII i MMA (170).

## **1.5. Funkcionalni laboratorijski testovi za ispitivanje statusa vitamina B12**

U funkcionalne testove za ispitivanje statusa vitamina B12 spadaju: merenje metaboličkog odgovora nakon jedne nedelje terapije kobalaminom, ispitivanje apsorpcije kobalamina i deoksiuridin supresivni test (65).

### **1.5.1. Šilingov test**

Kod pacijenata koji imaju deficit vitamina B12, a koji nije uzrokovan niskim unosom kobalamina, i koji nemaju anti-IF antitela, važno je ustanoviti da li je smanjen kapacitet apsorpcije kobalamina (65). Testove za procenu apsorpcije treba raditi kod pacijenata sa niskim vrednostima kobalamina u krvi i kod kojih postoji: makrocitoza, hipersegmentovani neutrofili, povećane vrednosti metaboličkih markera, megaloblastna anemija ili neuropatija (65). Na taj način se izbegava testiranje osoba sa lažno niskim koncentracijama kobalamina ili nedefinisanim statusom vitamina B12 (65). Ukoliko je uzrok deficita malapsorpcija, potrebno je ispitati da li je problem na nivou želuca ili intestinuma (84).

U cilju procene apsorpcije kobalamina ranije se koristio Šilingov test (engl. Schilling test). U protekle dve decenije njegova upotreba je smanjena, a glavni razlozi su smanjena dostupnost radioaktivno obeleženog vitamina B12 i cena. Još uvek nema adekvatne zamene koja je validirana (84).

Šilingovim testom se pratila apsorpcija oralno datog, radioaktivno obeleženog cijanokobalamina. Interpretacija rezultata zasnivala se na merenju radioaktivnosti u 24-voro časovnom urinu (50, 263). Test se mogao primeniti i nakon terapije deficita (50). Postojali su i drugi testovi za procenu apsorpcije kobalamina kao što je preuzimanje od strane jetre, merenje radioaktivnosti u stolici, krvi, celog tela, ali je Šilingov test imao prednost zbog tačnosti, brzine izvođenja i jednostavnosti (263).

Sastojao se iz 4 dela:

- I deo – osnovni test;
- II deo – test sa IF;
- III deo – terapija antibioticima;
- IV deo – uzimanje pankreasnih enzima tokom 3 dana (170).

Nakon gladovanja i mokrenja, pacijentu bi se dao oralni preparat radioaktivno obeleženog cijanokobalamina. Tokom naredna 24 sata prikupljao se urin. Nakon dva sata od oralne doze, injekcijom se davao 1 mg neobebeženog cijanokobalamina kako bi se zasitili cirkulišući kobalamin vezujući proteini. Zdravi pacijenti tokom 24 sata ekskretuju urinom najmanje 7% od primenjene količine radioaktivnosti. Ukoliko je količina radioaktivnosti u urinu bila niska, drugi deo Šilingovog testa bi se sprovodio pet dana kasnije. Ovaj period je omogućavao da neobebeženi kobalamin koriguje megaloblastozu intestinalnih ćelija. U drugom delu testa procedura je bila ista, s tim što se oralno uzimao IF svinjskog porekla zajedno sa radioaktivno obebeženim cijanokobalaminom. Ukoliko je nedostatak IF bio uzrok smanjene radioaktivnosti u urinu u prvom delu testa, u drugom delu testa dolazilo je do povećanja (50, 264–266). Ako je u drugom dela testa smanjeno izlučivanje radioaktivno obebeženog cijanokobalamina, uzrok malapsorpcije može biti u intestinumu, npr. Kronova bolest. Ukoliko nakon terapije antibioticima dođe do povećanja radioaktivnosti u urinu, uzrok malapsorpcije je prekomerni rast bakterija u crevima. Ako se nakon korišćenja

pankreasnih enzima poveća radioaktivnost, uzrok malapsorpcije je pankreasna insuficijencija (170).

Primarni uzrok grešaka u Šilingovom testu bio je neadekvatno prikupljen 24-voro časovni urin (50). Procena kvaliteta uzorka mogla se uraditi određivanjem kreatinina u sakupljenom urinu (50).

Zbog bolesti bubrega ekskrecija radioaktivnosti može biti odložena što dovodi do lažno pozitivnog rezultata testa. Kod teškog oblika bubrežne insuficijencije moglo se koristiti merenje radioaktivnosti celog tela (50). Uzroci lažno pozitivnih rezultata bili su i neadekvatna saturacija vezujućih proteina neobebeženim kobalaminom, neaktivni IF, neutralizacija IF antitelima u stomaku, malapsorpcija usled megaloblastnih promena u ileumu (50).

Lažno negativni rezultati Šilingovog testa dobijali su se kod pacijenata koji apsorbuju slobodan kobalamin, ali ga ne mogu osloboditi iz hrane (50). Ranije primenjen Šilingov test ili neki drugi test tokom kojeg je korišćen radioaktivni obeleživač mogli su dovesti do lažno negativnih rezultata (50).

### **1.5.2. Potencijalna zamena za Šilingov test**

Kao moguća zamena za Šilingov test ispituje se promena koncentracije endogenog holo-TCII ili količine cijanokobalamina vezanog za transkobalamin II nakon opterećenja oralnim dozama cijanokobalamina (267–271).

CobaSorb je test za procenu apsorpcije kobalamina (203). Osnov za razvoj ovog testa je naglo povećanje koncentracije holo-TCII pri unosu vitamina B12 (203, 272). U testu se određuje holo-TCII u krvi pre i nakon 1–2 dana uzimanja tri puta po 9 µg cijanokobalamina dnevno (203). Povećanje holo-TCII > 22% ili > 10 pmol/L nakon dva dana ukazuje na aktivnu apsorpciju (203). Test se ne koristi kada je bazični nivo holo-TCII > 65 pmol/L već se preporučuje C-CobaSorb test (203). Kod C-CobaSorb testa meri se povećanje vezane količine cijanokobalamina za transkobalamin II (203). Do sada se CobaSorb testom dobijao odgovor na pitanje da li ima ili nema apsorpcije kobalamina i trenutno nije poznato da li može da klasifikuje pacijente kod kojih postoji



apsorpcija, ali je malog kapaciteta (203). Uvođenjem rekombinantnog humanog IF (rhIF) omogućeno je identifikovanje tri obrasca apsorpcije:

- porast holo-TCII  $\geq 10$  pmol/L nakon davanja slobodnog cijanokobalamina (nedostatak u ishrani ili nemogućnost oslobađanja kobalamina iz hrane);
- porast holo-TCII  $< 10$  pmol/L nakon davanja slobodnog cijanokobalamina i porast holo-TCII  $\geq 10$  pmol/L nakon dodatka rhIF (nedostatak IF);
- porast holo-TCII  $< 10$  pmol/L nakon davanja slobodnog cijanokobalamina sa ili bez rhIF (malapsorpcija) (273).

U literaturi je opisan još jedan test za procenu apsorpcije kobalamina. Zasniva se na brojanju izotopa  $^{14}\text{C}$  u krvi nakon oralnog uzimanja jedne doze radioaktivno obeleženog  $^{14}\text{C}$ -cijanokobalamina. Za brojanje izotopa koristi se akcelerator masenog spektrometra. Na taj način omogućena je velika osetljivost određivanja i potreba za veoma malom količinom uzorka. Za razliku od Šilingovog testa, u kojem je korišćen kobalamin sa radioaktivno obeleženim kobaltom, ovde se koristi radioaktivno obeležen C u nukleotidnoj petlji kobalamina. Korišćena radioaktivnost je na ambijentalnom nivou. Druga potencijalna korist od ovog testa jeste način na koji je dobijen  $^{14}\text{C}$ -cijanokobalamin, tj. mikrobiološkom sintezom  $^{14}\text{C}$ -adenozilkobalamina kojem je kasnije zamenjen gornji ligand cijano grupom (274).

### 1.5.3. Deoksiuridin supresivni test

Za razliku od Šilingovog ili CobaSorb testa, deoksiuridin supresivni test je in vitro test i uglavnom se koristi za potrebe istraživanja (50, 65). Iako se njime mogu dijagnostikovati određena oboljenja, ne koristi se u te svrhe, jer se mogu upotrebiti drugi laboratorijski testovi, terapijski pokušaji lečenja vitaminima ili samo posmatranje pacijenta (50).

Test se zasniva na suprimiranju ugradnje radioaktivno obeleženog deoksitimidina (dT) u DNK od strane neobeleženog deoksiuridina (dU) u kulturi limfocita ili ćelija koštane srži pacijenta (50, 275–277). Deoksiuridin se prvo fosforiliše u deoksiuridin monofosfat (dUMP) u prisustvu timidin kinaze, a zatim se dUMP metiluje u deoksitimidin monofosfat (dTMP) u prisustvu timidilat sintetaze. Na ovaj

način nastaje neobeleženi dTMP, koji kada je u višku suprimira ugradnju obeleženog dTMP, nastalog iz obeleženog dT. Test se izvodi tako što se limfociti ili ćelije koštane srži pacijenta inkubiraju sa dU, a kontrolne ćelije bez dU. Zatim se i pacijentove i kontrolne ćelije ponovo inkubiraju, sada sa obeleženim dT. Nakon toga određuje se % inkorporiranog obeleženog dT u kulturi pacijentovih ćelija u odnosu na ćelije kontrole. Normalan rezultat iznosi < 10% radioaktivnosti kontrolnog uzorka (50). Ako je aktivnost enzima timidilat sintetaze niska, konverzija dUMP u dTMP je usporena, zbog čega je supresivni efekat dU na preuzimanje obeleženog dTMP smanjen. Enzim timidilat sintetaza koristi N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metilen-tetrahidrofolat kao izvor metil grupe i direktno zavisi od prisustva folata i indirektno od prisustva kobalamina. Zbog toga u deficitu folata i/ili kobalamina dolazi do smanjenja supresivnog efekta dU na preuzimanje obeleženog dT i porasta % izmerene radioaktivnosti u uzorku (50).

Supresivni efekat dU je oslabljen u slučaju nutritivnih megaloblastnih anemija i određenih naslednih poremećaja metabolizma folata i kobalamina (50), što ne važi i za druga megaloblastna stanja (278). U slučaju nutritivnih megaloblastnih anemija dU supresivni test se koriguje dodavanjem folata ili kobalamina. U nedostatku folata korekcija nastaje dodatkom samog folata, N<sup>5</sup>-formil-tetrahidrofolata i N<sup>5</sup>-metil-tetrahidrofolata, ali ne i cijanokobalamina. Kod nedostatka vitamina B12 do korekcije će dovesti cijanokobalamin, folat i N<sup>5</sup>-formil-tetrahidrofolat. Deoksiuridin supresivni test može otkriti i subkličički deficit kobalamina (50).

## **1.6. Ostali testovi za ispitivanje statusa vitamina B12**

Merenje nezasićenog kapaciteta vezivanja vitamina B12 retko se koristi i to samo u referentnim laboratorijama. Uglavnom se primenjuje radi utvrđivanja deficita haptokorina kao uzroka veoma niskih koncentracija kobalamina u krvi u odsustvu kliničke slike. Takođe, primenjuje se i kod ispitivanja retkog deficita transkobalamina II (65).

U odsustvu adekvatne zamene za Šilingov test, drugi testovi se mogu koristiti za utvrđivanje uzroka malapsorpcije kobalamina kao što je određivanje anti-IF antitela, antitela protiv parijetalne H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATP-aze, nivo pepsinogena, nivo gastrina (65, 84, 279).

Antitela protiv parijetalnih ćelija želuca prisutna su kod 90% pacijenata sa pernicioznom anemijom, ali imaju nisku specifičnost (65, 280). Pronađena su kod 15% starijih osoba (65).

Na ahlorhidriju se može posumnjati ukoliko su povišeni nivoi gastrina u serumu. (281). Otkriće atrofičnog gastritisa tokom endoskopije gornjeg dela gastrointestinalnog trakta može ukazati na pernicioznu anemiju. Pacijenti sa ovom bolešću imaju atrofični gastritis, ali je potrebno isključiti njegove neimunološke uzroke (84).

Dva tipa anti-IF antitela su detektovana u serumu pacijenata sa pernicioznom anemijom (65, 282, 283). Antitela tipa I sprečavaju vezivanje kobalamina za IF, a tip II sprečava vezivanje IF ili kompleksa IF-Cbl za receptor u ileumu (65). Više od 60% pacijenata sa pernicioznom anemijom ima jedan ili drugi tip anti-IF antitela (65).

Automatizovani kompetitivni testovi zamenili su radioaktivne kompetitivne testove koji su detektovali samo tip I antitela. Trenutne metode za tip I antitela jesu adaptacija kompetitivnih testova za vitamin B12. Serum pacijenta se inkubira sa obeleženim IF. Antitela iz uzorka se vezuju za obeleženi IF uz reagensa. Metoda je osetljiva na uticaj slobodnog kobalamina iz krvi, jer može da veže IF iz reagensa. Pod fiziološkim uslovima 99% kobalamina u krvi vezano je za proteine i neće interferirati. Međutim, kod pacijenata sa visokim nivoom cirkulišućeg slobodnog kobalamina ( $> 444$  ng/L ili  $> 328$  pmol/L), npr. nakon intramuskularne injekcije vitamina B12, može doći do disproporcionalnog povećanja nivoa anti-IF antitela (65). Proizvođači testa naglašavaju do kog nivoa kobalamina se rezultat može izdati (134).

ELISA test detektuje oba tipa antitela. Serum se inkubira sa IF vezanim za čvrstu fazu, tako da su mesta vezivanja za oba tipa antitela dostupna. Specifičnost testa zavisi od čistoće IF vezanog za čvrstu fazu. ELISA testovi različitih proizvođača koriste IF različitog porekla, svinjski ili rekombinantni, i imaju različit stepen pozitivnih rezultata. To odražava različitu osetljivost i specifičnost antitela prisutnih u serumu pacijenta (65).

Internacionalni referentni i kalibracioni materijal za anti-IF antitela nije dostupan. Zato se rezultati za obe metode prikazuju arbitrarno (65).

Test za anti-IF antitela ima visoku pozitivnu prediktivnu vrednost (95%) za pernicioznu anemiju (134, 284). Negativan rezultat ne znači odsustvo perniciozne anemije (134). S obzirom na to da visok titar anti-IF antitela može da ometa određivanje kobalamina tako što prouzrokuje lažno normalan rezultat, testiranje na njihovo prisustvo savetuje se kada su prisutni izraženi simptomi deficita iako je nivo kobalamina u serumu normalan (134).

## **1.7. Testovi za ispitivanje statusa folata**

Ispitivanje statusa folata je značajno, jer deficiti kobalamina i folata dovode do identičnih promena u perifernoj krvi i koštanoj srži (77).

Pod izrazom folat podrazumevaju se različite biološki aktivne forme ovog vitamina: dihidrofolat, tetrahidrofolat, tetrahidrofolat sa supstituentima (metil, formil, formimino, hidroksimetil, metenil, metilen) (50, 134). Folna kiselina je sintetski oblik koji se koristi u terapiji, suplementaciji i za obogaćivanje hrane. I folat i folna kiselina se apsorbuju u proksimalnom delu tankog creva (134), ali je bioraspoloživost folata iz hrane manja od folne kiseline (134, 285). Oko polovine sadržaja folata u organizmu nalazi se u jetri (134).

Smanjen unos ili smanjena apsorpcija dovodi do sniženih vrednosti folata u krvi, a zatim u tkivima. Međutim, ne postoji jasno definisan put od nedostatka folata u tkivima do simptoma megaloblastne anemije, jer biohemijski deficit može postojati u odsustvu kliničkih simptoma (134). Sa obogaćivanjem hrane folatom značajno se smanjila incidenca deficita (134, 286).

Za određivanje koncentracije folata može se koristiti serum, plazma i eritrociti (287–289). Mikrobiološki testovi su se prvi koristili, zatim su se razvili testovi sa radioaktivnim obeleživačem (65), a danas većina laboratorija koristi kompetitivne testove sa folat vezujućim proteinima i hemiluminiscentnim ili fluorescentnim detekcionim sistemima (134).

Savremeni testovi za određivanje folata u serumu imaju određene zajedničke korake. Potrebno je prvo osloboditi folat iz kompleksa sa endogenim proteinima alkalnom denaturacijom. Dve trećine folata u krvi u obliku 5-metil-tetrahidrofolata je

vezano slabom vezom za serumske proteine, a manji deo za solubilne folat receptore koji potiču sa ćelijskih membrana. Nakon oslobađanja iz proteinskih kompleksa, potrebno je sprečiti ponovno vezivanje i održati folat u redukovanoj formi. Oslobodeni folat se zatim vezuje za proteine iz reagensa i u tu svrhu često se koristi  $\beta$ -laktoglobulin iz kravljeg mleka. U većini testova se folat iz seruma takmiči sa obeleženim folatom iz reagensa za ograničen broj vezujućih mesta na folat vezujućem proteinu. Razdvajanje vezane od nevezane frakcije postiže se različitim elektro-hemijskim ili fizičko-hemijskim i imunološkim metodama (65).

Koncentracija se određuje na osnovu generisanog signala koji potiče od obeleženog folata: hemiluminiscencija, elektrohemiluminiscencija, fluorescencija (65).

Određivanje folata komplikuje to što biološku aktivnost poseduje više formi koje se međusobno razlikuju po oksidativnom stanju pterinskog prstena, grupama sa jednim ugljenikovim atomom vezanim za prsten i dužini glutamat lanca. Ove forme mogu biti degradirane na proizvode koji nemaju biološku aktivnost, ali interferiraju tokom merenja. Tokom obrade uzorka za određenu metodu može doći do prelaska jednog oblika u drugi, kao i do nastanka forme koja nije prirodno zastupljena u tom tipu biološkog materijala. Na određivanje ukupne količine folata ne bi trebalo da utiče interkonverzija dokle god su forme stabilne, zadržavaju svoju biološku aktivnost i podjednako efikasno se određuju. Kada je potrebno odrediti pojedinačne forme folata, veoma je važno da rezultat odražava in vivo koncentracije (288).

Mnogi istraživači su favorizovali mikrobiološke testove za folat (288–290), jer se njima određuju svi oblici folata koji imaju aktivnost vitamina, a ne određuju se degradacioni produkti koji tu aktivnost ne pokazuju (288). U kompetitivnim testovima različiti oblici folata vezuju se različitim afinitetom za proteine iz reagensa. To je problematično i sa aspekta pouzdanosti metode i sa aspekta genotipa koji uslovljava razlike u pogledu prisustva formi folata u eritrocitima. Jedini način da se koriguju razlike u vezivanju jeste da se definišu odvojeni standardi za svaku vrstu folata u uzorku (288).

Internacionalna referentna metoda za određivanje 5-metil-tetrahidrofolata, folne kiseline i 5-formil-tetrahidrofolata u serumu jeste izotop diluciona tečna hromatografija tandem masena spektrometrija (ID-LC-MS/MS) (65, 291), a referentni materijali su WHO IS 03/178 i SRM 1955 (65, 233, 292). Koncentracija ukupnog folata u WHO IS 03/178 iznosi 12.1 nmol/L, od toga je 9.75 nmol/L 5-metil-tetrahidrofolata sa CV 5.5%, 1.59 nmol/L 5-formil-tetrahidrofolata sa CV 4.2% i 0.74 nmol/L folne kiseline sa CV 31.6% (292). Za SRM 1955 postoje sertifikovane vrednosti za tri nivoa 5-metil-tetrahidrofolata određene ID-LC-MS/MS (233). Za folnu kiselinu postoje referentne koncentracione vrednosti određene LC-MS/MS, jer slaganje između metoda za ovako niske koncentracije ne ispunjava NIST kriterijum za sertifikovane vrednosti (233). Ovaj standard poseduje i informativne vrednosti za ukupan folat i 5-formil-tetrahidrofolat koje se odnose na različite metode njihovog određivanja, ali se ne mogu koristiti za uspostavljanje sledljivosti (233). Kalibracija testova za folat sledljiva ID-LC-MS/MS metodi povećala je puzdanost testova i njihovo slaganje (293). Iako referentna metoda za folat u punoj krvi nije verifikovana, postoji WHO IS 95/528 standard (65), a koncentracija ukupnog folata je konsenzus vrednost dobijena mikrobiološkim i protein vezujućim testovima (65, 294).

Komercijalni standard za određivanje folata u serumu trebalo bi da bude 5-metil-tetrahidrofolat, jer je to fiziološki aktivni oblik folata. Međutim, veoma je nestabilan zbog čega se koristi pteroilglutaminska kiselina (PGA). Da bi se PGA mogla koristiti u kalibraciji testova za folat, mora se vezivati za folat vezujuće proteine ekvivalentno vezivanju 5-metil-tetrahidrofolata. Većina proizvođača folat testova koristi PGA kalibratore. Ukoliko se koristi 5-metil-tetrahidrofolat kao kalibrator, metoda koja se kalibriše treba biti optimizovana za detekciju 5-metil-tetrahidrofolata (65).

Uzorak za određivanje folata u eritrocitima obično je puna krv uzorkovana u epruveti sa etilen diamino tetraacetatom (EDTA) kao antikoagulansom. Antikoagulansi heparin i citrat-fosfat-dekstroza takođe se mogu koristiti, ali ne u svim testovima. Uzorak se može čuvati 48 sati na temperaturi od 4°C (65). Metode za određivanje folata u eritrocitima zasnivaju se na vezivanju za proteine, ali je potrebno prvo osloboditi folat iz eritrocita. Afinitet folat vezujućih proteina zavisi od broja ostataka glutaminske kiseline. Reproducibilnost testova se može postići samo oslobađanjem i konverzijom

folat-poliglutamata vezanog za proteine u monoglutamat. Uklanjanje ostataka glutaminske kiseline vrši enzim prisutan u plazmi, poliglutamata hidrolaza (65).

Kako bi se folat oslobodio iz eritrocita i uklonili ostaci glutamata, mora postojati odgovarajuće razblaženje u hipotonom rastvoru, npr. rastvoru askorbinske kiseline, pH 3.0–6.0 (idealno 4.5–5.2), a askorbinska kiselina je potrebna da se stabilizuje redukovana forma folata (65, 295, 296). Način pripreme hemolizata za nove platforme testova veoma varira. Koncentracija askorbinske kiseline varira od 0.09% do 1%, a faktor razblaženja od 1:5 do 1:31, kao i trajanje pripreme hemolizata, od 40 min. do 180 min. Neki testovi zahtevaju dodatak proteina hemolizatu pre analize i upotrebu goveđeg seruma ili humanog albumina, dok je za druge potreban vodeni rastvor. Različiti faktori mogu uticati na pojavu velikih inter-metod razlika u rezultatima koje su uočene prilikom sprovođenja spoljašnje kontrole kvaliteta. Neadekvatno liziranje eritrocita i dekonjugacija folata uzrok su lažno niskih koncentracija. Folat oslobođen iz eritrocita poželjno je odrediti odmah nakon pripreme, ali je lizat stabilan 24h na 4°C. Čuvanje na -20°C na duži period je dozvoljeno, ali se 10% niže vrednosti dobijaju nakon jednog ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja. Nakon pripreme hemolizata, folat se određuje na isti način kao i folat u serumu (65).

Kada se dobije koncentracija folata, potrebno je rezultat pomnožiti sa faktorom razblaženja i podeliti sa hematokritom (Hct) kako bi se dobila nekorigovana koncentracija u eritrocitima (65). Ukoliko je moguće, potrebno je korigovati dobijenu vrednost za vrednost serumskog folata, što kod pacijenata koji uzimaju suplementaciju može biti značajno (65).

Korigovana vrednost folata u eritrocitima ( $\mu\text{g/L}$ ) = nekorigovani folat u eritrocitima ( $\mu\text{g/L}$ ) – [folat u serumu ( $\mu\text{g/L}$ ) x (1-Hct)/Hct] (65)

Na nivo folata u serumu utiče nagla promena u ishrani i prekid enterohepatične cirkulacije, zbog čega može biti nizak i bez deficita u tkivima. To može biti problem kod bolničkih pacijenata (65). Jedno određivanje koncentracije folata nije dovoljno kako bi se napravila razlika između prolaznog smanjenja i hronično deficitnog stanja. Niske koncentracije dobijene pri ponovljenom određivanju nakon mesec dana indikativne su za deficit (297).

Za folat u eritrocitima se smatralo da bolje korelira sa megaloblastnim promenama, jer odražava status folata tokom životnog veka eritrocita (65). Međutim, postoje istraživanja koja opovrgavaju prednost folata u eritrocitima nad serumskim folatom (298, 299). Istraživanje Farrel i saradnika ukazuje da je određivanje folata u serumu jeftinije, brže i pod uticajem manjeg broja analitičkih varijabli nego određivanje folata u eritrocitima (300). Snižene vrednosti folata u eritrocitima nisu specifične samo za deficit folata već se mogu javiti i u deficitu kobalamina (301). Više od polovine pacijenata sa teškim oblikom deficita kobalamina ima snižene vrednosti folata u eritrocitima, jer izostanak sinteze metionina dovodi do akumulacije 5-metil-tetrahidrofolata monoglutamata koji napušta ćelije što dovodi do porasta nivoa folata u serumu (65).

Izostanak standardizacije testova za folat u eritrocitima uzrok je slabog slaganja između metoda (65, 134). Svetska zdravstvena organizacija navodi preporučene granične vrednosti za oba parametra, i folat u serumu i folat u eritrocitima, ali za potrebe epidemioloških istraživanja daje prednost folatu u serumu (85). Određivanje folata kod pacijenata bez faktora rizika za deficit ima mali klinički značaj (302).

Granične koncentracije za folat prvi put su predložene 1968 (303, 304). Vrednosti indikativne za deficit postavljene su na osnovu verovatnoće pojave makrocitne anemije, a određene su mikrobiološkim testom (303). Ove koncentracije je odobrila WHO 1972 (305) i 1975 (306).

**Tabela 1. Granične vrednosti za folat na osnovu rizika za pojavu makrocitne anemije<sup>10</sup>**

Nivo folata u serumu/plazmi ng/mL (nmol/L)	Folat u eritrocitima ng/mL (nmol/L)	Interpretacija
> 20 (45.3)		povećan
6–20 (13.5–45.3)		normalan opseg
3–5.9 (6.8–13.4)		moguć deficit
< 3 (< 6.8)	< 100 (226.5)	deficit

<sup>10</sup>WHO. Serum and red blood cell folate concentrations for assessing folate status in populations. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva: World Health Organization; 2015.  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162114/1/WHO\\_NMH\\_NHD\\_EPG\\_15.01.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162114/1/WHO_NMH_NHD_EPG_15.01.pdf?ua=1) (303)



Granične koncentracije su 2005. revidirane na osnovu promena metaboličkih indikatora. Vrednosti su određene radioimunotestom (303).

**Tabela 2. Granične vrednosti za folat na osnovu koncentracije homocisteina<sup>10</sup>**

Indikator statusa folata	Granična koncentracija za deficit ng/mL (nmol/L)
serum/plazma folat	< 4 (< 10)
folat u eritrocitima	< 151 (< 340)

Ove koncentracije su dobijene na osnovu NHANES III istraživanja na američkoj populaciji muškaraca i žena starijih od 30 godine i predstavljaju nivo folata u serumu/plazmi, odnosno u eritrocitima ispod kojeg homocistein počinje da raste (303, 307). Vrednosti se primenjuju na sve starosne grupe, ali nisu pogodne za trudnice, jer koncentracija folata opada tokom trudnoće, kao i za sprečavanje defekta neuralne tube (303). U izveštaju WHO iz 2015. navode se vrednosti folata u eritrocitima > 400 ng/mL (> 906 nmol/L) za žene u reproduktivnom periodu pri kojima se postiže najveća redukcija pojave defekta neuralne tube. S druge strane, nijedan nivo serumskog folata nije preporučen za prevenciju defekta neuralne tube (303).

## **1.8. Monitoring statusa vitamina B12 i dijagnostika deficita**

Prema zaključcima sa tehničkih konsultacija o deficitu vitamina B12 i folata na nivou WHO, preporučuje se ispitivanje statusa vitamina B12 i folata u sklopu nacionalnih istraživanja uz standardizaciju metoda za određivanje koncentracija vitamina u krvi i korišćenje univerzalnih graničnih vrednosti (85). Određivanje koncentracije vitamina B12 u serumu ili plazmi, kao i koncentracije serum/plazma

---

<sup>10</sup>WHO. Serum and red blood cell folate concentrations for assessing folate status in populations. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva: World Health Organization; 2015.  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162114/1/WHO\\_NMH\\_NHD\\_EPG\\_15.01.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162114/1/WHO_NMH_NHD_EPG_15.01.pdf?ua=1) (303)

folata ili folata u eritrocitima obezbeđuje pouzdane informacije o statusu ova dva vitamina u populaciji (85).

U razvijenim zemljama poput SAD, klinički deficit kobalamina je redak. S obzirom na to da nema dovoljno dokaza da SCCD ima negativne posledice po zdravlje stanovništva, još uvek nema preciznog odgovora da li je potreban njegov monitoring. Potrebne su dodatne kliničke studije koje će potvrditi uzročnu vezu između SCCD i negativnih posledica po zdravlje (248).

Razlog za buduća istraživanja statusa vitamina B12 u SAD jeste zabrinutost da visoke koncentracije folata zbog obogaćivanja hrane maskiraju hematološke manifestacije deficita kobalamina. Drugi razlozi su novi podaci iz kliničkih studija, utvrđivanje odnosa između unosa vitamina i koncentracije biomarkera, evaluacija uticaja promena u životnom stilu na status kobalamina (vegeterijanska ishrana, suplementacija, veća upotreba inhibitora protonske pumpe, antagonista H<sub>2</sub> receptora i antibiotika kod dece). Preporučuje se i periodično, istovremeno određivanje kobalamina, holo-TCII, Hcy i MMA kako bi se ispitale njihove relacije i prevalenca deficita kada se koristi jedan, tj. kombinacija biomarkera. U budućim monitorinzima statusa vitamina B12 potrebno je određivati najmanje dva biomarkera, jedan koji predstavlja cirkulišući kobalamin (poželjno sam vitamin B12) i jedan metabolički marker (poželjno MMA) (248).

Kada je u pitanju dijagnoza deficita kobalamina, klinička slika predstavlja najvažniji faktor u proceni značaja koncentracija biomarkera statusa vitamina B12 (134). Osnovu dijagnoze deficita vitamina B12 čine: prisustvo makrocitne anemije u rezultatu krvne slike i potvrda da je deficit vitamina B12 uzrok makrocitoze (80). Zbog činjenice da deficit kobalamina ne mora imati hematološke manifestacije, zatim zbog veće brige pacijenata za sopstveno zdravlje, kao i unapređenog laboratorijskog testiranja, menja se percepcija o klasičnoj kliničkoj slici deficita kobalamina (80).

Idealno je postaviti dijagnozu deficita kobalamina sa minimalnim brojem laboratorijskih testova. I to se postiže u tipičnim slučajevima deficita (80). Međutim, ukoliko je dijagnoza nejasna, bolje je uraditi dodatne testove. Trošak nastao zbog laboratorijskog testiranja u cilju otkrivanja deficita kobalamina potrebno je uporediti sa

cenom lečenja pacijenta koji je razvio ireverzibilne neurološke simptome, jer deficit nije na vreme otkriven (80). Procenjuje se da među pacijentima sa potvrđenim deficitom, 90–95% ima nivo kobalamina < 148 pmol/L, 5–10% 148–221 pmol/L i 0.1–1% nivo > 221 pmol/L (308).

Laboratorijska dijagnoza deficita otežana je zbog:

- nepostojanja zlatnog standarda za utvrđivanje deficita (134);
- nedostatka univerzalnih graničnih koncentracija biomarkera za deficit (98, 134);
- nedostatka referentnih metoda za većinu biomarkera (65);
- mogućnosti lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata usled uticaja drugih faktora (65, 98).

U Tabeli 3 su prikazani referentni opsezi za biomarkere statusa vitamina B12, kao i granične vrednosti za deficit koje se mogu naći u literaturi (84). Koncentracije 150–221 pmol/L kobalamina odnose se na iscrpljene rezerve (309).

**Tabela 3. Biomarkeri i granične koncentracije u ispitivanju deficita vitamina B12<sup>11</sup>**

Biomarker	Princip test	Referentni opseg	Cut-off deficit B12	Cut-off isključen nedostatak B12
Vit B12 (pmol/L)	protein vezujući	200–600	< 148	> 221
Holo-TCII (pmol/L)	imunološki	40–100	< 35	> 40
Hcy (μmol/L)	imunološki, HPLC, GC-MS	8–15	> 15	< 8
MMA (nmol/L)	LC-MS, GC-MS	40–370	> 370	< 270
cB12	formula	-2.5–1.5	< -0.5	> 0.5

<sup>11</sup>Green R, Allen LH, Bjørke-Monsen AL, Brito A, Guéant JL, Miller JW, Molloy AM, Nexø E, Stabler S, Toh BH, Ueland PM, Yajnik C. Vitamin B12 deficiency. Nat Rev Dis Primers 2017;3:17040. Erratum in: Nat Rev Dis Primers 2017;3:17054 (84)

Zbog navedenih nedostataka u laboratorijskom testiranju statusa vitamina B12, laboratorije koriste algoritme koji se sastoje od baterije testova sa redosledom određivanja i uslova koji moraju biti ispunjeni za njihovo izvođenje (84, 170). Određivanje kobalamina u serumu i dalje predstavlja test prve linije, a MMA i Hcy testove druge linije (134).

Pre nego što se krene sa laboratorijskim ispitivanjem statusa vitamina B12 potrebno je utvrditi opšte stanje pacijenta, način ishrane, ličnu i porodičnu istoriju autoimunih bolesti, simptome i znakove koji ukazuju na bolesti gastrointestinalnog trakta, kao i hirurške intervencije, lekove koje pacijent koristi, prisustvo neuroloških simptoma (65, 134). Britanski odbor za standarde u hematologiji (engl. British Committee for Standards in Haematology, BCSH) izdao je smernice za dijagnozu i terapiju deficita kobalamina u zavisnosti od kliničke slike i vrednosti serumskog kobalamina (134). Prvi test od koga se kreće jeste kobalamin. Koristi se i anti-IF test zbog perniciozne anemije, a MMA, Hcy ili holo-TCII predstavljaju testove druge linije (134).

Posebnu pažnju bi trebalo obratiti na mogućnost istovremenog prisustva deficita gvožđa i deficita kobalamina, jer laboratorijski rezultati mogu biti dvosmisleni (50). Deficit gvožđa je najčešći uzrok anemija i dovodi do mikrocitoze za razliku od deficita kobalamina (50). U kombinaciji nedostatka gvožđa i kobalamina krajnji rezultat može biti normocitna anemija (50, 310).

U slučaju da je dijagnoza deficita vitamina B12 nejasna, mogu se uvesti terapija kobalaminom i praćenje promene u krvi. Porast broja retikulocita dostiže pik 5–8 dana od uvođenja terapije, porast hematokrita od najmanje 5% ili smanjenje MCV od 5 fL ili više predstavljaju pozitivan odgovor na uvedenu terapiju (80).

Kada su u pitanju asimptomatske osobe sa rizikom za deficit kobalamina (84, 311), ne postoje preporuke i smernice za njihov skrining na deficit vitamina B12 (311). Britansko društvo za hematologiju izdalo je smernice za osoba koje ispoljavaju nespecifične simptome poput neuroloških smetnji i imaju nizak nivo kobalamina (134).

Iz dosadašnjih istraživanja može se videti da normalan MCV nije indikator adekvatnog statusa vitamina B12 (310, 312, 313). Do sada se mali broj studija bavio statusom vitamina B12 kod pacijenata sa normalnim MCV (310, 313). Takođe, odnos serumskih biomarkera kod pacijenata sa rizikom za deficit kobalamina bez makrocitose i/ili makrocitne anemije nije istraživani.

S obzirom na to da se na savremenim hematološkim brojačima istovremeno sa krvnom slikom dobijaju i morfometrijski parametri leukocita na uzorku sa velikim brojem ćelija, informacije o promeni u morfologiji ćelija mogu se jednostavnije i brže dobiti. Takođe, u blažim oblicima deficita kobalamina standardne hematološke karakteristike mogu izostati, kao i hipersegmentacija neutrofila na razmazu, ali se diskretne promene u morfologiji leukocita mogu registrovati preko morfometrijskih parametara. Ispitivanje povezanosti CPD parametara sa koncentracijama biomarkera statusa vitamina B12 u krvi može pokazati da li kod pacijenata sa subkličičkim deficitom ipak dolazi do hematoloških manifestacija u vidu promena morfometrijskih karakteristika leukocita.

## 2. Ciljevi rada

Ciljevi ovog istraživanja su ispitivanje:

1. povezanosti biohemijskih markera metabolizma vitamina B12 i folne kiseline (koncentracija vitamina B12 u serumu, koncentracija folata u serumu i eritrocitima, koncentracija homocisteina u serumu) sa morfometrijskim karakteristikama leukocita kod pacijenata koji pripadaju rizičnoj grupi za pojavu deficita vitamina B12 (stariji od 60 godina, osobe sa gastrointestinalnim oboljenjima i simptomima);
2. značaja metilmalonske kiseline i njene povezanosti sa biohemijskim markerima iz metabolizma vitamina B12 i morfometrijskim karakteristikama leukocita kod pacijenata sa subkliničkim deficitom vitamina B12;
3. povezanost biohemijskih markera iz metabolizma vitamina B12 i folne kiseline (koncentracija vitamina B12 u serumu, koncentracija folata u serumu i eritrocitima, koncentracija homocisteina u serumu) sa morfometrijskim karakteristikama leukocita kod pacijenata sa anemijom i bez anemije;
4. povezanosti parametara statusa gvožđa (koncentracije gvožđa, solubilnih transferinskih receptora, feritina i zasićenje transferina gvožđem u serumu) sa biohemijskim markerima i morfometrijskim karakteristikama leukocita kod pacijenata sa subkliničkim deficitom vitamina B12;
5. povezanosti smanjene bubrežne funkcije sa biohemijskim markerima i morfometrijskim parametrima kod pacijenata sa subkliničkim deficitom vitamina B12.

### **3. Materijali i metode**

#### **3.1. Izbor ispitanika**

Istraživanjem je obuhvaćeno 590 ispitanika koji su od strane gastroenterologa selektovani kao pacijenti sa rizikom za deficit vitamina B12. Kriterijumi za selekciju pacijenata bili su starost veća od 60 godina i/ili prisustvo gastrointestinalnih oboljenja i simptoma (dispepsija, gastritis, stomatitis, dijareja, infekcija *Helicobacter pylori*, Kronova bolest, operacije na želucu i tankom crevu). Kriterijumi za isključivanje iz istraživanja bili su prisustvo malignog oboljenja, hematološke bolesti, već postavljena dijagnoza deficita vitamina B12 i/ili folata, upotreba imunosupresivne ili imunostimulacione terapije.

Pacijenti su upućeni u laboratoriju poliklinike Centra za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Srbije na laboratorijsko testiranje statusa vitamina B12. Na osnovu uputa gastroenterologa pacijentima je određena krvna slika, koncentracija vitamina B12, folata i C-reaktivnog proteina (CRP), a zatim su uzorci zamrzavani za dalja ispitivanja. Svi ispitanici su popunili upitnik u kojem su naveli podatke o polu, starosti, načinu ishrane, lekovima i suplementima koje koriste, simptomima koje imaju i oboljenjima koja su im dijagnostikovana. Istraživanje je sprovedeno uz saglasnost svih ispitanika i uz odobrenje Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije.

Istraživanje je obuhvatilo i kontrolnu grupu od 148 zdravih dobrovoljaca.

Na osnovu podataka iz upitnika i rezultata laboratorijskih testova za krvnu sliku, kobalamin, folat i CRP, naknadno su iz istraživanja isključeni:

- pacijenti koji su prijavili korišćenje suplemenata B vitamina i gvožđa 3 meseca unazad od vađenja krvi (N = 28);
- pacijenti sa MCV < 80 fL (N = 11);
- pacijenti sa MCV > 100 fL (N = 71);
- pacijenti sa CRP  $\geq$  10 mg/L (N = 91);
- pacijenti sa koncentracijom vitamina B12 > 675 pmol/L (N = 46);
- pacijenti sa koncentracijom folata > 45.1 nmol/L (N = 54);
- pacijent sa alarmom atipičnih limfocita (N = 1), nezrelih neutrofila (N = 25) i blasta u rezultatu krvne slike (N = 4).

Za preostalih 259 ispitanika urađeni su dodatni biohemijski testovi.

### **3.2. Uzorkovanje**

Za potrebe istraživanja korišćeni su uzorci pune krvi, seruma i hemolizata pripremljenog od pune krvi. Uzorkovanje, odvajanje biološkog materijala, priprema hemolizata i čuvanje seruma i hemolizata na  $-70^{\circ}\text{C}$  do izvođenja analiza obavljeno je u periodu januar 2015 – januar 2016 u laboratoriji poliklinike Centra za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Srbije.

Krv je uzorkovana ujutro, nakon noćnog gladovanja. Za dobijanje pune krvi korišćene su vakum epruvete sa EDTA kao antikoagulansom. Vakum epruvete sa gelom korišćene su za dobijanje seruma. Hemolizat je pripremljen tretiranjem dela pune krvi rastvorom askorbinske kiseline u odnosu 1:21.

U analiziranim uzorcima seruma nije bila prisutna hemoliza, lipemija i ikterija.



### 3.3. Laboratorijske analize

Osnovni panel analiza koji je urađen na zahtev gastroenterologa uključivao je krvnu sliku sa leukocitarnom formulom, C-reaktivni protein, vitamin B12 i folat. Za potrebe istraživanja urađene su dodatne analize:

- morfometrijski parametri neutrofila i monocita (engl. Cell Population Data, CPD);
- folat u eritrocitima (RBC folat);
- antitela protiv unutrašnjeg faktora (At-IF)
- homocistein (Hcy);
- metilmalonska kiselina (MMA);
- serumsko gvožđe;
- solubilni transferinski receptori (sTfR);
- feritin;
- transferin (TRF);
- ukupni kapacitet vezivanja gvožđa (TIBC);
- saturacija transferina gvožđem (SAT);
- haptoglobin (Hap);
- laktat dehidrogenaza (LDH);
- kreatinin (Krea);
- procenjena brzina glomerularne filtracije (eGFR).

Za ispitanike u kontrolnoj grupi urađene su iste analize kao i za ispitanike sa rizikom za deficit vitamina B12.

Analiza krvne slike sa morfometrijskim parametrima neutrofila i monocita urađena je tokom četiri sata od venepunkcije u uzorku pune krvi u laboratoriji Centra za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Srbije, Služba za polikliničku dijagnostiku. Određivanje biohemijskih parametara: LDH, CRP, kreatinina, gvožđa, transferina, haptoglobina, sTfR, feritina, At-IF u serumu i sadržaja folata u eritrocitima takođe je urađeno u laboratoriji Centra za medicinsku biohemiju, Služba za polikliničku dijagnostiku Kliničkog centra Srbije. Koncentracije Hcy u serumu određene su u laboratoriji Instituta za kardiovaskularne bolesti Dedinje. Za analizu MMA odabrano je

177 pacijenata koji su imali kobalamin  $< 300$  pmol/L i/ili Hcy  $> 8$   $\mu$ mol/L, bez inflamacije (CRP  $< 10$  mg/L). Analiza MMA u serumu izvršena je u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Konzilijum u Beogradu. Za sve urađene laboratorijske testove poštovane su preporuke proizvođača u vezi sa kalibracijom i kontrolom kvaliteta.

### **3.3.1. Krvna slika i morfometrijski parametri neutrofila i monocita**

VCS tehnologijom na hematološkom brojaču Coulter® LH750 Hematology Analyzer (Beckman Coulter, USA) urađena je analiza krvne slike. Uz svaku seriju odrađenih krvnih slika izvršena je kontrola hematološkog brojača pomoću latron kontrole i tri nivoa komercijalne kontrole.

Za potrebe ovog istraživanja korišćeni su CPD parametri neutrofila i monocita obeleženi na sledeći način:

- neutrofil: srednja vrednost i standardna devijacija zapremine (NeV, NeV-SD), provodljivosti (NeC, NeC-SD) i rasipanja svetlosti (NeS, NeS-SD);
- monociti: srednja vrednost i standardna devijacija zapremine (MoV, MoV-SD), provodljivosti (MoC, MoC-SD), rasipanje svetlosti (MoS, MoS-SD).

### **3.3.2. Test za C-reaktivni protein**

Analiza koncentracije CRP u serumu izvršena je na biohemijskom analizatoru AU480 Chemistry System® (Beckman Coulter, SAD) komercijalnim imunoturbidimetrijskim testom sa lateks partikulama prekrivenim zečijim anti-CRP antitelima. Koeficijent varijacije u seriji bio je  $\leq 5\%$ , a koeficijent varijacije ukupne preciznosti  $\leq 10\%$ . Kalibracija testa je sledljiva standardu Internacionalne federacije za kliničku hemiju, CRM 470.

### **3.3.3. Test za vitamin B12**

Vitamin B12 u serumu je određen na imunološkom analizatoru Access 2 Immunoassay System® (Beckman Coulter, SAD) komercijalnim kompetitivnim hemiluminiscentnim imunoenzimskim testom nakon prevođenja svih formi vitamina

B12 iz uzorka u cijanokobalamin pomoću alkalnog kalijum cijanida i ditiotreitola. Test obuhvata inicijalni korak denaturacije eventualno prisutnih At-IF u uzorku. Ukupna nepreciznost testa bila je < 12% u mernom opsegu.

Za kalibraciju testa korišćeni su standardi čija je koncentracija sledljiva prema radnim kalibratorima proizvođača koji su napravljeni od prečišćenog cijanokobalamina i čije su koncentracije određene spektrofotometrijski. Sledljivost je bazirana na EN ISO 17511 protokolu.

### **3.3.4. Test za folat i folat u eritrocitima**

Folat u serumu i folat u eritrocitima određeni su komercijalnim hemiluminiscentnim kompetitivnim imunotestom na imunološkom analizatoru Access 2 Immunoassay System® (Beckman Coulter, SAD).

Sadržaj folata u eritrocitima je određen na isti način kao i folat u serumu, uz prethodnu pripremu hemolizata pomoću eritrocit lizirajućeg reagensa koji sadrži askorbinsku kiselinu. Kako bi se dobio sadržaj folata u eritrocitima, nakon izmerene koncentracije folata u hemolizatu, primenjuje se sledeća formula prema uputstvu proizvođača testa:

Folat u eritrocitima = (koncentracija folata u hemolizatu x 21) / hematokrit

Koncentracije folata u eritrocitima i folata u hemolizatu izražene su u nmol/L, 21 je faktor korekcije zbog razblaživanja tokom pripreme hemolizata. Hematokrit je izražen u jedinici L/L.

Ukupna nepreciznost testa i za folat u serumu i za folat u eritrocitima je  $\leq 15\%$  za koncentraciju > 4.5 nmol/L. Nepreciznost u seriji je  $\leq 9\%$  za koncentracije  $\geq 4.5$  nmol/L.

Test je kalibrisan standardima koji su sledljivi prema radnim kalibratorima proizvođača. Postupak sledljivosti je zasnovan na EN ISO 17511 protokolu. Određivanjem koncentracije folata ovim testom u WHO IS 03/178 dobijen je rezultat u opsegu  $\pm 10\%$  od označene vrednosti 12 nmol/L.

### **3.3.5. Test za antitela na unutrašnji faktor**

Analiza At-IF antitela u serumu izvršena je na imunološkom analizatoru Access 2 Immunoassay System® (Beckman Coulter, SAD) komercijalnim kompetitivnim hemiluminiscentnim imunoenzimskim testom. Ovim testom se detektuje tip I At-IF antitela. Rezultati se izražavaju kao negativan ( $< 1.20$  AU/mL), sumnjiv ( $1.20$ – $1.53$  AU/mL) i pozitivan ( $\geq 1.53$  AU/mL). Ukupna nepreciznost testa bila je  $< 10\%$  u mernom opsegu.

### **3.3.6. Test za homocistein**

Analiza Hcy je izvršena enzimskom metodom na biohemijskom analizatoru UniCel DxC 800 Synchron Clinical Systems® (Beckman Coulter, SAD). Korišćen je komercijalni Axis-Shield Liquid Stable (LS) 2-Part Homocysteine enzimski test sa cistationin  $\beta$ -sintazom.

Homocistein, prisutan u uzorku u oksidovanoj formi (vezan za proteine, kao dimer, kombinovani disulfid), redukuje se i prelazi u slobodan Hcy. Za redukciju se koristi tris[2-karboksietil] fosfin (TCEP). Slobodan Hcy reaguje sa serinom u prisustvu cistationin  $\beta$ -sintaze. Nastaje cistationin, koji se zatim razlaže u prisustvu cistationin  $\beta$ -liaze na Hcy, amonijak i piruvat. Piruvat se konvertuje u laktat u prisustvu laktat-dehidrogenaze i redukovanog nikotinamid adenin dinukleotida (NADH). Sam NADH prelazi u  $\text{NAD}^+$ . Promena apsorbance na talasnoj dužini od 340 nm direktno je proporcionalna sadržaju Hcy u uzorku.

Kalibratori su pripremljeni gravimetrijski i sledljivi su NIST SRM 1955, što je potvrđeno HPLC-om.

### **3.3.7. Test za metilmalonsku kiselinu**

Određivanje koncentracije MMA u serumu izvršeno je nakon precipitacije proteina LC-MS/MS metodologijom na analizatoru QTRAP® 5500, AB Sciex (Darmstadt, Nemačka). Koeficijent varijacije testa u seriji je 1.7%, a između serija 8.3%.

### **3.3.8. Test za serumsko gvožđe**

Analiza serumskog gvožđa je izvršena na biohemijском analizatoru AU480 Chemistry System® (Beckman Coulter, SAD) spektrofotometrijskom metodom sa TPTZ-om (2,4,6-tri-(2-piridil)-5-triazin) kao hromogenom nakon oslobađanja gvožđa iz kompleksa sa transferinom u kiseloj sredini. Test je kalibrisan standardom koji je sledljiv referentnom materijalu NIST SRM 1598 i SRM 937. Koeficijent varijacije u seriji je < 3%, a ukupna nepreciznost < 5%.

### **3.3.9. Test za solubilne transferinske receptore**

Određivanje koncentracije sTfR u serumu urađeno je na imunološkom analizatoru Access 2 Immunoassay System® (Beckman Coulter, SAD) komercijalnim hemiluminiscentnim imunoenzimskim testom. Test je kalibrisan standardima koji su sledljivi prema proizvođačevim radnim kalibratorima. Sledljivost je bazirana na EN ISO 17511 protokolu. Ukupna nepreciznost testa je < 8% za koncentracije sTfR > 0.66 mg/L.

### **3.3.10. Test za feritin**

Analiza feritina je izvršena komercijalnim hemiluminiscentnim imunoenzimskim testom na imunološkom analizatoru Access 2 Immunoassay System® (Beckman Coulter, SAD). Test je kalibrisan standardima koji su sledljivi prema WHO trećem internacionalnom standardu za feritin, IS 94/572. Sledljivost je zasnovana na EN ISO 17511 protokolu. Ukupna nepreciznost testa je < 10% za merni opseg.

### **3.3.11. Test za transferin, ukupni kapacitet vezivanja gvožđa i saturacija transferina gvožđem**

Koncentracija transferina je određena u serumu komercijalnim imunoturbidimetrijskim testom sa kozjim anti-humani transferin antitelima na biohemijском analizatoru AU480 Chemistry System® (Beckman Coulter, SAD). Test je kalibrisan standardima koji su sledljivi prema internacionalnom referentnom

materijalu Internacionalne federacije za kliničku hemiju CRM470. Koeficijent varijacije testa u seriji je < 3%, a ukupna nepreciznost < 5%.

Ukupni kapacitet vezivanja gvožđa (TIBC) i saturacija transferina gvožđem (SAT) izračunati su pomoću sledećih formula:

$$\text{transferin u serumu (g/L)} = 0.007 \times \text{TIBC } (\mu\text{g/dL}) \quad (314)$$

$$\text{SAT (\%)} = (100 \times \text{gvožđe u serumu}) / \text{TIBC} \quad (315)$$

### **3.3.12. Test za haptoglobin**

Određivanje koncentracije haptoglobina u serumu izvršeno je komercijalnim imunoturbidimetrijskim testom sa kozjim anti-humani haptoglobin antitelima na biohemijskom analizatoru AU480 Chemistry System® (Beckman Coulter, SAD). Test je kalibrisan standardima koji su sledljivi prema internacionalnom referentnom materijalu Internacionalne federacije za kliničku hemiju CRM470. Koeficijent varijacije testa u seriji je < 5%, a ukupna nepreciznost < 10%.

### **3.3.13. Test za laktat dehidrogenazu**

Aktivnost LDH je određena u serumu komercijalnim testom koji se zasniva na modifikaciji metode po Wackeru i saradnicima (316). Analiza je izvršena na biohemijskom analizatoru AU480 Chemistry System® (Beckman Coulter, SAD). Kalibracija je zasnovana na eksperimentalno utvrđenoj molarnoj apsorptivnosti na 340/660 nm. Koeficijent varijacije u seriji je < 5%, a ukupna nepreciznost < 10%.

### **3.3.14. Test za kreatinin i procenjena brzinu glomerularne filtracije**

Koncentracija kreatinina u serumu određena je komercijalnim testom koji se zasniva na kinetičkoj modifikaciji Jaffe-ove reakcije (317). Analiza je izvršena na biohemijskom analizatoru AU480 Chemistry System® (Beckman Coulter, SAD). Test je kalibrisan standardom koji je sledljiv NIST SRM 967, u kojem je koncentracija kreatinina određena referentnom metodom, tj. izotop dilucionom masenom

spektrometrijom (ID-MS). Koeficijent varijacije testa u seriji je < 3%, a ukupna nepreciznost < 6%.

Za izračunavanje procenjene brzine glomerularne filtracije (engl. Estimated Glomerular Filtration Rate, eGFR) korišćena je Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) formula:

$$\text{eGFR (mL/min/1.73 m}^2\text{)} = 30849 \times (\text{standardizovan kreatinin u } \mu\text{mol/L})^{-1.154} \times (\text{starost})^{-0.203} \times (0.742 \text{ ako je osoba ženskog pola}) \times (1.212 \text{ ako osoba pripada crnoj rasi}) \quad (318)$$

Vrednosti eGFR < 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> smatrane su markerom smanjene funkcije bubrega, jer predstavljaju gubitak više od polovine normalne funkcije kod odraslih osoba (319).

### 3.4. Statistička obrada podataka

Statistička analiza podataka urađena je u programima IBM SPSS Statistics 24.0. i MedCalc Version 14.8.1.

U IBM SPSS Statistics 24.0. programu su urađeni sledeći statistički testovi:

- deskriptivna statistika za opis podataka: srednja vrednost ( $\bar{X}$ ), medijana (MD), standardna devijacija (SD), interval pouzdanosti (IP), interkvartilni raspon (IR), minimum (Min), maksimum (Max);
- Spearman korelaciona analiza;
- Shapiro-Wilk test za ispitivanje raspodele podataka;
- višestruka regresiona analiza;
- binarna logistička regresiona analiza;
- Nezavisni T test za poređenje parametara sa normalnom raspodelom između dve grupe;
- analiza varijanse (ANOVA) sa Welch testom i Games-Howell post-hoc testom za poređenje više grupa sa različitim brojem pacijenata za podatke sa normalnom raspodelom;
- Mann-Whitney U test za poređenje neparametarskih podataka između dve grupe;
- Kruskal-Wallis test za poređenje neparametarskih podataka između više grupa;
- Hi-kvadrat test nezavisnosti za poređenje kategorijskih promenljivih.

U programu MedCalc Version 14.8.1. je urađena ROC analiza. Za izračunavanje količnika verovatnoća korišćen je statistički program dostupan na internet stranici MEDCALC® easy-to-use statistical software (320). Površine ispod krive (engl. Area Under Curve, AUC) su upoređene pomoću statističkog programa dostupnog na internet stranici VassarStats® (321).



Značajnost razlike je procenjivana u odnosu na postavljeni kriterijum  $P < 0.05$ . Parametri sa normalnom raspodelom prikazani su kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija ( $\bar{X} \pm SD$ ), a parametri koji ne prate normalnu raspodelu kao medijana i interkvartilni raspon (MD (IR)).

Za procenu veličine dobijene statističke razlike, korišćeni su sledeći parametri:

- r za Kruskal–Wallis i Mann-Whitney U test:  $r = 0.10–0.29$  mali uticaj,  $r = 0.30–0.49$  umereni uticaj i  $r \geq 0.50$  veliki uticaj (322)
- rho za Spearmanovu korelaciju:  $\rho = 0.10–0.29$  mala,  $\rho = 0.30–0.49$  srednja i  $\rho = 0.50–1.0$  velika (322)
- Cramerov V i phi koeficijenti za Hi-kvadrat test nezavisnosti:
  - phi koeficijent za 2 x 2 tabele:  $0.10–0.29$  mali,  $0.30–0.49$  umereni i  $\geq 0.50$  veliki uticaj razlike (322)
  - Cramerov V koeficijent za tabele veće od 2x2: dve kategorije  $0.01–0.29$  mali,  $0.30–0.49$  umereni i  $\geq 0.50$  veliki uticaj; tri kategorije  $0.07–0.20$  mali,  $0.21–0.34$  umereni i  $\geq 0.35$  veliki uticaj razlike; četiri kategorije  $0.06–0.16$  mali uticaj,  $0.17–0.28$  umereni uticaj i  $\geq 0.29$  veliki uticaj (322).

Za procenu značajnosti površine ispod krive korišćena je Tabela 4 (323):

**Tabela 4. Povezanost AUC i dijagnostičke tačnosti<sup>12</sup>**

AUC	Dijagnostička tačnost
0.9 –1.0	odlična
0.8–0.9	veoma dobra
0.7–0.8	dobra
0.6–0.7	dovoljna
0.5–0.6	loša

<sup>12</sup>Šimundić AM. Measures of diagnostic accuracy: basic definitions. EJIFCC 2009;19(4):203–211 (323)

Za značajno različite CPD parametre neutrofila i monocita određene su optimalne granične vrednosti (cut-off), kao i njihove dijagnostičke karakteristike: osetljivost, specifičnost, pozitivna prediktivna vrednost (PPV), negativna prediktivna vrednost (NPV) i količnik verovatnoće.

Na uzorku od 259 ispitanika analiziran je odnos kobalamina, folata i homocisteina, kao i njihova povezanost sa polom, starošću, funkcijom bubrega, anemijom i deficitom gvožđa. Anemija je definisana prema nivou hemoglobina: < 120 g/L za žene i < 130 g/L za muškarce (324). Odnos metilmalonske kiseline sa ovim parametrima ispitavan je u grupi od 177 pacijenata, kojima je i određena koncentracija metilmalonske kiseline.

Uticaj pola i starosti na CPD parametre neutrofila i monocita analiziran je u kontrolnoj grupi koju su činili zdravi dobrovoljci.

Povezanost morfometrijskih parametara neutrofila i monocita sa vitaminom B12, folatom i homocisteinom ispitana je u grupi od 259 pacijenata, iz koje su isključeni pacijenti sa kombinovanim deficitom folata i vitamina B12. Zatim su pacijenti podeljeni u 3 podgrupe prema koncentraciji kobalamina i folata:

- Grupa 1, koju je činilo 157 pacijenata sa vitaminom B12  $\geq$  150 pmol/L i folatom  $\geq$  10 nmol/L
- Grupa 2, koja se sastojala od 74 pacijenta sa vitaminom B12 < 150 pmol/L i folatom  $\geq$  10 nmol/L
- Grupa 3, koja se sastojala od 19 pacijenata sa vitaminom B12  $\geq$  150 pmol/L i folatom < 10 nmol/L.

Za definisanje statusa vitamina B12 i folata korišćene su koncentracija vitamina koje je WHO preporučila kao granice za deficit (85).

Povezanost morfometrijskih parametara neutrofila i monocita sa MMA i funkcijom bubrega analizirana je u grupi od 177 pacijenata, iz koje su isključeni pacijenti sa folatom < 10 nmol/L. Ostali pacijenti su klasifikovani u 4 podgrupe prema eGFR i koncentracijama kobalamina i MMA:

- Grupa 1 – 19 pacijenata sa eGFR  $\geq 60$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup> i vitaminom B12  $\geq 221$  pmol/L i MMA  $\leq 210$  nmol/L
- Grupa 2 – 21 pacijent sa eGFR  $\geq 60$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup> i vitaminom B12  $< 221$  pmol/L i MMA  $\leq 210$  nmol/L
- Grupa 3 – 49 pacijenata sa eGFR  $\geq 60$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup> i MMA  $> 210$  nmol/L
- Grupa 4 – 53 pacijenata sa eGFR  $< 60$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup> i MMA  $> 210$  nmol/L.

Za vitamin B12 je korišćena granična koncentracija koja obuhvata iscrpljene rezerve i deficit kobalamina ( $< 221$  pmol/L) (309), a za MMA koncentracija koja kod osoba sa normalnom koncentracijom kreatinina označava odsustvo deficita vitamina B12 (325).

Analiza uticaja anemije i deficita gvožđa na CPD parametre neutrofila i monocita izvršena je u grupi od 259 pacijenata, iz koje su isključeni pacijenti sa folatom  $< 10$  nmol/L i pacijenti koji su imali vrednosti feritina  $> 150$   $\mu$ g/L za žene i feritina  $> 200$   $\mu$ g/L za muškarce zbog povećanog rizika od opterećenja gvožđem (324, 326). Ostali ispitanici su klasifikovani u 4 podgrupe prema saturaciji transferina gvožđem i koncentracijama vitamina B12 i feritina:

- Grupa 1 – 82 pacijenta sa feritinom  $\geq 15$   $\mu$ g/L, saturacijom transferina  $\geq 16\%$  i koncentracijom vitamina B12  $\geq 150$  pmol/L
- Grupa 2 – 32 pacijenta sa feritinom  $\geq 15$   $\mu$ g/L, saturacijom transferina  $\geq 16\%$  i koncentracijom vitamina B12  $< 150$  pmol/L
- Grupa 3 – 55 pacijenata sa feritinom  $< 15$   $\mu$ g/L i/ili saturacijom transferina  $< 16\%$  i koncentracijom vitamina B12  $\geq 150$  pmol/L
- Grupa 4 – 39 pacijenata sa feritinom  $< 15$   $\mu$ g/L i/ili saturacijom transferina  $< 16\%$  i koncentracijom vitamina B12  $< 150$  pmol/L.

Za definisanje deficita gvožđa i vitamina B12 korišćene se granične vrednosti navedene u WHO dokumentima za feritin (324, 326), saturaciju transferina gvožđem (324) i kobalamin (85).

## 4. Rezultati

### 4.1. Opšti podaci o pacijentima sa rizikom za deficit vitamina B12

Ukupan broj pacijenata sa rizikom za deficit kobalamina iznosio je 590. Broj žena bio je 289 (49%), a broj muškaraca 301 (51%). Prosečna starost ispitanika iznosila je 59.00 (45.00–69.00) godina. Njihovi hematološki i biohemijski parametri prikazani su u Tabeli 5.

**Tabela 5. Hematološki i biohemijski parametri kod pacijenata upućenih na skrining statusa vitamina B12**

	Svi ispitanici (N = 590)	Žene (N = 289)	Muškarci (N = 301)
WBC (x 10 <sup>9</sup> /L)	6.42 (5.28–7.91)	6.19 (5.18–7.64)	6.69 (5.43–7.98)
Ne (x 10 <sup>9</sup> /L)	3.69 (2.88–4.73)	3.64 (2.78–4.62)	3.86 (3.00–4.77)
Mo (x 10 <sup>9</sup> /L)	0.57 (0.44–0.71)	0.52 (0.41–0.66)	0.62 (0.49–0.75)
RBC (x 10 <sup>12</sup> /L)	3.99 (3.69–4.33)	3.92 (3.65–4.25)	4.06 (3.76–4.44)
Hb (g/L)	121.10 (113.25–131.80)	118.90 (110.48–130.58)	124.20 (116.75–134.65)
MCV (fL)	92.58 (88.30–96.82)	91.59 (87.42–95.87)	94.05 (89.73–97.98)
Hct (L/L)	0.37 (0.34–0.39)	0.36 (0.33–0.39)	0.38 (0.35–0.40)
RDW (%)	14.30 (13.55–15.81)	14.19 (13.50–15.36)	14.49 (13.58–16.25)
PLT (x 10 <sup>9</sup> /L)	212.40 (169.30–258.23)	222.20 (183.68–271.25)	201.50 (151.58–244.78)
Vit B12 (pmol/L)	237.64 (162.54–368.26)	227.30 (154.98–341.51)	252.77 (171.40–441.51)
Folat (nmol/L)	16.19 (12.01 – 25.56)	16.41 (12.60 – 26.15)	15.86 (11.70 – 24.19)
CRP (mg/L)	2.1 (1.00–5.40)	1.85 (0.90–4.38)	2.60 (1.10–7.14)

Normalan MCV (80–100 fL) imalo je 508 (86.1%) pacijenata, mikrocitoza je bila prisutna kod 11 (1.9%) pacijenata, a makrocitoza kod 71 (12%) pacijenta. Većina pacijenata je bila anemična, čiji je broj bio 373 (63.2%), dok je broj pacijenata bez anemije iznosio 217 (36.8%).

Inflamacija (CRP  $\geq$  10 mg/L) je bila prisutna kod 91 (15.4%) pacijenta.

Niske koncentracije vitamina B12 (< 150 pmol/L) imalo je 116 (19.7%) pacijenata, iscrpljene rezerve (150–221 pmol/L) bile su prisutne kod 146 (24.8%) pacijenata, dok je 328 (55.5%) ispitanika imalo adekvatne koncentracije kobalamina u serumu (> 221 pmol/L).

Niske koncentracije folata (< 10 nmol/L) bile su prisutne kod 87 (14.7%) pacijenata.

Nakon isključivanja ispitanika koji su koristili suplemente, zatim pacijenata sa inflamacijom, mikrocitozom, makrocitozom, koncentracijama kobalamina i folata iznad gornje granice referentnog opsega i sa alarmima o prisustvu atipičnih limfocita, nezrelih neutrofila i blasta, formirana je grupa od 259 pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12. Grupu je činilo 145 žena (56%) i 114 muškaraca (44%). Prosečna starost iznosila je 58.00 (42.75–68.25) godina. Muškarci su bili statistički značajno stariji od žena ( $|z| = 6.19$ ,  $P < 0.001$ ,  $r = 0.38$ ). Prosečna starost žena bila je 49.50 (35.00–63.00) godina, a muškaraca 65.50 (57.00–75.25) godina. Njihovi hemataloški i biohemijski parametri prikazani su u Tabeli 6.

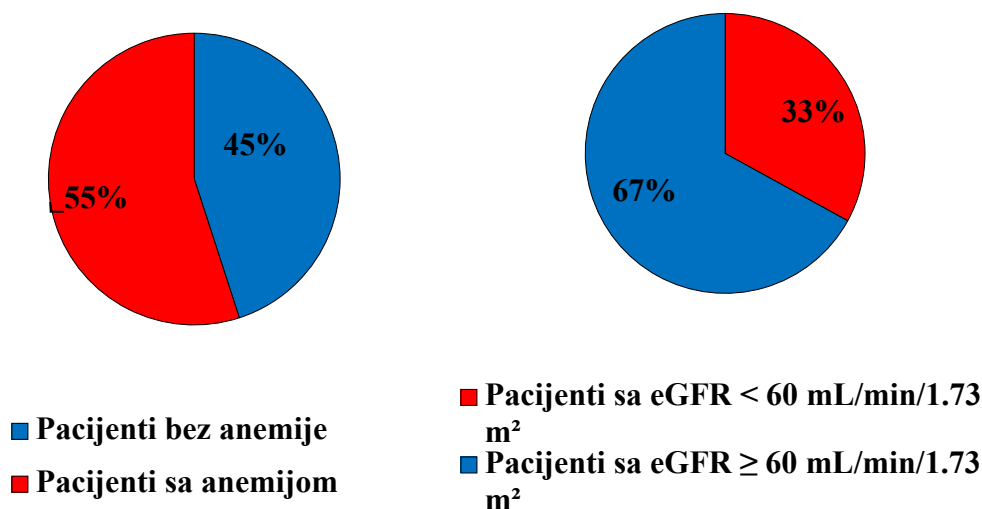
**Tabela 6. Hemataloški i biohemijski parametri kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12**

	<b>Svi pacijenti (N = 259)</b>	<b>Žene (N = 145)</b>	<b>Muškarci (N = 114)</b>
<b>WBC (x 10<sup>9</sup>/L)</b>	6.50 (5.48–7.87)	6.21 (5.20–7.39)	6.89 (5.78–8.09)
<b>Ne (x 10<sup>9</sup>/L)</b>	4.00 (3.00–5.00)	4.00 (3.00–5.00)	4.00 (3.00–4.50)
<b>Mo (x 10<sup>9</sup>/L)</b>	1.00 (0.50–1.20)	1.00 (0.50–1.20)	1.00 (0.75–1.20)
<b>RBC (x 10<sup>12</sup>/L)</b>	4.10 (3.88–4.40)	4.06 (3.85–4.36)	4.15 (3.90–4.50)
<b>Hb (g/L)</b>	123.90 (117.20–133.70)	121.50 (115.55–132.75)	126.05 (118.60–135.35)
<b>MCV (fL)</b>	91.85 (87.80–95.27)	91.12 (87.27–94.82)	92.56 (88.47–95.37)
<b>Hct (L/L)</b>	0.37 (0.35–0.40)	0.37 (0.35–0.39)	0.38 (0.36–0.41)
<b>RDW (%)</b>	14.03 (13.45–14.82)	13.98 (13.47–14.67)	14.10 (13.35–14.92)
<b>PLT (x 10<sup>9</sup>/L)</b>	218.90 (179.20–257.60)	224.10 (188.90–266.65)	211.60 (175.25–247.23)
<b>Vit B12 (pmol/L)</b>	185.24 (135.79–272.32)	183.76 (133.21–256.46)	191.51 (138.56–284.13)
<b>Folat (nmol/L)</b>	15.95 (12.40–21.60)	16.25 (12.38–21.78)	15.62 (12.33–21.29)
<b>RBC Folat (nmol/L)</b>	1036.68 (843.89–1376.07)	1022.59 (835.34–1411.09)	1057.51 (850.78–1351.55)
<b>Hcy (μmol/L)</b>	14.75 (11.01–19.91)	12.69 (10.02–16.40)	17.23 (13.50–22.57)
<b>LDH (U/L)</b>	154.00 (130.00–182.00)	154.00 (129.50–183.00)	155.00 (129.75–178.25)
<b>CRP (mg/L)</b>	1.60 (0.90–3.40)	1.50 (0.80–3.10)	1.80 (0.94–3.60)
<b>Kreatinin (μmol/L)</b>	78.00 (65.00–115.00)	68.00 (60.00–80.50)	100.00 (78.75–140.50)
<b>Haptoglobin (g/L)</b>	1.30 (1.00–1.70)	1.30 (1.00–1.62)	1.30 (0.98–1.70)
<b>Transferin (g/L)</b>	2.63 (2.29–3.00)	2.68 (2.34–3.18)	2.46 (2.25–2.87)
<b>Gvožđe (μmol/L)</b>	13.40 (9.40–17.50)	12.90 (9.30–17.00)	14.50 (9.63–18.48)
<b>SAT (%)</b>	21.09 (13.53–28.27)	19.48 (13.06–26.82)	23.12 (14.90–29.33)
<b>sTfR (mg/L)</b>	1.51 (1.20–1.91)	1.54 (1.19–1.88)	1.44 (1.22–1.94)
<b>Feritin (μg/L)</b>	39.85 (15.25–84.35)	26.35 (10.60–58.15)	65.15 (33.80–122.20)

Metilmalonska kiselina je urađena za 177 pacijenata bez inflamacije, 103 žene i 74 muškarca. Medijana sa interkvartilnim rasponom iznosila je 305.00 (188.50–448.00) nmol/L. Najveća vrednost bila je 2090.00 nmol/L, a najmanja 84.17 nmol/L. Kod žena je medijalna vrednost sa interkvartilnim rasponom iznosila 265.00 (176.00–426.00) nmol/L, a kod muškaraca 354.50 (198.25–517.75) nmol/L.

Ispitanici nisu bili pozitivni na At-IF i svi su imali koncentraciju folata u eritrocitima > 340 nmol/L.

Anemija je bila prisutna kod 142 pacijenta, a smanjena funkcija bubrega kod 86 pacijenata.

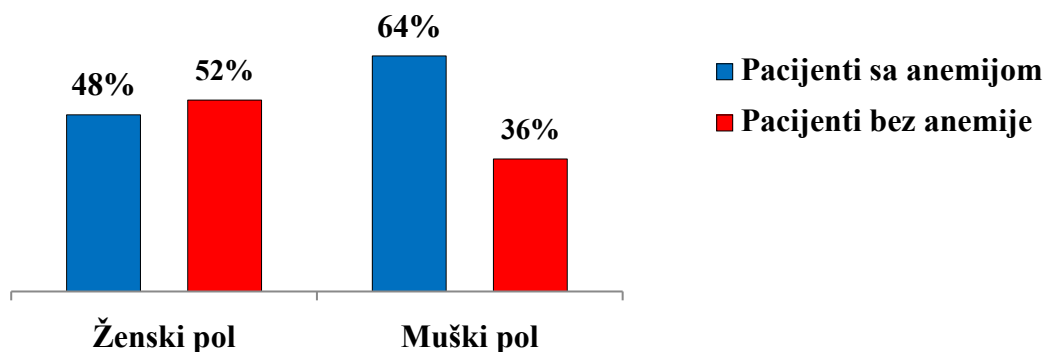


**Slika 10. Zastupljenost anemije i smanjene funkcije bubrega kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12**

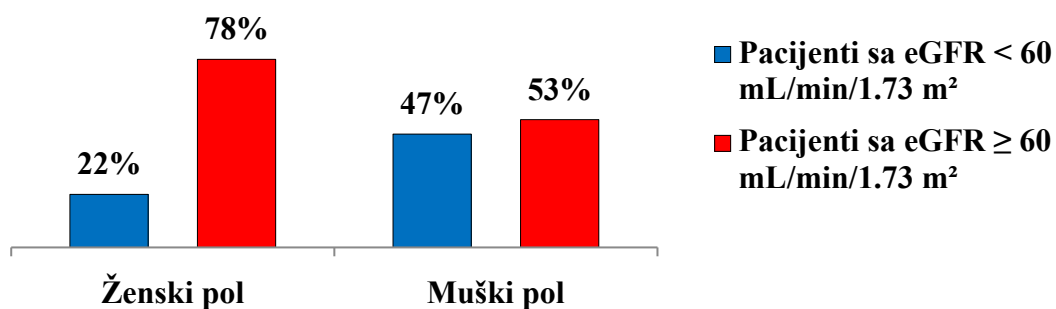
Zastupljenost smanjene funkcije bubrega bila je statistički značajno veća kod anemičnih pacijenata u odnosu na pacijente bez anemije (41.5% vs 23.1%,  $\chi^2 = 9.054$ ,  $P = 0.003$ ,  $fi = 0.20$ ).

Muški pol je imao statistički značajno veću zastupljenost anemije ( $\chi^2 = 6.324$ ,  $P = 0.01$ ,  $fi = 0.16$ ) i smanjene funkcije bubrega ( $\chi^2 = 17.295$ ,  $P < 0.001$ ,  $fi = 0.27$ ) u odnosu na ženski pol.

A)



B)



**Slika 11. Distribucija A) anemije i B) smanjene funkcije bubrega između polova kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamin B12**

Za ispitivanje povezanosti morfoloških parametara neutrofila i monocita sa statusom vitamina B12, folata, gvožđa, anemijom i funkcijom bubrega korišćena je grupa od 259 ispitanika sa rizikom za deficit vitamina B12. Njihovi CPD parametri su prikazani u Tabeli 7.



**Tabela 7. Morfometrijski parametri neutrofila i monocita kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12**

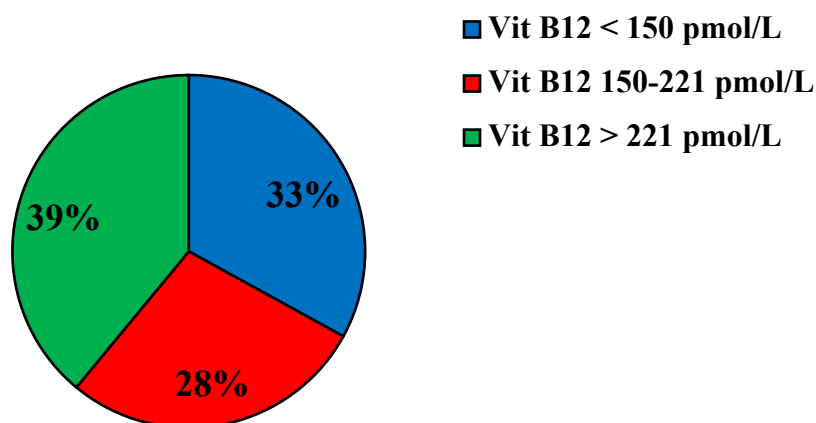
	<b>Svi ispitanici (N = 259)</b>	<b>Žene (N = 145)</b>	<b>Muškarci (N = 114)</b>
<b>NeV</b>	139.57 (136.06–143.16)	138.55 (135.27–141.92)	140.75 (137.55–143.53)
<b>NeV-SD</b>	19.60 (18.57–20.67)	19.37 (18.40–20.61)	19.74 (18.76–20.71)
<b>NeC</b>	149.68 (147.04–151.75)	149.57 (146.97–151.94)	149.72 (147.09–151.54)
<b>NeC-SD</b>	5.09 (4.78–5.38)	5.05 (4.76–5.37)	5.11 (4.81–5.40)
<b>NeS</b>	145.91 (143.18–148.98)	146.29 (143.66–149.13)	145.55 (142.67–148.50)
<b>NeS-SD</b>	10.31 (9.73–10.87)	10.31 (9.77–11.02)	10.33 (9.67–10.80)
<b>MoV</b>	159.80 ± 4.96	160.21 ± 4.78	159.29 ± 5.16
<b>MoV-SD</b>	17.43 (16.38–18.51)	17.64 (16.62–18.69)	17.00 (16.04–18.26)
<b>MoC</b>	125.59 (123.25–128.00)	125.43 (123.11–128.02)	125.88 (123.62–128.04)
<b>MoC-SD</b>	4.38 (4.12–4.64)	4.37 (4.12–4.65)	4.38 (4.13–4.63)
<b>MoS</b>	88.50 (85.53–90.44)	89.03 (86.50–91.34)	87.57 (85.09–89.52)
<b>MoS-SD</b>	10.51 ± 0.93	10.40 ± 0.90	10.66 ± 0.96

## 4.2. Biomarkeri statusa vitamina B12 i folata

U grupi od 259 ispitanika analiziran je status vitamina B12 i folata. Status vitamina B12 izražen je kroz koncentracije kobalamina, homocisteina i metilmalonske kiseline u serumu, a status folata kroz vrednosti folata i homocisteina u serumu.

### 4.2.1. Vitamin B12

Od 259 ispitanika 84 pacijenta su imala niske vrednosti kobalamina (< 150 pmol/L), iscrpljene rezerve (150–221 pmol/L) su bile prisutne kod 73 pacijenta, a 102 pacijenta su imala vrednosti kobalamina > 221 pmol/L (Slika 12).



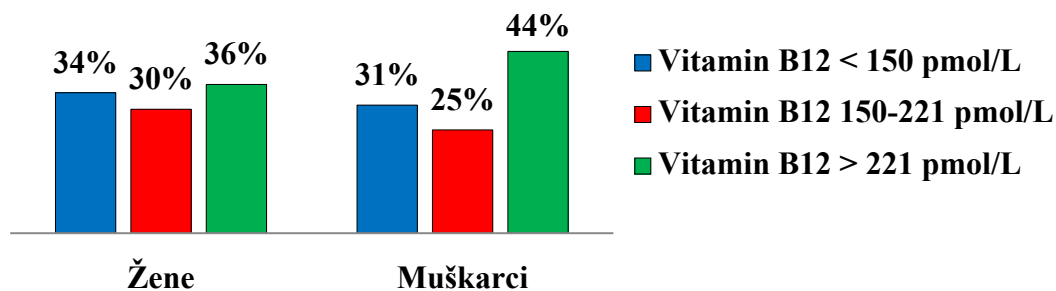
Slika 12. Distribucija različitih nivoa kobalamina kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12

Spearmanovom korelacionom analizom je utvrđeno da koncentracije vitamina B12 nisu bile povezane sa starošću pacijenata, kreatininom i hemoglobinom (Tabela 8).

**Tabela 8. Analiza korelacije vitamina B12**

Vitamin B12	Starost	Kreatinin	Hemoglobin
rho	-0.130	0.101	0.016
P	0.06	0.11	0.80

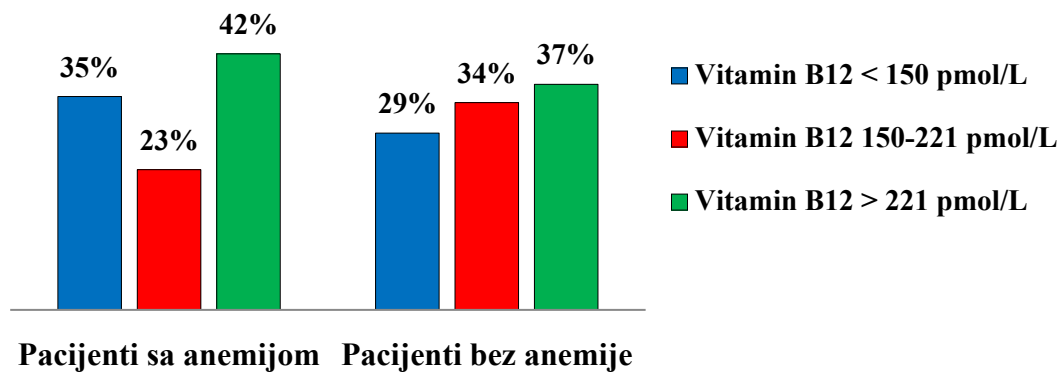
Prema rezultatima Hi-kvadrat testa nezavisnosti, distribucija različitih nivoa kobalamina nije se razlikovala između žena i muškaraca ( $\chi^2 = 1.770$ ,  $P = 0.41$ ).



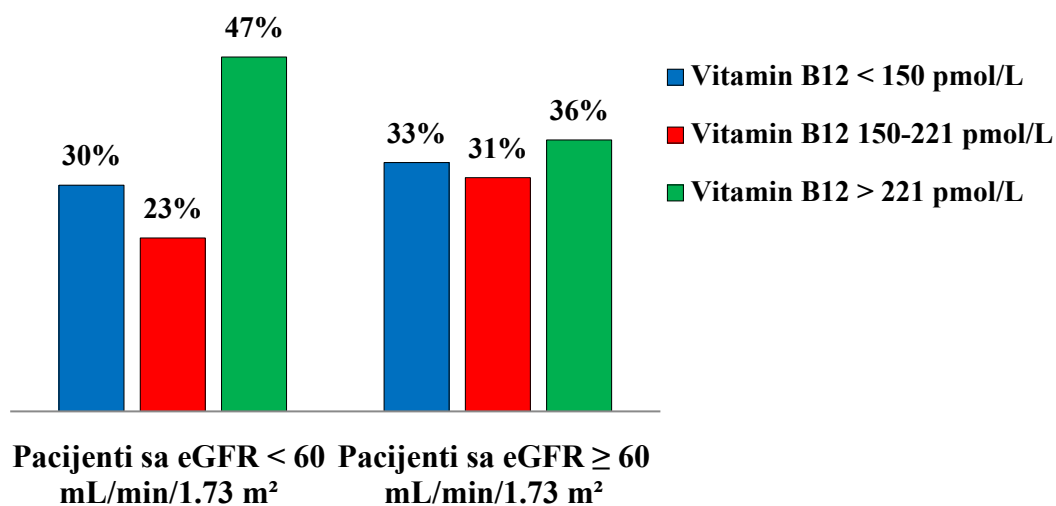
**Slika 13. Distribucija različitih nivoa kobalamina kod žena i muškaraca sa rizikom za deficit vitamina B12**

Zastupljenost različitih nivoa kobalamina nije se razlikovala između anemičnih pacijenata i pacijenata bez anemije ( $\chi^2 = 3.851$ ,  $P = 0.15$ ), kao ni između pacijenata sa smanjenom i normalnom funkcijom bubrega ( $\chi^2 = 2.964$ ,  $P = 0.23$ ).

A)



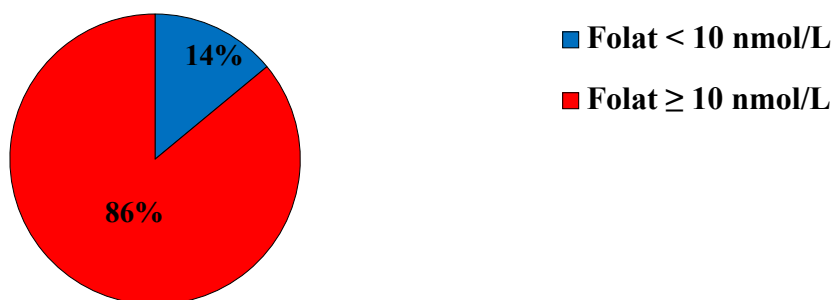
B)



Slika 14. Distribucija različitih nivoa kobalamina kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12 u zavisnosti od A) prisustva anemije i B) prisustva smanjene funkcije bubrega

#### 4.2.2. Folat

Većina pacijenata u grupi od 259 ispitanika imala je normalne koncentracije folata u serumu. Niske koncentracije, odnosno folat < 10 nmol/L, bile su prisutne kod 35 pacijenata.



**Slika 15. Zastupljenost niskih i normalnih koncentracija folata kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12**

Koncentracije folata su bile u slaboj pozitivnoj korelaciji sa starošću i kreatininom, dok hemoglobin i vitamin B12 nisu bili u korelaciji sa folatom (Tabela 9).

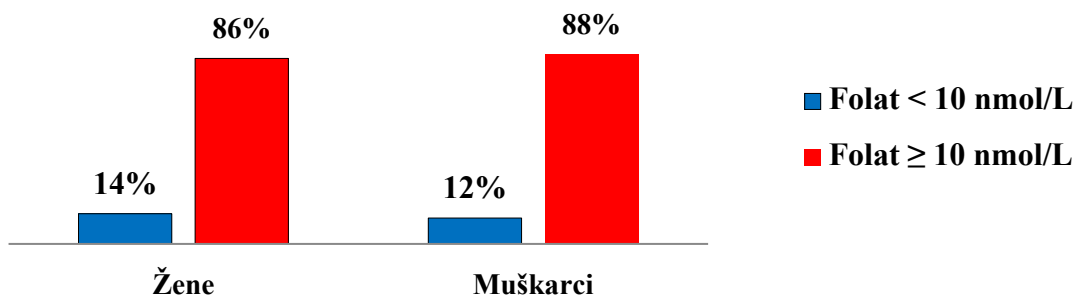
**Tabela 9. Analiza korelacije folata**

Folat	Starost	Kreatinin	Hemoglobin	Vitamin B12
<b>rho</b>	0.193	0.131	0.001	0.005
<b>P</b>	0.005	0.035	0.99	0.94

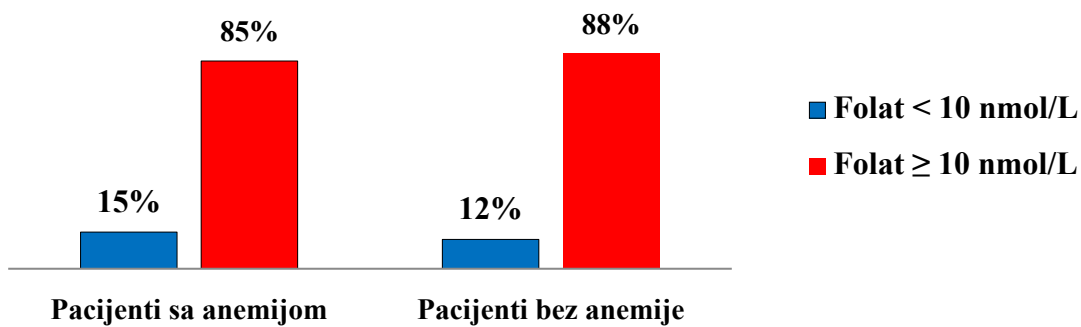
Nakon korekcije uticaja starosti i kreatinina, i dalje nije bilo korelacije folata sa hemoglobinom ( $\rho = 0.016$ ,  $P = 0.82$ ) i vitaminom B12 ( $\rho = 0.046$ ,  $P = 0.51$ ).

Distribucija niskih i normalnih koncentracija folata nije se razlikovala između polova ( $\chi^2 = 0.110$ ,  $P = 0.74$ ), pacijenata sa anemijom i bez nje ( $\chi^2 = 0.229$ ,  $P = 0.63$ ), kao ni između pacijenata sa smanjenom i normalnom funkcijom bubrega ( $\chi^2 = 1.451$ ,  $P = 0.23$ ).

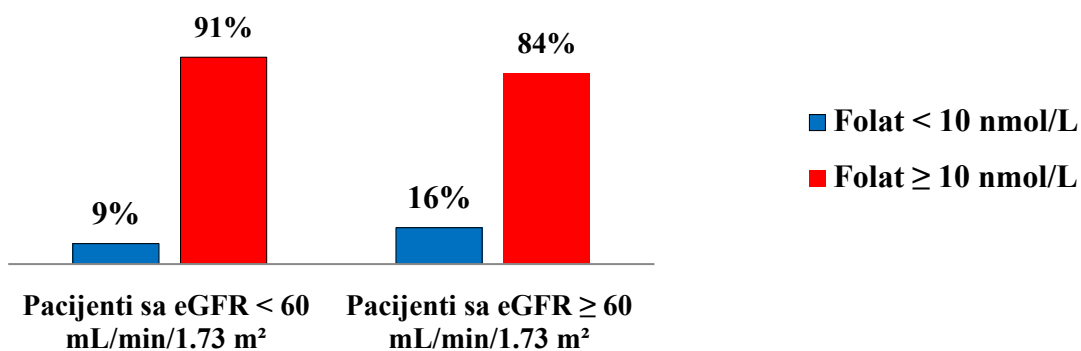
A)



B)



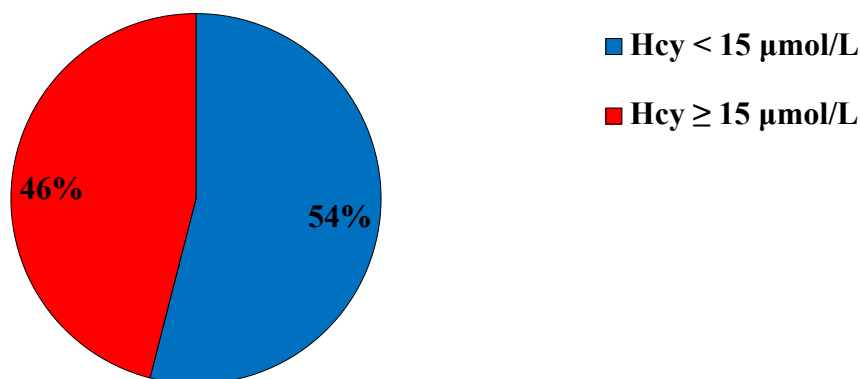
C)



Slika 16. Zastupljenost niskih i normalnih koncentracija folata kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12 u zavisnosti od A) pola, B) prisustva anemije i C) prisustva smanjene funkcije bubrega

### 4.2.3. Homocistein

Povećane koncentracije Hcy ( $\geq 15 \mu\text{mol/L}$ ) bile su prisutne kod 119 ispitanika.



**Slika 17. Zastupljenost normalnih i povećanih koncentracija homocisteina kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12**

Vrednosti Hcy su bile u pozitivnoj korelaciji sa starošću pacijenata i koncentracijama kreatinina, dok vitamin B12 i folat nisu bili u korelaciji sa Hcy (Tabela 10).

**Tabela 10. Analiza korelacije homocisteina**

Homocistein	Starost	Kreatinin	Vitamin B12	Folat
<b>rho</b>	0.522	0.669	-0.083	-0.055
<b>P</b>	< 0.001	< 0.001	0.18	0.38

Nakon korekcije uticaja starosti i kreatinina, postojala je slaba negativna korelacija Hcy sa vitaminom B12 ( $\text{rho} = -0.173$ ,  $P = 0.012$ ) i folatom ( $\text{rho} = -0.270$ ,  $P < 0.001$ ).

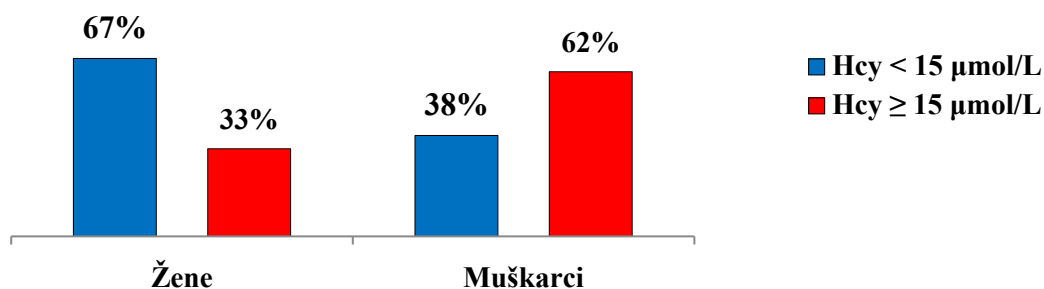
Analiza uticaja pola, starosti, kreatinina, vitamina B12 i folata na vrednost Hcy izvršena je pomoću testa višestruke regresije. Rezultati su prikazani u Tabeli 11.

**Tabela 11. Prediktori vrednosti Hcy kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12**

Parametar	Standardizovan koeficijent Beta	t	P	Semiparcijalni koeficijent korelacije
Pol	-0.061	-1.010	0.31	-0.052
Starost	0.168	2.751	0.006	0.142
Kreatinin	0.561	9.468	< 0.001	0.489
Folat	-0.201	-3.794	< 0.001	-0.196
Vitamin B12	-0.135	-2.515	0.013	-0.130

Dobijen je statistički značajan model ( $F = 34.164$ ,  $P < 0.001$ ), a navedene varijable zajedno su objašnjavale 45.6% varijanse u koncentraciji Hcy. Pol se u odnosu na druge parametre nije pokazao značajnim prediktorom koncentracije Hcy. Najznačajniji prediktor bio je kreatinin i uticao je na 23.9% varijanse Hcy. Folat je uticao na 3.8%, starost na 2%, a vitamin B12 na 1.7% varijanse u vrednostima Hcy. Kreatinin i starost su bili pozitivni, a folat i kobalamin negativni prediktori vrednosti Hcy.

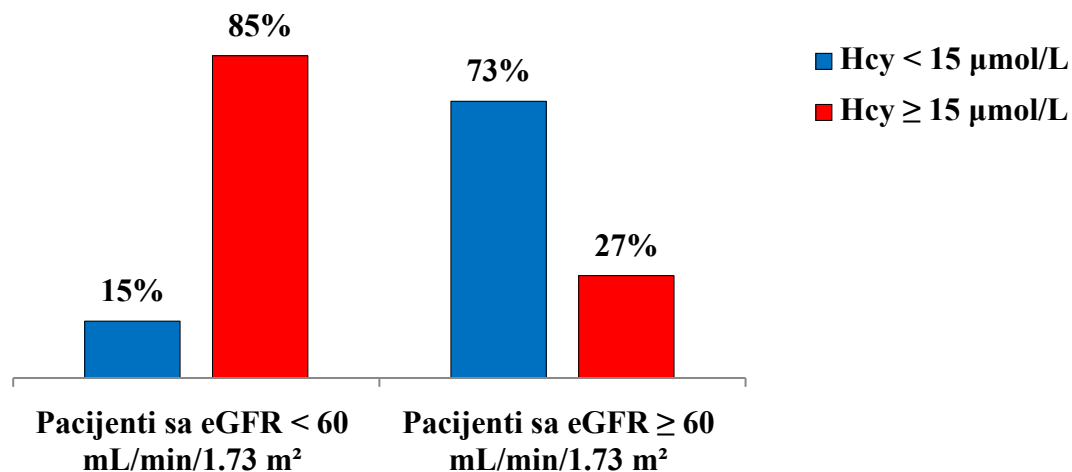
Kada je u pitanju zastupljenost različitih nivoa Hcy, razlika je postojala između polova. Povećane vrednosti Hcy bile su statistički značajno više zastupljene kod muškaraca ( $\chi^2 = 20.718$ ,  $P < 0.001$ ,  $fi = 0.29$ ).



**Slika 18. Distribucija normalnih i povećanih koncentracija homocisteina kod žena i muškaraca sa rizikom za deficit vitamina B12**



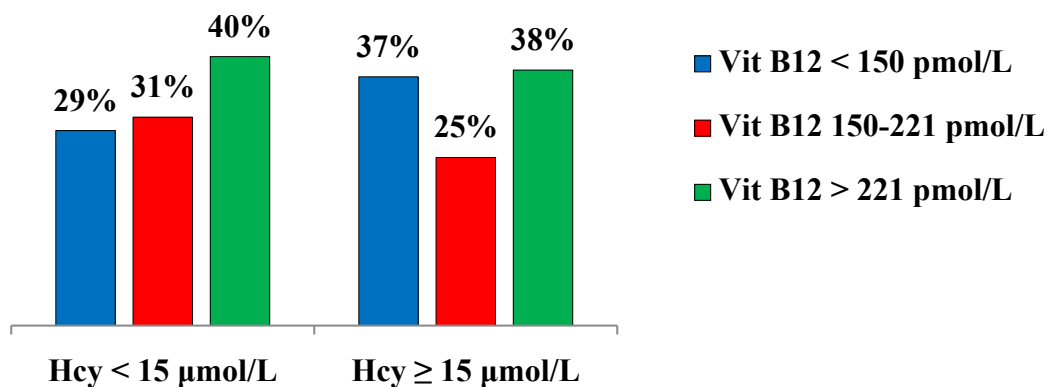
Razlika u distribuciji normalnih i visokih koncentracija Hcy postojala je i između ispitanika sa smanjenom i normalnom funkcijom bubrega. Povećane vrednosti Hcy statistički su bile značajno više zastupljene kod pacijenata sa smanjenom funkcijom bubrega ( $\chi^2 = 76.720$ ,  $P < 0.001$ ,  $fi = 0.55$ ).



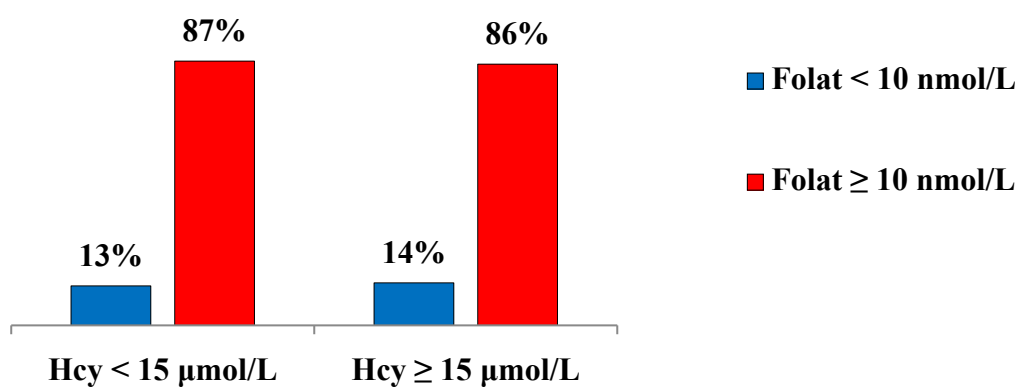
**Slika 19. Zastupljenost normalnih i povećanih koncentracija homocisteina kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12 u zavisnosti od funkcije bubrega**

Distribucija normalnih i visokih koncentracija Hcy nije bila povezana sa distribucijom različitih nivoa kobalamina ( $\chi^2 = 2.229$ ,  $P = 0.33$ ), kao ni sa distribucijom različitih nivoa folata ( $\chi^2 = 0.023$ ,  $P = 0.88$ ).

A)



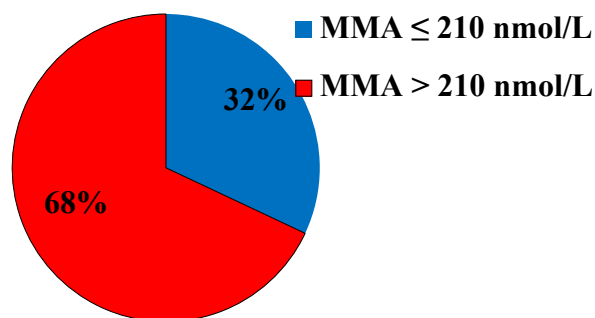
B)



Slika 20. Distribucija različitih nivoa A) kobalamina i B) folata kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12 u zavisnosti od koncentracije homocisteina

#### 4.2.4. Metilmalonska kiselina

Za 177 pacijenata koji su imali vitamin B12 < 300 pmol/L i/ili Hcy > 8 µmol/L i CRP < 10 mg/L određena je koncentracija MMA u serumu. Vrednosti MMA ≤ 210 nmol/L imalo je 57 pacijenata, a koncentracije MMA > 210 nmol/L 120 pacijenata.



**Slika 21. Zastupljenost različitih nivoa MMA kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12**

Koncentracije MMA bile su u pozitivnoj korelaciji sa kreatininom, starošću i Hcy, a u negativnoj korelaciji sa vitaminom B12 (Tabela 12).

**Tabela 12. Analiza korelacije metilmalonske kiseline**

Metilmalonska kiselina	Starost	Kreatinin	Vit B12	Hcy
rho	0.431	0.393	-0.295	0.471
P	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Uz korekciju uticaja starosti i kreatinina, parcijalna korelacija je potvrdila postojanje veze između MMA i vitamina B12 (rho = -0.319, P < 0.001) i Hcy (rho = 0.191, P = 0.01).

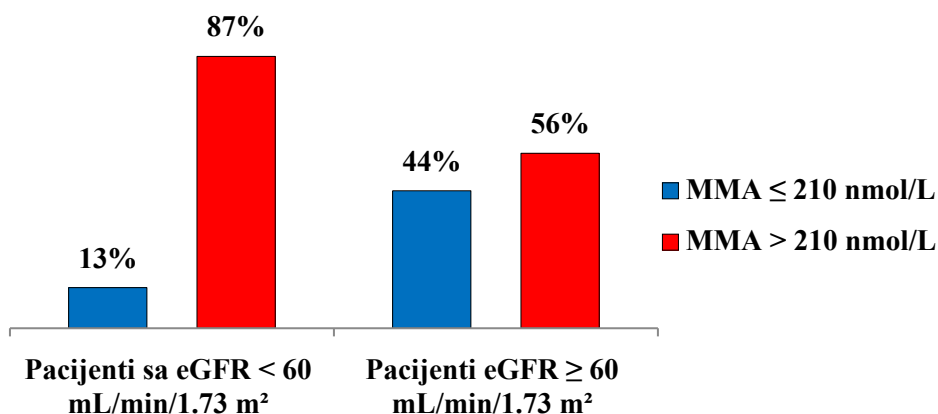
Višestrukom regresionom analizom testirana je prediktivna vrednost pola, starosti, kreatinina i vitamina B12 na koncentraciju MMA (Tabela 13).

**Tabela 13. Prediktori vrednosti MMA kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12**

Parametar	Standardizovan koeficijent Beta	t	P	Semiparcijalni koeficijent korelacije
Pol	-0.115	-1.564	0.12	-0.103
Starost	0.312	4.340	< 0.001	0.287
Kreatinin	0.239	3.265	0.001	0.216
Vitamin B12	-0.307	-4.606	< 0.001	-0.304

Statistički značajan model ( $F = 14.346$ ,  $P < 0.001$ ) objasnio je 25% varijanse u vrednostima MMA. Najznačajniji prediktor koncentracije MMA bio je vitamin B12. Pojedinačno, kobalamin je objašnjavao 9.2% varijanse u koncentracijama MMA, starost 8.2%, a kreatinin 4.7%. Starost i kreatinin bili su pozitivni, a kobalamin negativan prediktor vrednosti MMA. Pol nije bio značajan prediktor vrednosti MMA.

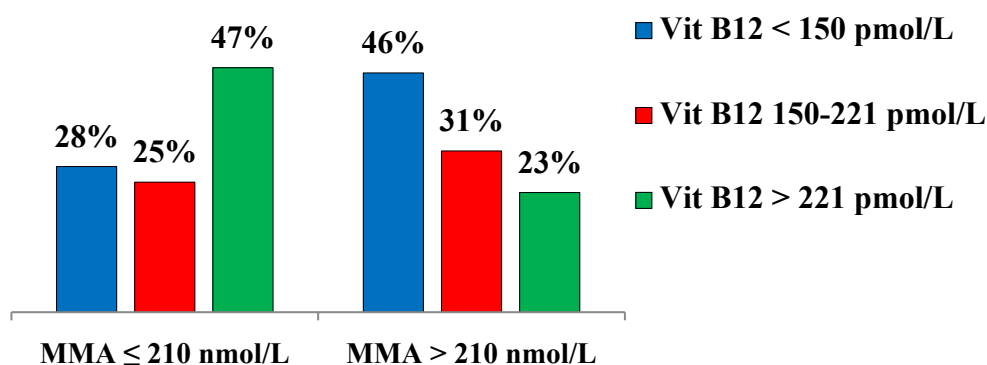
Između žena i muškaraca nije bilo razlike prema zastupljenosti različitih nivoa MMA ( $\chi^2 = 1.995$ ,  $P = 0.16$ ). Vrednosti MMA  $> 210$  nmol/L bile su statistički značajno više zastupljene kod pacijenata sa smanjenom funkcijom bubrega ( $\chi^2 = 16.813$ ,  $P < 0.001$ ,  $f_i = 0.32$ ).



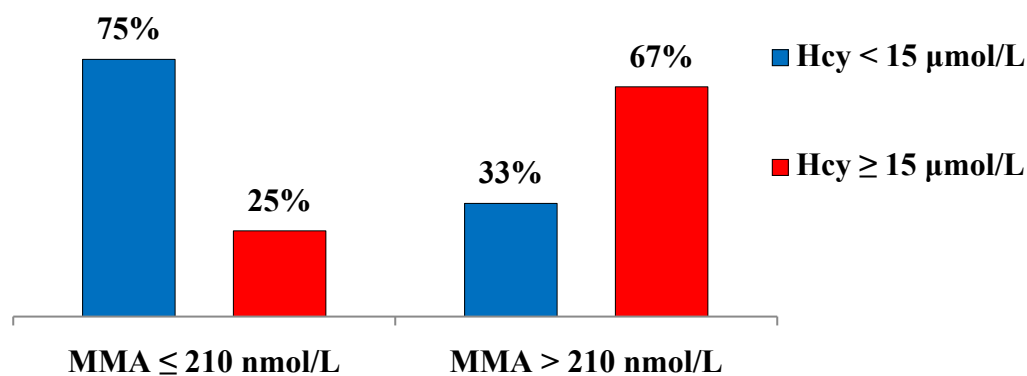
**Slika 22. Zastupljenost različitih nivoa MMA kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12 u zavisnosti od funkcije bubrega**

Kada su u pitanju drugi biomarkeri statusa vitamina B12, kod pacijenata sa MMA > 210 nmol/L bila je statistički veća zastupljenost koncentracija vitamina B12 < 150 pmol/L ( $\chi^2 = 10.752$ , P = 0.005, Cramer V = 0.25, |prilagođeni rezidual| = 2.3), kao i vrednosti Hcy  $\geq 15 \mu\text{mol/L}$  ( $\chi^2 = 26.505$ , P < 0.001, fi = 0.40).

A)



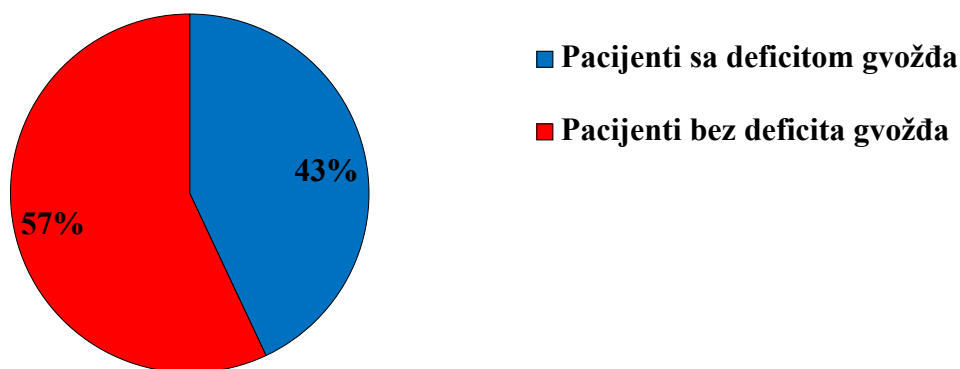
B)



Slika 23. Zastupljenost različitih nivoa A) kobalamina i B) homocisteina kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12 i različitim nivoima MMA

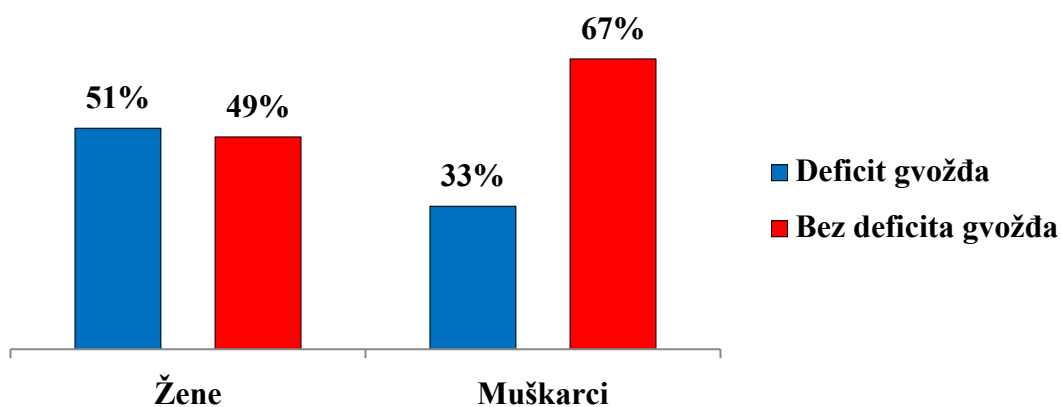
### 4.3. Status gvožđa

Deficit gvožđa je definisan kao koncentracija feritina  $< 15 \mu\text{g/L}$  i/ili saturacija transferina gvožđem  $< 16\%$  (324, 326). Od 259 ispitanika deficit gvožđa bio je prisutan kod 111 pacijenata.



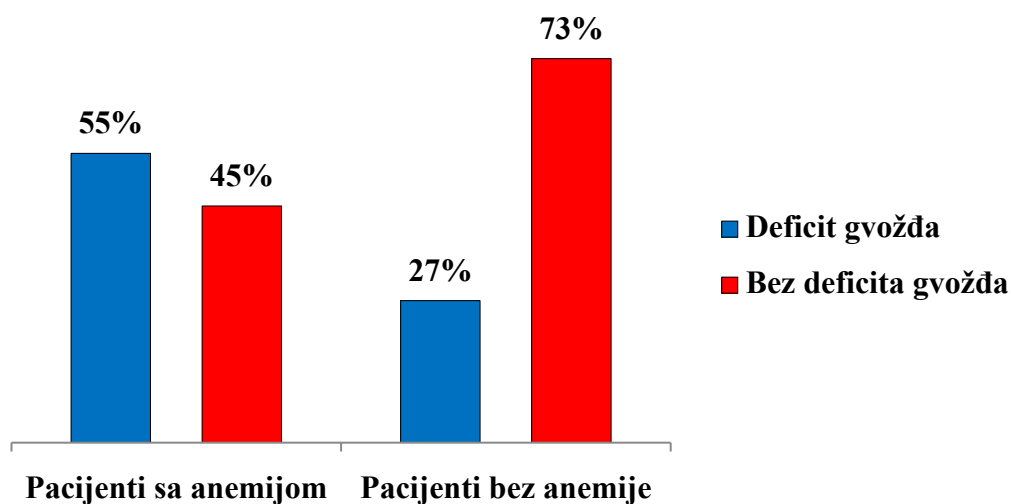
Slika 24. Zastupljenost deficita gvožđa kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12

Prema rezultatima Hi-kvadrat testa nezavisnosti, distribucija deficita gvožđa razlikovala se između polova, kao i između pacijenata sa anemijom i bez nje. Ženski pol je imao statistički značajno veću zastupljenost deficita gvožđa ( $\chi^2 = 7.118$ ,  $P = 0.008$ ,  $\text{fi} = -0.18$ ) u odnosu na muški pol.



Slika 25. Zastupljenost deficita gvožđa prema polu kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12

Pacijenti sa anemijom imali su statistički značajno veću zastupljenost deficita gvožđa ( $\chi^2 = 18.687$ ,  $P < 0.001$ ,  $f_i = 0.28$ ) u odnosu na pacijente bez anemije, dok se pacijenti sa smanjenom i normalnom funkcijom bubrega nisu razlikovali prema distribuciji deficita gvožđa ( $\chi^2 = 2.103$ ,  $P = 0.15$ ).



**Slika 26. Zastupljenost deficita gvožđa kod pacijenat sa rizikom za deficit vitamina B12 u zavisnosti od prisustva anemije**

### 4.3.1. Povezanost anemije sa statusom gvožđa, kobalamina i folata, i smanjenom funkcijom bubrega

S obzirom na to da je 55% ispitanika sa rizikom za deficit vitamina B12 imalo anemiju i da su u grupi bili prisutni deficit gvožđa, niske koncentracije kobalamina i folata, kao i smanjena funkcija bubrega, ispitana je prediktivna vrednost ovih parametara za anemiju. Rezultati binarne logističke regresije prikazani su u Tabeli 14.

**Tabela 14. Prediktori anemije kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12**

	<b>B</b>	<b>Standardna greška</b>	<b>Wald</b>	<b>P</b>	<b>Količnik verovatnoće (95% IP)</b>
<b>Vitamin B12</b>	0.001	0.001	1.059	0.30	1.00 (0.999–1.004)
<b>Folat</b>	0.009	0.016	0.273	0.60	1.01 (0.977–1.042)
<b>eGFR</b>	1.121	0.312	12.946	< 0.001	3.07 (1.666–5.651)
<b>Deficit gvožđa</b>	1.421	0.293	23.566	< 0.001	4.14 (2.333–7.347)

Dobijen je statistički značajan model ( $\chi^2 = 36.700$ ,  $P < 0.001$ ) u kojem serumske koncentracije vitamina B12 i folata nisu bile značajni prediktori prisustva anemije, dok su deficit gvožđa i smanjena funkcija bubrega bili statistički značajni pozitivni prediktori anemije. Pacijenti sa eGFR < 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> imali su 3 puta veću verovatnoću za pojavu anemije u odnosu na pacijente sa normalnom bubrežnom funkcijom, a pacijenti sa deficitom gvožđa 4 puta veću verovatnoću da imaju anemiju u poređenju sa pacijentima bez deficita gvožđa.

Kako je funkcija bubrega jedan od prediktora anemije, Hi-kvadrat testom nezavisnosti upoređena je zastupljenost deficita gvožđa, niskih koncentracija i iscrpljenih rezervi kobalamina, niskih koncentracija folata i povećanih koncentracija Hcy između pacijenata sa anemijom i bez nje u zavisnosti od toga kakvu su funkciju bubrega imali (Tabela 15).



**Tabela 15. Zastupljenost deficita gvožđa, vitamina B12 i folata kod pacijenata sa anemijom i bez nje**

<b>eGFR &lt; 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup></b>					
	<b>Deficit gvožđa</b>	<b>Vit B12 &lt; 150 pmol/L</b>	<b>Vit B12 150–221 pmol/L</b>	<b>Folat &lt; 10 nmol/L</b>	<b>Hcy ≥ 15 μmol/L</b>
<b>Pacijenti sa anemijom</b>	44%*	31%	22%	10%	85%
<b>Pacijenti bez anemije</b>	17%*	30%	26%	7%	85%
<b>eGFR ≥ 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup></b>					
	<b>Deficit gvožđa</b>	<b>Vit B12 &lt; 150 pmol/L</b>	<b>Vit B12 150–221 pmol/L</b>	<b>Folat &lt; 10 nmol/L</b>	<b>Hcy ≥ 15 μmol/L</b>
<b>Pacijenti sa anemijom</b>	63%**	39%	24%	18%	25%
<b>Pacijenti bez anemije</b>	30%**	29%	37%	13%	28%

Statistički značajne razlike: \* $\chi^2 = 4.315$ ,  $P = 0.038$ ,  $fi = 0.26$  \*\* $\chi^2 = 17.272$ ,  $P < 0.001$ ,  $fi = 0.33$

Rezultati poređenja pokazali su da postoji statistički značajna razlika u distribuciji deficita gvožđa između pacijenata sa anemijom i bez nje bez obzira na funkciju bubrega, tj. anemični pacijenti imali su značajno veću zastupljenost deficita gvožđa. Distribucije različitih nivoa kobalamina, folata i Hcy nisu se razlikovale između anemičnih pacijenata i pacijenata bez anemije bez obzira na funkciju bubrega.

#### 4.4. Morfometrijski parametri neutrofila i monocita

Pre analize povezanosti CPD parametara neutrofila i monocita sa statusom kobalamina, folata, gvožđa, anemijom i smanjenom funkcijom bubrega, ispitan je uticaj pola i starosti na ove parametre. Analiza uticaja pola i starosti izvršena je u kontrolnoj grupi od 148 zdravih ispitanika. Njihovi biohemijski i hematološki parametri prikazani su u Tabeli 16.

**Tabela 16. Hematološki i biohemijski parametri u kontrolnoj grupi**

Svi ispitanici (N = 148)	Xsr ± SD / MD (IR)	Min	Max
WBC (x 10 <sup>9</sup> /L)	7.33 ± 1.77	4.53	10.50
RBC (x 10 <sup>12</sup> /L)	4.46 ± 0.40	3.83	5.32
Hb (g/L)	139.57 ± 11.77	122.80	164.60
Hct (L/L)	0.42 ± 0.04	0.36	0.49
MCV (fL)	93.52 ± 3.47	86.66	98.69
RDW (%)	13.58 ± 0.76	12.30	15.18
Vit B12 (pmol/L)	271.92 ± 94.53	160.25	522.12
Folat (nmol/L)	14.50 (11.96–19.07)	10.00	37.12
RBC folat (nmol/L)	906.50 (820.77–1265.00)	688.17	3394.58
Hcy (µmol/L)	11.06 ± 1.89	7.64	14.82
MMA (nmol/L)	168.04 ± 38.65	84.00	265.00
Feritin (µg/L)	38.05 (25.85–82.50)	11.50	199.70
Transferin (g/L)	2.69 ± 0.43	1.92	3.55
Haptoglobin (g/L)	1.51 ± 0.36	0.70	2.00
sTfR (mg/L)	1.18 (1.08–1.57)	0.83	2.28
SAT (%)	25.44 ± 8.07	13.22	42.87
Gvožđe (µmol/L)	16.86 ± 4.67	9.50	26.50
Kreatinin (µmol/L)	70.83 ± 14.38	44.00	99.00
CRP (mg/L)	1.30 (0.73–2.60)	0.40	5.70
LDH (U/L)	130.58 ± 32.93	58	226

U kontrolnoj grupi je bilo 49 muškaraca i 99 žena. Devedeset tri ispitanika je bilo mlađe, a 55 starije od 60 godina. Prosečna starost iznosila je  $49.76 \pm 12.24$  godina, za žene  $49.43 \pm 11.31$  godina i za muškarace  $50.43 \pm 14.89$  godina. Svi ispitanici kontrolne grupe su bili bez anemije i imali su normalan MCV (80–100 fL).

Vrednosti vitamina B12, folata, Hcy i MMA bile su unutar referentnog opsega. Ispitanici kontrolne grupe su bili negativni na At-IF, nisu imali inflamaciju i svi su imali  $eGFR \geq 60$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup>.

U Tabeli 17 su, pored morfometrijskih parametara neutrofila i monocita, za sve ispitanike kontrolne grupe prikazane i prosečne vrednosti prema polu i starosti sa P vrednostima njihovog poređenja. Dobijene P vrednosti ukazuju da se vrednosti CPD parametara neutrofila i monocita nisu razlikovale između žena i muškaraca, kao ni između starijih i mlađih od 60 godina.

**Tabela 17. Morfometrijski parametri neutrofila i monocita u kontrolnoj grupi**

	<b>Svi ispitanici (N = 148)</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Žene (N = 99)</b>	<b>Muškarci (N = 49)</b>	<b>P</b>	<b>≤ 60 godina (N = 93)</b>	<b>&gt; 60 godina (N = 55)</b>	<b>P</b>
<b>NeV</b>	139.33 ± 4.24	129.30	146.38	138.78 ± 4.89	140.43 ± 2.41	<b>0.38</b>	139.70 ± 4.51	138.72 ± 3.93	<b>0.60</b>
<b>NeV-SD</b>	19.70 ± 1.29	16.50	21.79	19.43 ± 1.39	20.25 ± 0.89	<b>0.15</b>	19.87 ± 1.16	19.42 ± 1.51	<b>0.42</b>
<b>NeC</b>	148.07 ± 3.50	141.58	153.85	148.02 ± 3.43	148.18 ± 3.88	<b>0.92</b>	148.54 ± 3.59	147.29 ± 3.40	<b>0.41</b>
<b>NeC-SD</b>	5.00 ± 0.42	4.05	5.59	4.94 ± 0.45	5.14 ± 0.34	<b>0.26</b>	5.06 ± 0.39	4.91 ± 0.46	<b>0.38</b>
<b>NeS</b>	144.03 ± 3.95	134.92	150.93	144.40 ± 3.71	143.28 ± 4.58	<b>0.53</b>	144.33 ± 3.66	143.51 ± 4.58	<b>0.63</b>
<b>NeS-SD</b>	10.72 ± 0.91	8.79	13.14	10.79 ± 1.08	10.59 ± 0.42	<b>0.62</b>	10.80 ± 1.09	10.59 ± 0.50	<b>0.59</b>
<b>MoV</b>	159.68 ± 4.44	151.91	169.67	160.01 ± 4.70	159.01 ± 4.08	<b>0.62</b>	159.61 ± 4.57	159.80 ± 4.48	<b>0.92</b>
<b>MoV-SD</b>	17.17 ± 1.40	14.47	19.70	17.21 ± 1.36	17.09 ± 1.58	<b>0.86</b>	16.90 ± 0.88	17.62 ± 1.99	<b>0.33</b>
<b>MoC</b>	124.59 ± 2.86	118.71	129.41	124.50 ± 2.80	124.77 ± 3.16	<b>0.83</b>	124.70 ± 2.96	124.41 ± 2.85	<b>0.82</b>
<b>MoC-SD</b>	4.34 ± 0.39	3.72	5.45	4.33 ± 0.35	4.36 ± 0.50	<b>0.89</b>	4.30 ± 0.31	4.41 ± 0.53	<b>0.52</b>
<b>MoS</b>	86.41 ± 3.71	80.67	92.80	87.35 ± 3.46	84.55 ± 3.69	<b>0.08</b>	86.13 ± 3.86	86.88 ± 3.62	<b>0.64</b>
<b>MoS-SD</b>	10.57 ± 0.92	8.69	11.88	10.62 ± 0.95	10.45 ± 0.93	<b>0.67</b>	10.65 ± 0.82	10.43 ± 1.12	<b>0.59</b>

#### **4.4.1. Povezanost morfometrijskih karakteristika neutrofila i monocita sa koncentracijama vitamina B12, folata i homocisteina**

Povezanost CPD parametara neutrofila i monocita sa koncentracijama kobalamina, folata i homocisteina analizirana je u uzorku od 259 pacijenata. Iz analize su isključeni pacijenti sa kombinovano niskim koncentracijama folata i kobalamina. Na osnovu vrednosti vitamina B12 i folata od 250 ispitanika formirane su 3 podgrupe:

- Grupa 1, koju je činilo 157 pacijenata sa vitaminom B12  $\geq 150$  pmol/L i folatom  $\geq 10$  nmol/L
- Grupa 2, koja se sastojala od 74 pacijenta sa vitaminom B12  $< 150$  pmol/L i folatom  $\geq 10$  nmol/L
- Grupa 3, koja se sastojala od 19 pacijenata sa vitaminom B12  $\geq 150$  pmol/L i folatom  $< 10$  nmol/L.

U Grupi 1 su bili pacijenti bez deficita vitamina, u Grupi 2 pacijenti sa deficitom kobalamina, a u Grupi 3 pacijenti sa deficitom folata. U Tabeli 18 su prikazani opšti, biohemijski i hematološki parametri Grupa 1, 2 i 3.

Zastupljenost žena i muškaraca nije se razlikovala između grupa ( $\chi^2 = 0.135$ ,  $P = 0.94$ ). Postojala je razlika prema starosti ( $\chi^2 = 7.975$ ,  $P = 0.02$ ). Pacijenti sa niskim koncentracijama folata bili su statistički značajno mlađi u odnosu na pacijente sa niskim koncentracijama kobalamina ( $|z| = 2.589$ ,  $P = 0.03$ ,  $r = 0.27$ ).

Od hematoloških parametara, statistički značajna razlika postojala je prema broju leukocita ( $\chi^2 = 6.471$ ,  $P = 0.04$ ). Pacijenti sa vrednostima folata  $< 10$  nmol/L imali su statistički značajno veći broj leukocita u poređenju sa pacijentima bez deficita vitamina ( $|z| = 2.486$ ,  $P = 0.04$ ,  $r = 0.19$ ). Zastupljenost anemije ( $\chi^2 = 3.009$ ,  $P = 0.22$ ) i deficita gvožđa ( $\chi^2 = 4.854$ ,  $P = 0.09$ ) nije se razlikovala između grupa. Takođe, nije bilo razlike prema koncentraciji hemoglobina ( $\chi^2 = 2.479$ ,  $P = 0.29$ ), vrednosti hematokrita ( $\chi^2 = 0.654$ ,  $P = 0.72$ ) i RDW ( $\chi^2 = 3.973$ ,  $P = 0.14$ ).

**Tabela 18. Opšte karakteristike, hematološki i biohemijski parametri pacijenata grupisanih prema koncentraciji vitamina B12 i folata**

<b>Parametri</b>	<b>Grupa 1 (N = 157)</b>	<b>Grupa 2 (N = 74)</b>	<b>Grupa 3 (N = 19)</b>
<b>Pol (ž/m)</b>	86 / 71	42 / 32	10 / 9
<b>Starost (godine)</b>	57.50 (42.50– 67.75)	63.00 (48.00–71.50)	49.00* (33.00–55.00)
<b>WBC (x 10<sup>9</sup>/L)</b>	6.50 (5.31–7.94)	6.48 (5.67–7.15)	7.95** (5.90–9.48)
<b>Hb (g/L)</b>	125.00 (117.45–134.35)	121.65 (116.63–133.40)	120.30 (113.70–134.60)
<b>MCV (fL)</b>	92.58 (88.72–95.82)	90.82 (86.63–93.45)	91.10 (87.40–92.83)
<b>Hct (L/L)</b>	0.38 (0.35–0.40)	0.37 (0.35–0.40)	0.37 (0.34–0.40)
<b>RDW (%)</b>	13.87 (13.34–14.60)	14.18 (13.55–15.32)	13.81 (13.44–14.56)
<b>Vit B12 (pmol/L)</b>	230.99 (181.92–301.47)	122.51 (100.92–134.32)	239.11 (208.12–291.51)
<b>Folat (nmol/L)</b>	16.95 (13.68–22.71)	16.87 (13.28–21.66)	8.16 (6.57–8.47)
<b>Hcy (µmol/L)</b>	14.58 (10.60 – 18.98)	15.52 (11.19–22.08)	15.50 (11.09–21.70)
<b>Kreatinin (µmol/L)</b>	83.00 (65.00–127.00)	76.50 (64.00–95.75)	67.00 (62.00–81.00)
<b>Feritin (µg/L)</b>	40.70 (17.40–83.30)	30.10 (13.20–76.75)	53.00 (33.70–149.70)
<b>SAT (%)</b>	22.72 (13.44–29.54)	19.62 (13.55–25.97)	17.96 (13.20–22.62)
<b>CRP (mg/L)</b>	1.50 (0.90–3.05)	1.75 (0.88–3.60)	2.10 (1.40–6.84)

Statistički značajne razlike: \*Grupa 3 vs Grupa 2, P < 0.05; \*\*Grupa 3 vs Grupa 1, P < 0.05

Nije bilo razlika prema kreatininu ( $\chi^2 = 4.551$ ,  $P = 0.10$ ), kao ni prema zastupljenosti pacijenata sa smanjenom funkcijom bubrega ( $\chi^2 = 2.349$ ,  $P = 0.31$ ). Iako su grupe formirane prema koncentracijama kobalamina i folata koje označavaju deficit ovih vitamina, nije bilo razlike ni prema Hcy ( $\chi^2 = 2.072$ ,  $P = 0.36$ ).

U Tabeli 19 su prikazani CPD parametri neutrofila i monocita u Grupama 1, 2 i 3.

**Tabela 19. Morfometrijski parametri neutrofila i monocita pacijenata grupisanih prema koncentraciji vitamina B12 i folata**

CPD parametri	Grupa 1 (N = 157)	Grupa 2 (N = 74)	Grupa 3 (N = 19)
NeV	139.22 (136.00–142.26)	139.54 (135.92–143.38)	141.48 (137.28–145.37)
NeV-SD	19.35 (18.38–20.34)	19.78 (18.75–20.93)	20.30* (19.07–22.55)
NeC	149.78 (147.15–151.94)	149.59 (146.81–151.55)	148.71 (145.61–151.74)
NeC-SD	4.96 ** (4.72–5.17)	5.34 (5.00–5.84)	5.80 (5.38–6.80)
NeS	146.28 (143.74–149.44)	145.86 (142.37–148.42)	143.78* (139.88–146.86)
NeS-SD	10.21 (9.66–10.68)	10.44 (9.89–11.20)	10.84* (10.23–11.96)
MoV	159.87 ± 4.60	159.15 ± 5.88	160.64 ± 3.00
MoV-SD	17.11 (16.31–17.91)	17.74 (16.30–18.76)	18.97*** (18.20–20.45)
MoC	126.08 (123.70–128.52)	125.42 (123.04–127.58)	123.73* (121.64–125.60)
MoC-SD	4.34 (4.11–4.55)	4.37 (4.16 – 4.68)	4.72* (4.34 – 5.20)
MoS	88.57 (86.25–90.28)	88.49 (85.44–91.19)	87.69 (84.18–89.46)
MoS-SD	10.51 ± 0.90	10.48 ± 0.97	10.80 ± 1.05

Statistički značajne razlike: \*Grupa 3 vs Grupa 1,  $P < 0.05$ ; \*\*Grupa 1 vs Grupa 3 i Grupa 1 vs Grupa 2,  $P < 0.05$ ; \*\*\*Grupa 3 vs Grupa 1 i Grupa 3 vs Grupa 2,  $P < 0.05$ .

Kada su u pitanju CPD parametri, grupe su se razlikovale prema: NeV-SD ( $\chi^2 = 9.666$ ,  $P = 0.008$ ), NeC-SD ( $\chi^2 = 57.081$ ,  $P < 0.001$ ), NeS ( $\chi^2 = 8.741$ ,  $P = 0.01$ ), NeS-SD ( $\chi^2 = 12.958$ ,  $P = 0.002$ ), MoV-SD ( $\chi^2 = 19.807$ ,  $P < 0.001$ ), MoC ( $\chi^2 = 7.854$ ,  $P = 0.02$ ) i MoC-SD ( $\chi^2 = 7.139$ ,  $P = 0.03$ ). Statistički značajni rezultati Kruskal–Wallis testa su prikazani u Tabeli 20.

**Tabela 20. Statistički značajni rezultati poređenja Grupa 1, 2 i 3 dobijeni Kruskal-Wallis testom**

Parametar	Grupe	z	P	r
<b>NeV-SD</b>	1 vs 3	2.607	0.03	0.20
<b>NeS</b>	1 vs 3	2.736	0.02	0.21
<b>NeS-SD</b>	1 vs 3	3.111	0.006	0.23
<b>MoC</b>	1 vs 3	2.712	0.02	0.20
<b>MoC-SD</b>	1 vs 3	2.602	0.03	0.20
<b>NeC-SD</b>	1 vs 2	6.004	< 0.001	0.40
	1 vs 3	5.623	< 0.001	0.42
<b>MoV-SD</b>	3 vs 1	4.160	< 0.001	0.31
	3 vs 2	2.654	0.02	0.28

Vrednosti parametara NeV-SD, NeS-SD i MoC-SD bile su statistički značajno više, a vrednosti NeS i MoC statistički značajno niže kod pacijenata sa deficitom folata u odnosu na pacijente bez deficita vitamina B12 i folata. Pacijenti sa deficitom kobalamina ili deficitom folata imali su statistički značajno više vrednosti NeC-SD u odnosu na pacijente bez deficita oba vitamina. Parametar MoV-SD je bio statistički značajno viši kod pacijenata sa izolovanim deficitom folata u odnosu na pacijente bez deficita oba vitamina i pacijente sa izolovanim deficitom kobalamina.



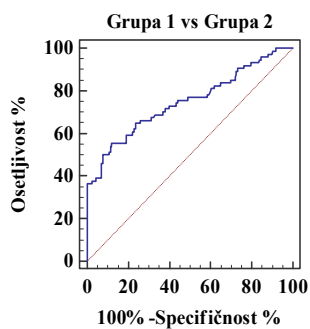
Za parametre NeC-SD i MoV-SD urađena je ROC analiza. Rezultati su prikazani u Tabeli 21.

**Tabela 21. Rezultati ROC analize za NeC-SD i MoV-SD**

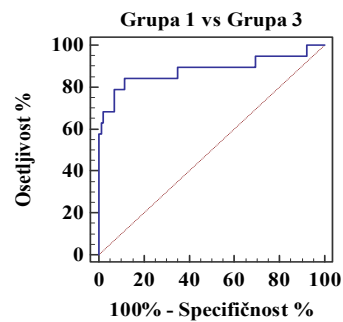
Parametar	Grupe	AUC	P	Standardna greška	95% IP
NeC-SD	1 vs 2	0.748	< 0.001	0.038	0.687–0.803
	1 vs 3	0.881	< 0.001	0.058	0.824–0.925
	1 vs 2, 3	0.776	< 0.001	0.033	0.719–0.826
MoV-SD	3 vs 1	0.787	< 0.001	0.063	0.720–0.845
	3 vs 2	0.708	0.002	0.067	0.604–0.797
	3 vs 1, 2	0.762	< 0.001	0.062	0.704–0.813

Parametar NeC-SD je imao dobru dijagnostičku osetljivost za izolovani deficit kobalamina i veoma dobru dijagnostičku osetljivost za izolovani deficit folata. Postojala je statistički značajna razlika između AUC ( $|z| = 2.101$ , standardna greška = 0.063,  $P = 0.04$ ). Površina ispod krive za prepoznavanje izolovanog deficita folata bila je statistički značajno veća u poređenju sa AUC za deficit kobalamina. ROC krive za NeC-SD prikazane su na Slici 27.

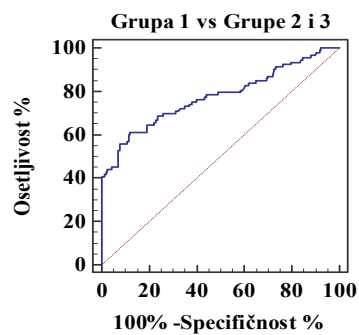
A)



B)



C)



Slika 27. ROC krive za NeC-SD u klasifikaciji pacijenata sa A) deficitom vitamina B12, B) deficitom folata i C) deficitom vitamina B12 ili folata u odnosu na pacijente bez niskih koncentracija oba vitamina

Optimalna granična vrednost za NeC-SD iznosila je 5.0. Njene dijagnostičke karakteristike predstavljene su u Tabeli 22.

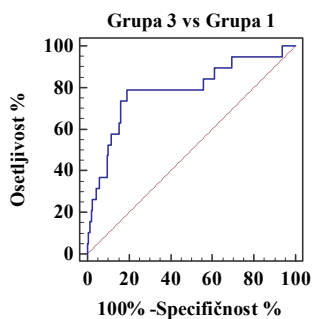
**Tabela 22. Dijagnostička tačnost granične vrednosti za NeC-SD u klasifikaciji pacijenata prema koncentraciji kobalamina i folata**

NeC-SD	Grupa 1 vs Grupa 2	Grupa 1 vs Grupa 3	Grupa 1 vs Grupe 2, 3
<b>Granična vrednost</b>	5.0	5.0	5.0
<b>Osetljivost (%)</b> <b>(95% IP)</b>	75.7 (64.3–84.9)	89.5 (66.9–98.7)	78.5 (68.8–86.3)
<b>Specifičnost (%)</b> <b>(95% IP)</b>	55.4 (47.3–63.3)	55.4 (47.3–63.3)	55.4 (47.3–63.3)
<b>PPV (%)</b> <b>(95% IP)</b>	44.4 (35.6–53.6)	19.5 (11.8–29.4)	51.0 (42.6–59.5)
<b>NPV (%)</b> <b>(95% IP)</b>	82.9 (74.3–89.5)	97.8 (92.1–99.7)	81.3 (72.6–88.2)
<b>Količnik verovatnoće</b> <b>(95% IP)</b>	3.7 (2.0–6.8)	10.0 (2.2–44.9)	4.3 (2.4–7.7)

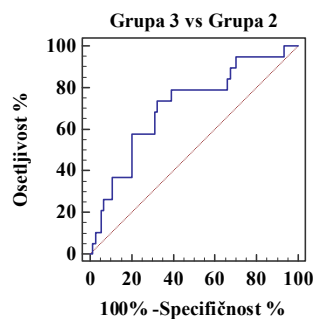
Specifičnost granične vrednosti bila je ista za deficit kobalamina i folata, dok je najveća osetljivost dobijena za niske koncentracije folata. Pacijent sa deficitom kobalamina imao je 3.7 puta veću verovatnoću, a pacijent sa deficitom folata 10 puta veću verovatnoću za vrednosti NeC-SD > 5.0 u odnosu na pacijenta bez deficita oba vitamina.

Na Slici 28 prikazane su ROC krive za MoV-SD. Parametar MoV-SD je pokazao dobru dijagnostičku osetljivost u klasifikaciji pacijenata sa deficitom folata u odnosu na pacijente bez deficita oba vitamina, kao i u odnosu na pacijente sa deficitom kobalamina (Tabela 21). Površine ispod krivih nisu se statistički značajno razlikovale ( $|z| = 0.820$ , standardna greška = 0.096,  $P = 0.41$ ).

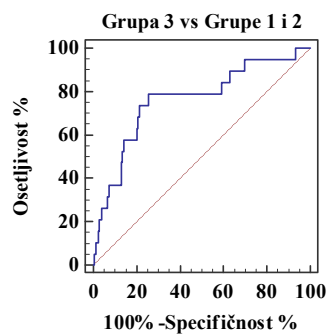
A)



B)



C)



**Slika 28. ROC krive za MoV-SD u klasifikaciji pacijenata sa deficitom folata u odnosu na A) pacijente bez deficita oba vitamina, B) pacijente sa deficitom kobalamina i C) pacijente bez deficita i sa deficitom kobalamina**

Optimalna granična vrednost za MoV-SD iznosila je 18.0. Njene dijagnostičke karakteristike predstavljene su u Tabeli 23.

**Tabela 23. Dijagnostička tačnost granične vrednosti za MoV-SD u klasifikaciji pacijenata prema koncentraciji folata**

MoV-SD	Grupa 3 vs Grupa 1	Grupa 3 vs Grupa 2	Grupa 3 vs Grupa 1, 2
<b>Granična vrednost</b>	18.0	18.0	18.0
<b>Osetljivost (%)</b> (95% IP)	79.0 (54.4–93.9)	79.0 (54.4–93.9)	79.0 (54.4–93.9)
<b>Specifičnost (%)</b> (95% IP)	79 (71.8–85.1)	56.8 (44.7–68.2)	71.4 (65.1–77.2)
<b>PPV %</b> (95% IP)	31.3 (18.7–46.3)	31.9 (19.1–47.1)	18.5 (10.8–28.7)
<b>NPV (%)</b> (95% IP)	96.9 (92.2–99.1)	91.3 (79.2–97.6)	97.6 (94.1–99.4)
<b>Količnik verovatnoće</b> (95% IP)	13.6 (4.2–43.6)	4.7 (1.4–15.4)	9.2 (2.9–28.7)

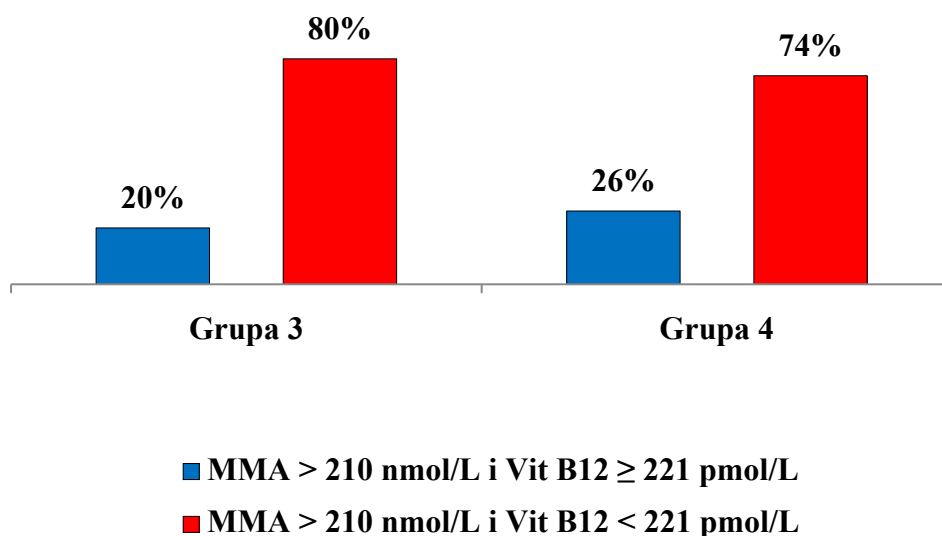
Osetljivost MoV-SD > 18.0 za deficit folata bila je ista za sva poređenja i iznosila je 79%. Najveća specifičnost dobijena je kada su pacijenti sa deficitom folata upoređeni sa pacijentima bez deficita oba vitamina, a najmanja kada su pacijenti sa deficitom folata upoređeni sa pacijentima koji su imali izolovani deficit kobalamina. Prema količniku verovatnoće, pacijent sa deficitom folata imao je 13.6 puta veću verovatnoću za MoV-SD > 18.0 u odnosu na pacijenta bez deficita oba vitamina i 4.7 puta veću verovatnoću u odnosu na pacijenta sa deficitom kobalamina.

#### **4.4.2. Povezanost morfometrijskih karakteristika neutrofila i monocita sa metilmalonskom kiselinom i funkcijom bubrega**

Povezanost CPD parametara neutrofila i monocita sa MMA i smanjenom funkcijom bubrega analizirana je u grupi od 177 ispitanika kojima je određena MMA. Iz analize su isključeni pacijenti sa deficitom folata. Preostala 142 pacijenta grupisana su prema eGFR i koncentracijama MMA i vitamina B12:

- Grupa 1 – 19 pacijenata sa eGFR  $\geq$  60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> i vitaminom B12  $\geq$  221 pmol/L i MMA  $\leq$  210 nmol/L
- Grupa 2 – 21 pacijent sa eGFR  $\geq$  60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> i vitaminom B12 < 221 pmol/L i MMA  $\leq$  210 nmol/L
- Grupa 3 – 49 pacijenata sa eGFR  $\geq$  60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> i MMA > 210 nmol/L
- Grupa 4 – 53 pacijenata sa eGFR < 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> i MMA > 210 nmol/L.

Grupe 1, 2 i 3 nisu imale smanjenu funkciju bubrega, s tim što su u Grupi 1 bili pacijenti bez deficita kobalamina, u Grupi 2 sa izolovano niskim koncentracijama vitamina B12, a u Grupi 3 sa povećanom MMA. U Grupi 4 su bili pacijenti sa smanjenom funkcijom bubrega i povećanom MMA. U Grupama 3 i 4 je bilo pacijenata sa izolovano povećanom MMA, kao i sa kombinovano povećanom MMA i smanjenim koncentracijama kobalamina. Njihova zastupljenost se nije razlikovala između ove dve grupe ( $\chi^2 = 0.231$ , P = 0.63).



**Slika 29. Zastupljenost niskih koncentracija kobalamina u Grupama 3 i 4**

U Tabeli 24 su prikazane opšte karakteristike pacijenata sa hematološkim i biohemijskim parametrima u Grupama 1, 2, 3 i 4.

**Tabela 24. Opšte karakteristike pacijenata sa biohemijskim i hematološkim parametrima u grupama sa različitim statusom vitamina B12**

Parametar	Grupa 1 (N = 19)	Grupa 2 (N = 21)	Grupa 3 (N = 49)	Grupa 4 (N = 53)
Pol (ž/m)	11 / 8	12 / 9	30 / 19	22 / 31
Starost (godine)	54.00 (46.00–63.50)	48.00 (44.00–57.00)	58.00 (45.50–67.00)	68.00* (59.00–76.50)
WBC (x 10 <sup>9</sup> /L)	6.60 ± 1.46	7.64 ± 1.84	6.44 ± 1.59	6.68 ± 1.62
Hb (g/L)	131.50 (125.70–145.00)	131.90 (119.70–141.50)	129.40 (118.60–140.20)	122.80* (116.40–131.20)
Hct (L/L)	0.39 (0.37–0.43)	0.39 (0.36–0.42)	0.39 (0.36–0.42)	0.37* (0.34–0.39)
MCV (fL)	92.68 (89.75–96.02)	92.57 (87.24–96.16)	91.91 (88.27–95.91)	91.34 (89.07–95.28)
RDW (%)	13.58 (12.72–14.14)	14.08 (13.32–15.97)	14.07 (13.56–14.86)	14.03 (13.46–14.92)
Vit B12 (pmol/L)	306.27 (261.25 – 345.38)	145.39 (122.51–169.00)	134.32 (105.90–193.73)	167.53 (131.36–221.77)
Folat (nmol/L)	15.82 (13.89–22.10)	15.75 (12.89–20.46)	16.16 (13.35–21.72)	17.49 (13.21–23.77)
Hcy (µmol/L)	11.14 (9.55–12.88)	10.97 (8.56–12.84)	13.84 (11.52–17.50)	23.75* (19.53–29.60)
MMA (nmol/L)	155.00 (135.00–184.50)	153.00 (127.02–170.00)	337.00 (262.00–488.50)	433.00 (346.00–582.00)
Krea (µmol/L)	79.00 (61.50–84.50)	65.00 (58.00–73.00)	72.00 (60.00–77.50)	144.00 (120.50–194.50)
Feritin (µg/L)	38.10 (22.25–77.35)	42.80 (14.10–100.00)	38.60 (13.50–81.85)	60.50 (28.75–93.43)
SAT (%)	25.78 (15.49–28.23)	26.33 (15.62–32.92)	22.75 (15.63–28.65)	20.50 (15.12–27.58)
sTfR (mg/L)	1.49 (1.20–1.66)	1.14 (1.04–1.94)	1.51 (1.28–1.70)	1.58 (1.19–2.18)
CRP (mg/L)	1.50 (0.90–2.95)	1.90 (0.80–3.60)	1.90 (0.95–3.90)	1.50 (0.85–2.90)

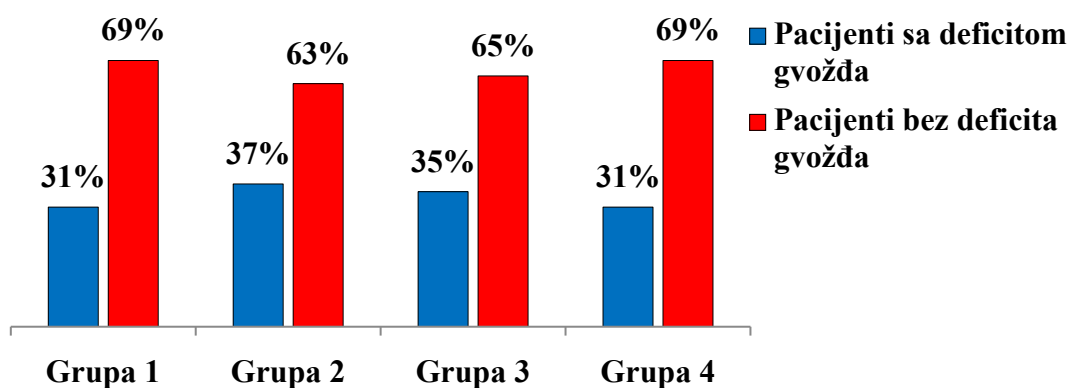
Statistički značajne razlike: \*Grupa 4 vs Grupa 1, Grupa 4 vs Grupa 2, Grupa 4 vs Grupa 3, P < 0.05.

Grupe se nisu razlikovale prema zastupljenosti polova ( $\chi^2 = 4.552$ ,  $P = 0.21$ ), ali jesu prema starosti ispitanika ( $\chi^2 = 28.321$ ,  $P < 0.001$ ). Pacijenti sa smanjenom funkcijom bubrega i povećanim vrednostima MMA bili su značajno stariji od pacijenata u ostalim grupama.

**Tabela 25. Razlike prema starosti ispitanika**

Starost	Grupe	z	P	r
	4 vs 1	3.290	0.006	0.39
	4 vs 2	4.711	< 0.001	0.55
	4 vs 3	3.313	0.006	0.33

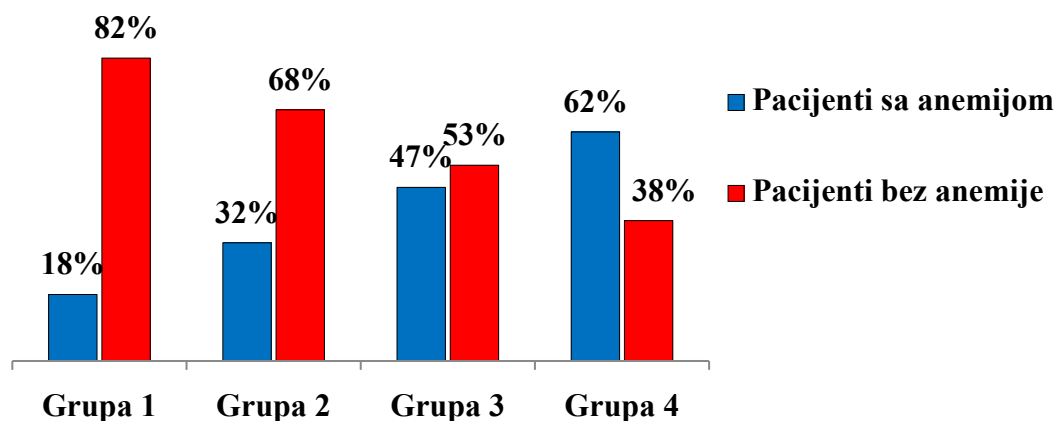
Zastupljenost deficita gvožđa nije se razlikovala između grupa ( $\chi^2 = 0.266$ ,  $P = 0.97$ ). Takođe, nije bilo razlike prema koncentraciji sTfR ( $\chi^2 = 5.135$ ,  $P = 0.16$ ).



**Slika 30. Distribucija deficita gvožđa u Grupama 1, 2, 3 i 4**

Iako se grupe nisu razlikovale prema distribuciji deficita gvožđa, razlika je postojala prema zastupljenosti pacijenata sa anemijom ( $\chi^2 = 12.648$ ,  $P = 0.005$ , Cramerov  $V = 0.30$ ). Najveću zastupljenost anemije imali su pacijenti sa smanjenom funkcijom bubrega i povećanim vrednostima MMA, tj. Grupa 4 ( $|prilagođeni reziduali| = 2.8$ ).





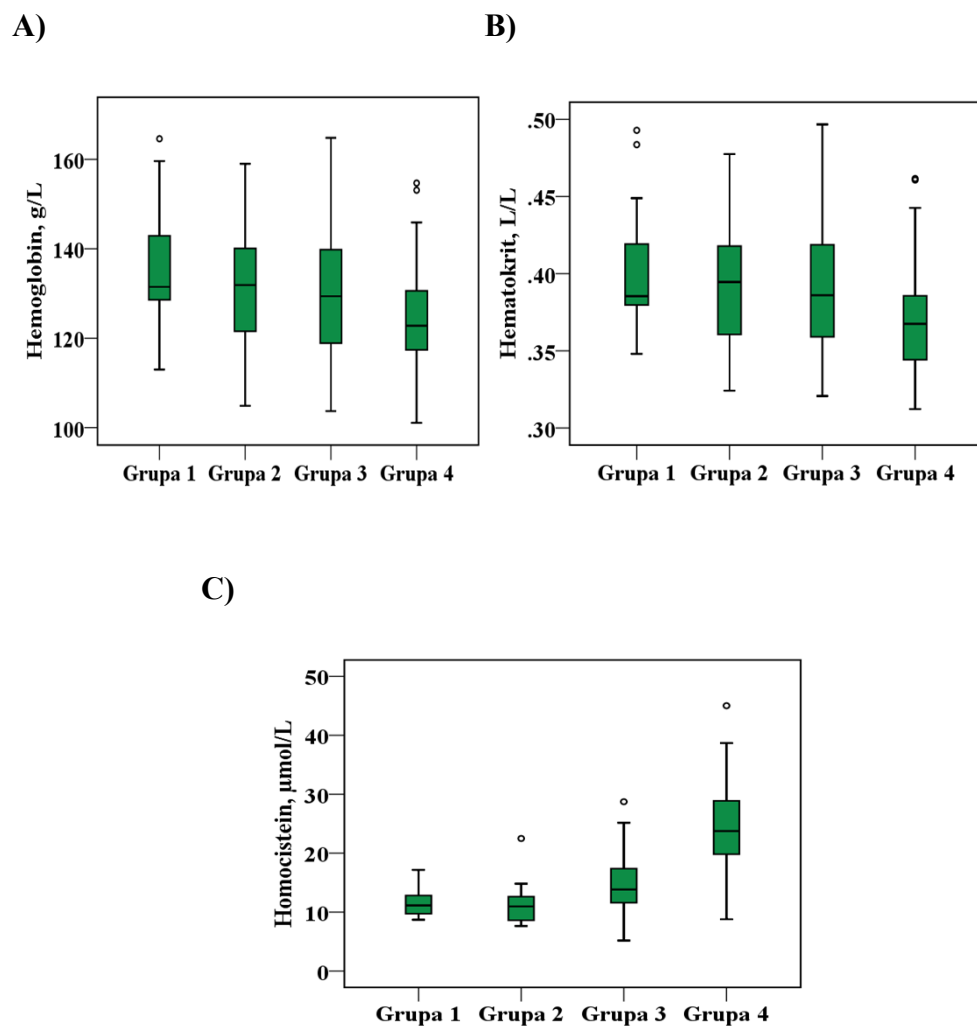
**Slika 31. Distribucija pacijenata sa anemijom i bez nje u Grupama 1, 2, 3 i 4**

Kada su u pitanju hematološki parametri, razlike nije bilo prema WBC ( $F = 2.041$ ,  $P = 0.12$ ) i RDW ( $\chi^2 = 4.393$ ,  $P = 0.22$ ), dok su se vrednosti hemoglobina ( $\chi^2 = 11.209$ ,  $P = 0.01$ ) i hematokrita ( $\chi^2 = 11.709$ ,  $P = 0.008$ ) razlikovale između grupa. Od biohemijskih parametara razlika je postojala prema Hcy ( $\chi^2 = 67.137$ ,  $P < 0.001$ ).

**Tabela 26. Rezultati Kruskal–Wallis testa za hemoglobin i homocistein**

	Grupe	z	P	r
<b>Hb</b>	4 vs 1	2.825	0.005	0.33
	4 vs 2	2.150	0.03	0.25
	4 vs 3	2.289	0.02	0.23
<b>Hct</b>	4 vs 1	2.515	0.01	0.30
	4 vs 2	2.412	0.02	0.28
	4 vs 3	2.644	0.008	0.26
<b>Hcy</b>	4 vs 1	5.839	< 0.001	0.69
	4 vs 2	6.600	< 0.001	0.77
	4 vs 3	5.462	< 0.001	0.54

Pacijenti u Grupi 4, sa povećanim koncentracijama MMA i smanjenom funkcijom bubrega, imali su statistički značajno niže vrednosti Hb i Hct, i statistički značajno više koncentracije Hcy u poređenju sa ostalim grupama (Slika 32).



**Slika 32. Distribucija vrednosti A) hemoglobina, B) hematokrita i C) homocisteina u Grupama 1, 2, 3 i 4**

U Tabeli 27 su prikazni CPD parametri neutrofila i monocita u Grupama 1, 2, 3 i 4.

**Tabela 27. Morfometrijski parametri neutrofila i monocita u grupama sa različitim statusom vitamina B12**

<b>Parametar</b>	<b>Grupa 1 (N = 19)</b>	<b>Grupa 2 (N = 21)</b>	<b>Grupa 3 (N = 49)</b>	<b>Grupa 4 (N = 53)</b>
<b>NeV</b>	139.91 ± 5.39	139.85 ± 3.69	139.63 ± 5.25	140.88 ± 5.78
<b>NeV-SD</b>	19.49 (18.93–20.43)	19.83 (19.22–20.93)	19.77 (18.68–20.64)	19.47 (18.74–21.11)
<b>NeC</b>	148.44 ± 2.70	148.70 ± 3.67	149.29 ± 3.37	148.85 ± 3.38
<b>NeC-SD</b>	4.95* (4.68–5.19)	5.35 (5.05–5.49)	5.22 (4.96–5.57)	5.23 (5.01–5.65)
<b>NeS</b>	145.77 (143.01–149.72)	143.75 (140.54–147.30)	145.48 (142.19–147.85)	145.77 (143.28–149.00)
<b>NeS-SD</b>	10.44 (9.68–10.64)	10.35 (9.85–11.03)	10.56 (9.89–11.17)	10.34 (9.74–11.15)
<b>MoV</b>	159.95 ± 4.91	159.84 ± 5.36	160.24 ± 4.91	159.42 ± 4.62
<b>MoV-SD</b>	16.69 ± 1.32	17.19 ± 1.39	17.66 ± 1.79	17.25 ± 1.40
<b>MoC</b>	124.74 ± 2.31	125.46 ± 3.21	125.26 ± 3.14	125.69 ± 3.19
<b>MoC-SD</b>	4.28 (3.98–4.53)	4.29 (4.16–4.36)	4.43 (4.17–4.60)	4.38 (4.12–4.61)
<b>MoS</b>	88.71 (85.65–90.98)	88.90 (83.00–92.45)	88.65 (85.17–91.11)	87.73 (85.76–89.62)
<b>MoS-SD</b>	10.23 ± 0.91	10.27 ± 1.11	10.35 ± 0.96	10.55 ± 0.67

Statistički značajne razlike: \*Grupa 1 vs Grupa 2, Grupa 1 vs Grupa 3, Grupa 1 vs Grupa 4,  $P < 0.05$ .

Od CPD parametara, razlika je postojala jedino prema NeC-SD ( $\chi^2 = 10.701$ ,  $P = 0.01$ ). Pacijenti sa normalnom funkcijom bubrega i bez deficita kobalamina imali su značajno niže vrednosti ovog parametra u odnosu na ostale pacijente sa neadekvatnim statusom vitamina B12, bez obzira na funkciju bubrega.

**Tabela 28. Rezultati Kruskal–Wallis testa za NeC-SD**

	Grupe	z	P	r
NeC-SD	1 vs 2	2.763	0.03	0.44
	1 vs 3	2.826	0.03	0.34
	1 vs 4	3.040	0.01	0.36

Mogućnost parametra NeC-SD da razdvoji pacijente koji imaju neadekvatan status kobalamina (Grupe 2, 3 i 4) od pacijenata bez deficita kobalamina (Grupa 1) testirana je ROC analizom. Rezultati su prikazani u Tabeli 29.

**Tabela 29. Rezultati ROC analize za NeC-SD u klasifikaciji pacijenata prema koncentracijama vitamina B12 i MMA**

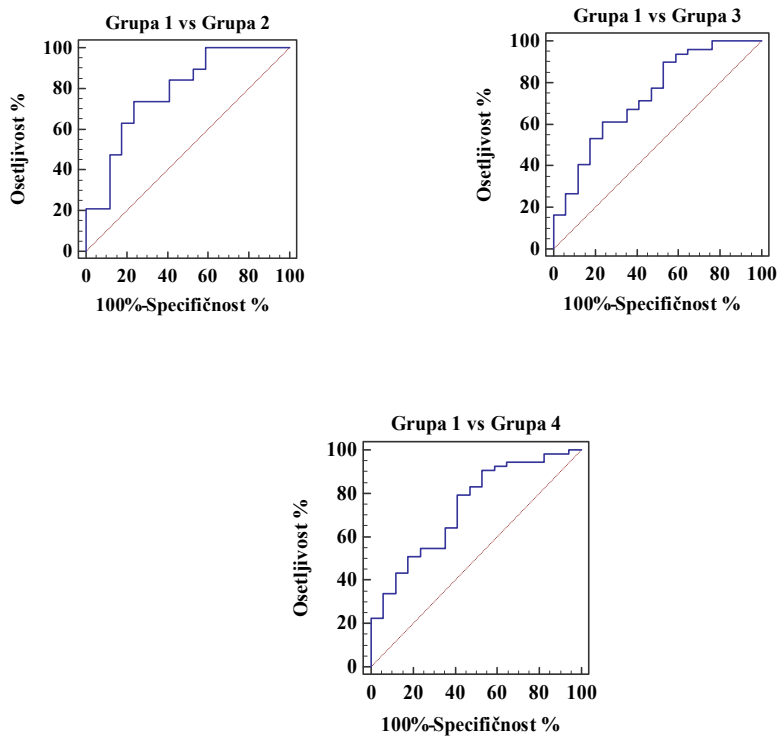
NeC-SD	AUC	Standardna greška	P	95% IP
Grupa 1 vs Grupa 2	0.783	0.078	< 0.001	0.615–0.903
Grupa 1 vs Grupa 3	0.736	0.072	0.001	0.613–0.837
Grupa 1 vs Grupa 4	0.735	0.069	0.001	0.616–0.833

Za sva poređenja dobijena je dobra dijagnostička osetljivost. Parametar NeC-SD je mogao da prepozna neadekvatan status kobalamina bilo da je definisan izolovano smanjenim koncentracijama vitamina B12 ili povećanim vrednostima MMA. Površine ispod krivih nisu se statistički značajno razlikovale (Tabela 30).

**Tabela 30. Poređenje površina ispod ROC krivih za NeC-SD**

	z	Standardna greška	P
$AUC_{\text{Grupa 1 vs Grupa 2}} \text{ vs } AUC_{\text{Grupa 1 vs Grupa 3}}$	0.490	0.10	0.62
$AUC_{\text{Grupa 1 vs Grupa 2}} \text{ vs } AUC_{\text{Grupa 1 vs Grupa 4}}$	0.504	0.10	0.61
$AUC_{\text{Grupa 1 vs Grupa 3}} \text{ vs } AUC_{\text{Grupa 1 vs Grupa 4}}$	0.011	0.09	0.99

ROC krive za NeC-SD u klasifikaciji pacijenata sa neadekvatnim statusom vitamina B12 prikazane su na Slici 33:



**Slika 33. ROC krive za NeC-SD u klasifikaciji pacijenata sa neadekvatnim statusom kobalamina prema vitaminu B12 i metilmalonskoj kiselini**

Optimalna granična vrednost i njene dijagnostičke karakteristike prikazane su u Tabeli 31.

**Tabela 31. Dijagnostička tačnost granične vrednosti za NeC-SD u klasifikaciji pacijenata prema koncentraciji vitamina B12 i MMA**

	Grupa 1 vs Grupa 2	Grupa 1 vs Grupa 3	Grupa 1 vs Grupa 4
<b>Granična vrednost</b>	5.0	5.0	5.0
<b>Osetljivost % (95% IP)</b>	79 (54.4–93.9)	71.4 (56.7–83.4)	75.5 (61.7–86.2)
<b>Specifičnost % (95% IP)</b>	58.8 (32.9–81.6)	58.8 (32.9–81.6)	58.8 (32.9–81.6)
<b>PPV % (95% IP)</b>	68.2 (45.1–86.1)	83.3 (68.6–93.0)	85.1 (71.7–93.8)
<b>NPV % (95% IP)</b>	71.4 (41.9–91.6)	41.7 (22.1–63.4)	43.5 (23.2–65.5)
<b>Količnik verovatnoće (95% IP)</b>	7.6 (1.6–36.5)	3.6 (1.1–11.3)	4.9 (1.5–15.6)

U odsustvu smanjene funkcije bubrega, pacijent sa izolovano niskim koncentracijama kobalamina imao je 7.6 puta veću verovatnoću da ima NeC-SD > 5.0 u poređenju sa pacijentom bez deficita vitamina B12. Pacijent sa povećanom MMA i normalnom funkcijom bubrega imao je 3.6 puta, a pacijent sa povećanom MMA i smanjenom funkcijom bubrega 4.9 puta veću verovatnoću da ima NeC-SD > 5.0 u odnosu na pacijenta bez deficita vitamina i normalnom funkcijom bubrega.

#### **4.4.3. Povezanost morfometrijskih karakteristika neutrofila i monocita sa anemijom i deficitom gvožđa**

Povezanost anemije i deficita gvožđa sa morfometrijskim karakteristikama neutrofila i monocita ispitana je u grupi od 208 pacijenata. Iz analize su isključeni pacijenti sa feritinom > 150 µg/L za žene i feritinom > 200 µg/L za muškarce zbog povećanog rizika od opterećenja gvožđem (324, 326), kao i pacijenti sa folatom < 10 nmol/L.

Pacijenti su podeljeni u 4 podgrupe prema statusu gvožđa i koncentraciji vitamina B12:

- Grupa 1 – 82 pacijenta sa feritinom  $\geq 15 \mu\text{g/L}$ , saturacijom transferina  $\geq 16\%$  i koncentracijom vitamina B12  $\geq 150 \text{ pmol/L}$
- Grupa 2 – 32 pacijenta sa feritinom  $\geq 15 \mu\text{g/L}$ , saturacijom transferina  $\geq 16\%$  i koncentracijom vitamina B12  $< 150 \text{ pmol/L}$
- Grupa 3 – 55 pacijenata sa feritinom  $< 15 \mu\text{g/L}$  i/ili saturacijom transferina  $< 16\%$  i koncentracijom vitamina B12  $\geq 150 \text{ pmol/L}$
- Grupa 4 – 39 pacijenata sa feritinom  $< 15 \mu\text{g/L}$  i/ili saturacijom transferina  $< 16\%$  i koncentracijom vitamina B12  $< 150 \text{ pmol/L}$ .

Deficit gvožđa su imali pacijenti sa feritinom  $< 15 \mu\text{g/L}$  i/ili saturacijom transferina  $< 16\%$  (324, 326), a deficit vitamina B12 pacijenti sa kobalaminom  $< 150 \text{ pmol/L}$  (85). Grupu 1 su činili pacijenti bez deficita gvožđa i bez deficita vitamina B12. U Grupi 2 su bili pacijenti sa izolovanim deficitom kobalamina, a u Grupi 3 sa izolovanim deficitom gvožđa. Grupa 4 je obuhvatila pacijente sa kombinovanim deficitom gvožđa i vitamina B12. Opšte karakteristike pacijenata sa hematološkim i biohemijskim parametrima prikazane su u Tabeli 32.

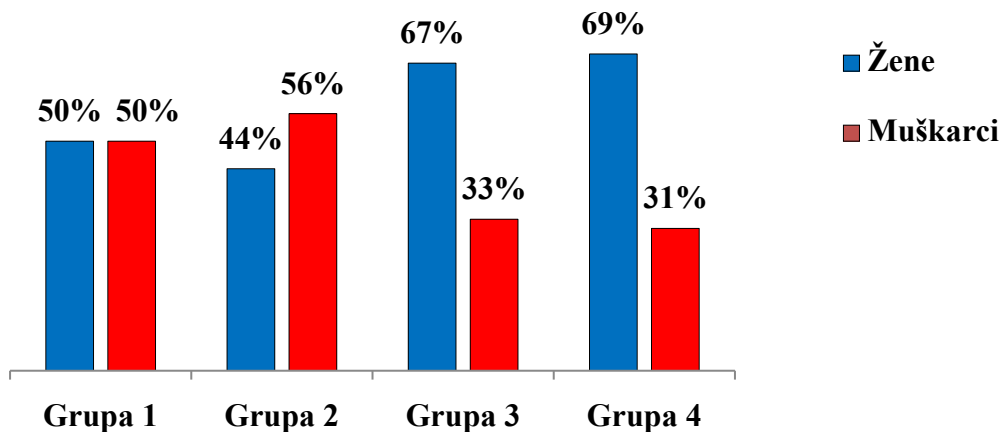
**Tabela 32. Opšte karakteristike pacijenata sa hematološkim i biohemijskim parametrima u grupama sa različitim koncentracijama vitamina B12 i statusom gvožđa**

Parametri	Grupa 1 (N = 82)	Grupa 2 (N = 32)	Grupa 3 (N = 55)	Grupa 4 (N = 39)
Pol (ž/m)	41 / 41	14 / 18	37 / 18	27 / 12
Starost (godine)	61.00 (48.00–69.00)	64.00 (57.00–71.25)	49.00* (36.00–64.00)	58.50 (40.50–72.50)
WBC (x 10 <sup>9</sup> /L)	6.74 ± 1.70	6.74 ± 1.36	6.43 ± 1.48	6.52 ± 1.70
Ne (x 10 <sup>9</sup> /L)	4.00 (3.00–5.00)	3.97 (3.00–5.05)	3.98 (3.00–5.10)	3.99 (3.10–4.99)
Mo (x 10 <sup>9</sup> /L)	1.00 (0.10–1.20)	0.98 (0.10–1.10)	1.00 (0.10–1.10)	0.99 (0.10–1.20)
Hb (g/L)	128.25 (118.60–136.53)	130.25 (119.83–138.40)	119.50 (115.00–127.60)	119.20 (110.80–126.00)
MCV (fL)	94.08 (90.73–96.01)	91.69 (87.89–94.97)	90.47 (87.07–93.21)	89.78 (86.06–92.49)
Hct (L/L)	0.38 (0.35–0.41)	0.39 (0.37–0.42)	0.36 (0.34–0.38)	0.36 (0.34–0.38)
RDW (%)	13.69 (13.12–14.38)	13.78 (13.32–14.72)	14.35* (13.58–15.70)	14.89*** (13.90–15.79)
Vit B12 (pmol/L)	228.41 (170.11–309.04)	122.51 (103.14–135.42)	239.85 (183.76–294.46)	122.51 (90.77–133.58)
Folat (nmol/L)	16.79 (13.51–22.82)	18.28 (13.66–21.82)	17.29 (14.32–23.05)	15.86 (13.01–20.26)
Hcy (μmol/L)	14.89 (10.97–19.18)	16.88 (12.92–23.14)	13.52* (9.73–15.95)	12.78 (10.91–17.78)
Kreatinin (μmol/L)	83.50 (66.00–132.50)	82.50 (73.00–127.25)	74.00 (63.00–110.00)	70.00 (58.00–86.00)
CRP (mg/L)	1.45 (0.88–2.93)	1.95 (0.98–2.90)	1.60 (0.90–3.10)	1.10 (0.70–4.20)
sTfR (mg/L)	1.31 (1.12–1.56)	1.38 (1.12–1.73)	1.79** (1.45–2.37)	1.95*** (1.53–2.50)
SAT (%)	27.63 (22.18–33.22)	25.87 (20.58–29.12)	11.12 (8.83–14.42)	13.76 (9.75–15.72)
Feritin (μg/L)	58.70 (36.03–90.98)	71.85 (44.08–107.25)	13.00 (8.00–32.80)	13.70 (8.50–27.40)

Statistički značajne razlike: \*Grupa 3 vs Grupa 2, P < 0.05; \*\*Grupa 3 vs Grupa 1, Grupa 3 vs Grupa 2, P < 0.005; \*\*\*Grupa 4 vs Grupa 1, Grupa 4 vs Grupa 2, P < 0.05, ♦Grupa 3 vs Grupa 1, P < 0.05.

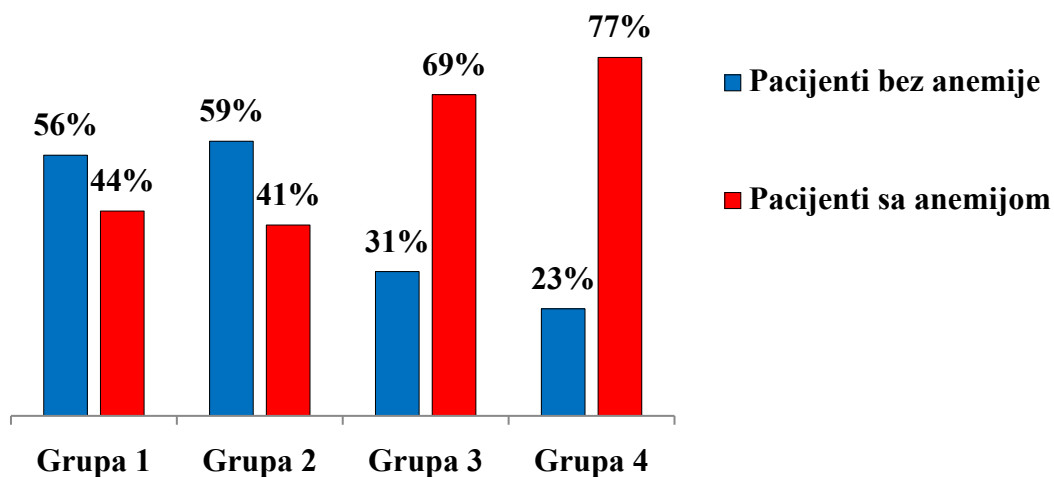


Zastupljenost polova se razlikovala između grupa ( $\chi^2 = 8.687$ ,  $P = 0.03$ , Cramerov  $V = 0.20$ ). U grupama sa deficitom gvožđa (Grupe 3 i 4) statistički je značajno više bio zastupljen ženski pol.



Slika 34. Zastupljenost muškaraca i žena u Grupama 1, 2, 3 i 4

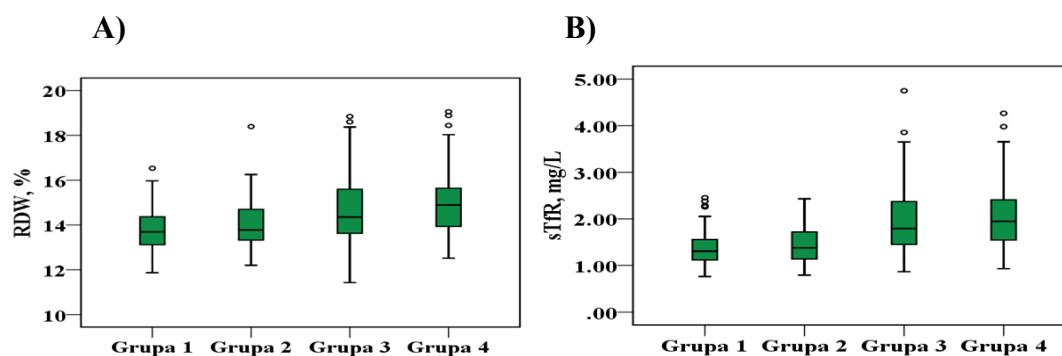
Broj anemičnih pacijenata statistički je značajno više bio zastupljen u grupama sa deficitom gvožđa ( $\chi^2 = 18.713$ ,  $P < 0.001$ , Cramerov  $V = 0.30$ ), dok se zastupljenost smanjene funkcije bubrega nije razlikovala između grupa ( $\chi^2 = 2.499$ ,  $P = 0.48$ ).



Slika 35. Zastupljenost pacijenata sa anemijom i bez nje u Grupama 1, 2, 3 i 4

Grupe su se razlikovale prema starosti ( $\chi^2 = 10.246$ ,  $P = 0.02$ ) i prema Hcy ( $\chi^2 = 8.948$ ,  $P = 0.03$ ). Pacijenti sa izolovanim deficitom kobalamina bili su statistički značajno stariji ( $|z| = 2.972$ ,  $P = 0.02$ ,  $r = 0.32$ ) i imali su statistički značajno više koncentracije Hcy ( $|z| = 2.862$ ,  $P = 0.03$ ,  $r = 0.31$ ) od pacijenata sa izolovanim deficitom gvožđa.

Grupe se nisu razlikovale prema broju leukocita ( $F = 0.570$ ,  $P = 0.64$ ), kao ni prema broju neutrofila ( $\chi^2 = 0.180$ ,  $P = 0.98$ ) i monocita ( $\chi^2 = 1.707$ ,  $P = 0.64$ ). Koncentracije hemoglobina i hematokrita nisu upoređene zbog razlika prema zastupljenosti muškaraca i žena. Razlike su postojale prema RDW ( $\chi^2 = 21.319$ ,  $P < 0.001$ ) i sTfR ( $\chi^2 = 51.475$ ,  $P < 0.001$ ).



Slika 36. Distribucija vrednosti A) RDW i B) sTfR u Grupama 1, 2, 3 i 4

Pacijenti sa deficitom gvožđa (Grupe 3 i 4), bez obzira na status vitamina B12, imali su statistički značajno više vrednosti sTfR u odnosu na pacijente bez deficita gvožđa (Grupe 1 i 2). Vrednosti RDW su bile statistički značajno više kod pacijenata sa kombinovanim deficitom gvožđa i kobalamina u odnosu na pacijente bez deficita gvožđa i značajno više kod pacijenata sa izolovanim deficitom gvožđa u odnosu na pacijente bez deficita gvožđa i vitamina B12. Pacijenti sa izolovanim deficitom gvožđa i izolovanim deficitom kobalamina nisu se razlikovali prema RDW. Rezultati poređenja prema RDW i sTfR su prikazani u Tabeli 33.

**Tabela 33. Statistički značajne razlike prema RDW i sTfR između Grupa 1, 2, 3 i 4**

Parametar	Grupe	z	P	r
RDW	4 vs 1	4.072	< 0.001	0.37
	4 vs 2	2.680	0.04	0.32
	3 vs 1	3.249	0.007	0.28
sTfR	4 vs 1	5.837	< 0.001	0.53
	4 vs 2	4.173	< 0.001	0.50
	3 vs 1	5.449	< 0.001	0.47
	3 vs 2	3.642	0.002	0.39

U Tabeli 34 su prikazani CPD parametri neutrofila i monocita u Grupama 1, 2, 3 i 4.

**Tabela 34. Morfometrijski parametri neutrofila i monocita u grupama sa različitim koncentracijama vitamina B12 i statusom gvožđa**

Parametar	Grupa 1 (N = 82)	Grupa 2 (N = 32)	Grupa 3 (N = 55)	Grupa 4 (N = 39)
NeV	138.88 (135.29–142.26)	140.94 (137.78–143.63)	139.22 (136.42–142.35)	138.53 (133.89–141.68)
NeV-SD	19.40 (18.44–20.33)	20.09 (19.15–21.16)	19.24 (18.10–20.50)	19.62 (18.69–20.60)
NeC	149.07 (147.03–151.64)	149.84 (147.16–151.39)	150.61 (147.22–152.18)	149.90 (145.91–152.00)
NeC-SD	5.00 (4.76–5.21)	5.25* (5.05–5.84)	4.95 (4.66–5.12)	5.40** (4.86–5.83)
NeS	145.92 ± 4.11	145.03 ± 3.92	147.44 ± 3.77♦	145.30 ± 4.45
NeS-SD	10.54 (9.83–10.84)	10.40 (9.68–11.26)	9.95*** (9.56–10.31)	10.46 (9.92–11.19)
MoV	159.44 ± 4.49	160.02 ± 6.04	160.59 ± 5.05	158.68 ± 5.80
MoV-SD	17.11 (16.21–17.81)	17.73 (16.29–18.68)	17.14 (16.46–18.02)	17.82 (16.38–19.11)
MoC	125.60 (123.79–128.43)	125.71 (123.14–127.78)	126.34 (123.53–128.50)	125.43 (122.90–127.57)
MoC-SD	4.30 (4.08–4.53)	4.40 (4.19–4.59)	4.43 (4.18–4.80)	4.37 (4.16–4.79)
MoS	88.48 (85.47–90.23)	87.88 (85.09–90.18)	89.03 (87.51–90.44)	89.18 (85.47–92.04)
MoS-SD	10.51 ± 0.85	10.39 ± 0.89	10.46 ± 0.93	10.55 ± 1.04

Statistički značajne razlike: \*Grupa 2 vs Grupa 1, Grupa 2 vs Grupa 3,  $P < 0.05$ ; \*\*Grupa 4 vs Grupa 1, Grupa 4 vs Grupa 3,  $P < 0.05$ ; \*\*\*Grupa 3 vs Grupa 1, Grupa 3 vs Grupa 2, Grupa 3 vs Grupa 4,  $P < 0.05$ ; ♦Grupa 3 vs Grupa 2,  $P < 0.05$ .

Grupe su se razlikovale prema sledećim CPD parametrima: NeS-SD ( $\chi^2 = 17.198, P = 0.001$ ), NeC-SD ( $\chi^2 = 32.643, P < 0.001$ ) i NeS ( $F = 3.538, P = 0.02$ ).

Pacijenti sa izolovanim deficitom gvožđa imali su statistički značajno više vrednosti NeS u odnosu na pacijente sa izolovanim deficitom vitamina B12 ( $P = 0.03$ ). Ostale grupe se nisu razlikovale.

Vrednosti NeC-SD bile su statistički značajno više kod pacijenata sa deficitom vitamina B12 u odnosu na pacijente bez deficita vitamina B12, bez obzira na status gvožđa. Parametar NeS-SD je bio statistički značajno niži kod pacijenata sa izolovanim deficitom gvožđa u odnosu na ostale pacijente (Tabela 35).

**Tabela 35. Statistički značajni rezultati poređenja CPD parametara između Grupa 1, 2, 3 i 4**

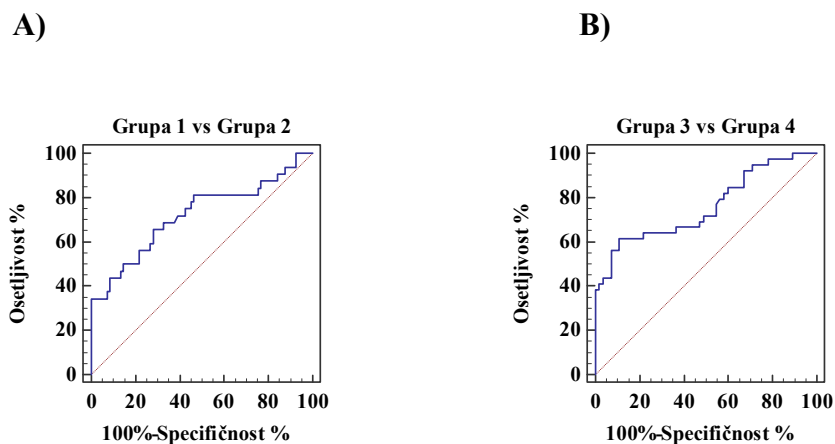
Parametar	Grupe	z	P	r
NeS-SD	3 vs 1	3.739	0.001	0.32
	3 vs 2	2.784	0.03	0.30
	3 vs 4	3.227	0.007	0.33
NeC-SD	2 vs 1	3.477	0.003	0.32
	2 vs 3	4.116	< 0.001	0.44
	4 vs 1	3.901	0.001	0.35
	4 vs 3	4.534	< 0.001	0.47

Mogućnost NeC-SD da razdvoji pacijente sa deficitom vitamina B12 posebno je testirana kod pacijenata bez deficita i sa deficitom gvožđa.

**Tabela 36. Rezultati ROC analize za NeC-SD**

NeC-SD	AUC	Standardna greška	P	95% IP
Grupa 1 vs Grupa 2	0.720	0.059	< 0.001	0.629–0.800
Grupa 3 vs Grupa 4	0.759	0.053	< 0.001	0.660–0.841

Parametar NeC-SD je imao dobru dijagnostičku osetljivost u prepoznavanju pacijenata sa niskim koncentracijama vitamina B12 i u prisustvu i u odsustvu deficita gvožđa. Površine ispod krivih statistički se nisu značajno razlikovale ( $|z| = 0.508$ , standardna greška = 0.077,  $P = 0.61$ ). ROC krive za NeC-SD su prikazane na Slici 37.



**Slika 37. ROC krive za NeC-SD u klasifikaciji pacijenata prema koncentraciji vitamina B12 A) u odsustvu deficita gvožđa i B) u prisustvu deficita gvožđa**

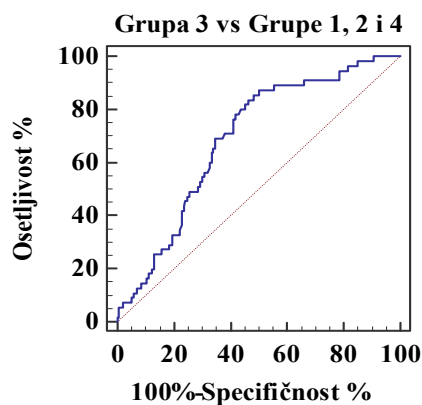
Optimalna granična vrednost za NeC-SD iznosila je 5.2. Njene dijagnostičke karakteristike su prikazane u Tabeli 37.

**Tabela 37. Dijagnostička tačnost granične vrednosti za NeC-SD u zavisnosti od statusa gvožđa**

NeC-SD	Pacijenti bez deficita gvožđa	Pacijenti sa deficitom gvožđa
<b>Granična vrednost</b>	5.2	5.2
<b>Osetljivost (%)</b> (95% IP)	56.3 (37.7–73.6)	61.5 (44.6–76.6)
<b>Specifičnost (%)</b> (95% IP)	73.2 (62.2–82.4)	78.2 (65.0–88.2)
<b>PPV (%)</b> (95% IP)	45.0 (29.3–61.5)	66.7 (49.0–81.4)
<b>NPV (%)</b> (95% IP)	81.1 (70.3–89.3)	74.1 (61.0–84.7)
<b>Količnik verovatnoće</b> (95% IP)	4.0 (1.7– 9.4)	6.4 (2.6–16.0)

U odsustvu deficita gvožđa, pacijent sa deficitom kobalamina imao je 4 puta veću verovatnoću za NeC-SD > 5.2 u odnosu na pacijenta bez deficita kobalamina. U prisustvu deficita gvožđa pacijent sa kombinovanim deficitom kobalamina i gvožđa imao je 6.4 puta veću verovatnoću za NeC-SD > 5.2 u odnosu na pacijenta sa izolovanim deficitom gvožđa.

Ispitana je i mogućnost parametra NeS-SD da klasifikuje pacijente sa izolovanim deficitom gvožđa u odnosu na ostale pacijente. Dobijena je površina ispod krive sa zadovoljavajućom dijagnostičkom osetljivošću (AUC = 0.688, 95% IP 0.621–0.751, standardna greška = 0.039, P < 0.001). ROC kriva je prikazana na Slici 38.



**Slika 38. ROC kriva za NeS-SD u klasifikaciji pacijenata sa izolovanim deficitom gvožđa**

Optimalna granična vrednost za NeS-SD bila je 10.4. Njene dijagnostičke karakteristike prikazane su u Tabeli 38.

**Tabela 38. Dijagnostička tačnost granične vrednosti za NeS-SD u klasifikaciji pacijenata sa izolovanim deficitom gvožđa**

NeS-SD	
<b>Granična vrednost</b>	10.4
<b>Osetljivost % (95% IP)</b>	80.0 (67.0–89.6)
<b>Specifičnost % (95%IP)</b>	54.9 (46.7–62.9)
<b>PPV % (95% IP)</b>	38.9 (29.9–48.6)
<b>NPV % (95% IP)</b>	88.4 (80.2–94.1)
<b>Količnik verovatnoće (95% IP)</b>	5.0 (2.4–10.4)

Pacijent sa izolovanim deficitom gvožđa je imao 5 puta veću verovatnoću za NeS-SD < 10.4 u odnosu na pacijenta bez deficita gvožđa ili sa kombinovanim deficitom gvožđa i vitamina B12.



## 5. Diskusija

Vitamin B12 je neophodan za pravilan rast, razvoj i funkcionisanje ljudskog organizma. Njegov nedostatak ima negativne posledice po zdravlje u vidu hematoloških i neuroloških simptoma i znakova deficita. U određenim slučajevima ispitivanje deficita vitamina B12 otežavaju nedostaci u kliničkoj i laboratorijskoj dijagnostici.

Dugo se deficit kobalamina posmatrao isključivo kroz prisustvo makrocitne anemije (80). Međutim, hematološke manifestacije ne moraju uvek biti prisutne, tj. 25% pacijenata sa deficitom ima samo neurološke simptome (80).

U okviru laboratorijskog ispitivanja deficita kobalamina postoje određeni nedostaci poput nepostojanje zlatnog standarda (134), nedostatka referentnih metoda za određivanje biomarkera (65, 248), različite granične vrednosti za deficit (98), lažno normalni rezultati (98), uticaj drugih faktora na koncentraciju biomarkera (98).

Jasna klinička slika pruža određeni vid zlatnog standarda u odnosu na koji se interpretiraju laboratorijski rezultati. U takvim slučajevima uticaj nedostataka u laboratorijskoj dijagnostici deficita nije veliki, jer će pacijent dobiti terapiju bez obzira na laboratorijske rezultate (134). Problem nastaje kada je klinička slika nejasna, što nije retkost (134). Zato su potrebna istraživanja koja utvrđuju međusobnu povezanost biomarkera statusa vitamina B12, odnosno njihovih koncentracija.

Sa otkrićem subkliničkog deficita kobalamina problemi u vezi sa dijagnostikom deficita vitamina B12 dodatno se produbljuju (98). Njegova prevalenca je značajno viša od prevalencije klinički manifestnog oblika (248). Upravo zbog visoke prevalencije, kao i nedovoljnog saznanja o tome kako nastaje, pod kojim uslovima progredira u klinički oblik i da li je povezan sa neurološkim simptomima, privlači pažnju istraživača (98).

Rizične grupe za pojavu deficita kobalamina obuhvataju starije osobe zbog visoke prevalencije malapsorpcije kobalamina iz hrane izazvane atrofičnim gastritisom, kao i zbog rastuće prevalencije perniciozne anemije sa godinama starosti (101). U rizične grupe spadaju i osobe sa gastrointestinalnim bolestima (178, 311). Međutim, ne postoji usaglašen stav oko skrininga osoba sa rizikom ukoliko nemaju neki od simptoma koji upućuje na deficit kobalamina (101, 311).

U prikazanoj studiji, koja je organizovana kao studija preseka, imali smo za cilj da ispitamo biohemijski status vitamina B12 i međusobni odnos biomarkera kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12 (osobe starije od 60 godina ili osobe sa gastrointestinalnim oboljenjima). Takođe, ispitivali smo povezanost morfometrijskih parametara neutrofila i monocita sa biomarkerima statusa vitamina B12 i folata, kao i uticaj anemije, deficita gvožđa i funkcije bubrega. Uticaj inflamacije nije ispitivan jer su prethodna istraživanja potvrdila njen uticaj na CPD parametre neutrofila i monocita (142–150).

Svi ispitanici uključeni u istraživanje imali su normalan MCV (80–100 fL). Nisu koristili suplemente koji sadrže vitamine B grupe i gvožđe najmanje 3 meseca pre vađenja krvi i nisu imali prethodno postavljenu dijagnozu deficita vitamina B12 i folata ili hematološkog oboljenja. Podaci o neurološkim simptomima nisu detektovani. U ispitivanju statusa vitamina B12 i folata korišćeni su sledeći parametri: serumski kobalamin, folat, folat u eritrocitima, homocistein i metilmalonska kiselina. Istovremeno je ispitanicima određen i status gvožđa (feritin, saturacija transferina gvožđem, solubilni transferinski receptori), CRP i eGFR. U sklopu krvne slike dobijeni su standardni hematološki, kao i CPD parametri. Zbog mogućeg uticaja na CPD parametre, pacijenti koji su imali povećan CRP ili su koristili imunosupresive ili imunostimulatornu terapiju nisu uključeni u istraživanje. Takođe, nisu uključeni pacijenti čiji su rezultati krvne slike bili obeleženi alarmima o prisustvu blasta, atipičnih limfocita i nezrelih neutrofila.

## 5.1. Biomarkeri statusa vitamina B12 i uticaj drugih faktora

Status vitamina B12 predstavljaju koncentracije biomarkera: kobalamina, Hcy i MMA. Neadekvatan status označava njihovo odstupanje od graničnih vrednosti, što bi u odsustvu kliničke slike predstavljalo subklinički deficit kobalamina (87).

Više od polovine pacijenata sa rizikom za deficit kobalamina i normalnim MCV, tj. 61% imalo je neadekvatan status vitamina B12 na osnovu koncentracije kobalamina u serumu. Koncentracije kobalamina koje ukazuju na deficit ( $< 150$  pmol/L) (85) imala su 33% ispitanika, a 28% ispitanika je imalo iscrpljene rezerve vitamina B12 (150–221 pmol/L) (309). Dobijene podatke nije jednostavno uporediti sa rezultatima drugih studija, jer do sada nije bilo istraživanja na populaciji sa rizikom za deficit kobalamina gde su svi ispitanici imali normalan MCV (80–100 fL). Dodatni problem koji otežava poređenje rezultata svih studija koje se bave deficitom kobalamina jeste sam kriterijum za deficit, tj. koji biomarker i koja koncentracija su uzeti za procenu deficta (43, 182, 301). Epidemiološki podaci ukazuju da je prevalenca deficta kobalamina u razvijenim zemljama od 2% do 20% (43). Ako se posmatra samo koncentracija kobalamina kao kriterijum za deficit, rezultati se razlikuju u zavisnosti gde je vršeno istraživanje i u kojoj populaciji (84). U prikazanoj tezi prevalenca za koncentracije kobalamina  $< 150$  pmol/L i 150–221 pmol/L veća je u poređenju sa studijama u Evropi i Severnoj Americi (84), ali je i populacija na kojoj je vršeno istraživanje opterećena rizikom za deficit vitamina B12.

Dosadašnja istraživanja koja su se bavila razlikama u nivou kobalamina između muškaraca i žena imaju oprečne rezultate. Određene studije ukazuju da muškarci imaju značajno niži nivo kobalamina (173–175), da su podložni defictu (174) i da bi genetska varijabilnost mogla biti uzrok (174). Prema rezultatima istraživanja Carmel i saradnika (176), nije utvrđena razlika u koncentracijama kobalamina između polova. McMahon i saradnici su uporedili zastupljenost polova u opsegu vrednosti kobalamina 37–1247 pmol/L, koji je podeljen na kvartile. Rezultat poređenja je pokazao da se zastupljenost muškaraca i žena nije razlikovala između grupa sa različitim opsegom kobalamina (177). Rezultati prikazane teze su, takođe, pokazali da se žene i muškarci ne razlikuju prema zastupljenosti različitih nivoa vitamina B12 (Slika 13). Svetska zdravstvena

organizacija ne razdvaja muški i ženski pol kada je u pitanju nivo kobalamina, već se koncentracija vitamina B12 < 150 pmol/L navodi kao vrednost koja ukazuje na deficit kod oba pola (85).

Kod starosti, kao i kod pola, postoje oprečni rezultati o povezanosti sa vitaminom B12. Prema jednoj grupi istraživača, kod starijih osoba niske i subnormalne koncentracije kobalamina češće su u odnosu na mlađe ispitanike (88, 115, 178). Međutim, prema istraživanju McMahon i saradnika (177), nije bilo razlika prema starosti između 4 opsega koncentracija kobalamina (37–226 pmol/L, 227–290 pmol/L, 291–370 pmol/L i 371–1247 pmol/L). U našoj istraživačkoj populaciji starost pacijenata nije korelirala sa koncentracijama kobalamina u serumu (Tabela 8). Muškarci, koji su bili statistički značajno stariji od žena, nisu imali veću zastupljenost niskih koncentracija i iscrpljenih rezervi vitamina B12. Moguć razlog dobijanja ovakvih rezultata jeste postojanje rizika za deficit vitamina B12 i kod starijih i kod mlađih od 60 godina.

Visoke koncentracije kobalamina u krvi (> 664 pmol/L ili > 900 ng/mL) se, pored egzogenog unošenja, mogu javiti i zbog smanjene funkcije bubrega (190). Poznato je da bubrezi učestvuju u metabolizmu vitamina B12, ali se o samom mehanizmu njihovog delovanja još uvek nedovoljno zna (190, 327). Pod normalnim uslovima kada se kobalamin unosi hranom, glomeruli filtriraju vitamin B12, ali se on minimalno ekskretuje zbog mehanizma reapsorpcije u proksimalnim tubulima (177). Ako se pacijentu daju velike količine kobalamina, višak će se pojaviti u urinu u prisustvu normalne bubrežne funkcije, jer je mehanizam reapsorpcije podložan zasićenju (177). Iz prikazanog istraživanja isključeni su pacijenti sa vrednostima kobalamina iznad gornje granice referentnog opsega, pre svega zbog moguće upotrebe suplemenata koje nisu prijavili u upitniku. Samim tim nismo ispitivali vezu između funkcije bubrega i visokih koncentracija vitamina B12. Kada su u pitanju niske i koncentracije u referentnom opsegu nije uočena korelacija sa kreatininom (Tabela 8) niti razlika u zastupljenosti različitih nivoa kobalamina između pacijenata sa normalnom i smanjenom bubrežnom funkcijom (Slika 14B).

Više statističkih testova pokazalo odsustvo je povezanosti anemije i koncentracije kobalamina u serumu. Korelaciona analiza nije utvrdila vezu između koncentracije vitamina B12 i hemoglobina (Tabela 8). Zastupljenost različitih nivoa kobalamina nije se razlikovala između anemičnih pacijenata i pacijenata bez anemije (Slika 14A). Takođe, binarna logistička regresiona analiza pokazala je da kobalamin, kao i folat, nisu značajni prediktori prisustva anemije (Tabela 14). Druge studije takođe navode podatke da niska koncentracija kobalamina, kao i potvrđeni deficit vitamina B12, ne znači da će pacijent imati anemiju (82, 124). U populaciji starijih osoba Björkegren i Svärdsudd (175) nisu ustanovili značajnu korelaciju kobalamina, folata, MMA i Hcy sa hemoglobinom.

Koncentracija vitamina B12 nije bila u korelaciji sa koncentracijom folata (Tabela 9). Zastupljenost niskih koncentracija folata iznosila je 14%. Određivanje serumske koncentracije folata u cilju ispitivanja statusa folata ima ograničen značaj kada je istovremeno prisutan i deficit kobalamina (134, 199). Usled deficita vitamina B12, dolazi do nagomilavanja folata koji se ne troši u metaboličkim putevima, jer u ćelijama nedostaje kofaktor kobalamin. Tada je moguće dobiti normalne koncentracije folata iako postoji deficit (199). Ne može se isključiti da i u prikazanoj studiji nije bilo takvih slučajeva, odnosno da su ispitanici imali normalne vrednosti folata zbog niskih koncentracija vitamina B12.

Homocistein je metabolički marker deficita vitamina B12 i folata (65). Kao i metilmalonsku kiselinu, značajno ga je odrediti u slučajevima kada koncentracije kobalamina nisu u skladu sa kliničkom slikom pacijenta (111, 134, 166). Međutim, njegova koncentracija u krvi je pod uticajem i drugih faktora poput pola, starosti, funkcije bubrega, deficita vitamina B6, tiroidne funkcije (65, 84, 307). Zbog toga se ne preporučuje korišćenje Hcy u epidemiološkim studijama za ispitivanje prevalencije deficita vitamina B12 (248).

Koncentracije Hcy  $\geq 15$   $\mu\text{mol/L}$ , koje ukazuju na deficit kobalamina (84), bile su prisutne kod 46% ispitanika u prikazanoj studiji. Međutim, između povećanih koncentracija Hcy i niskih koncentracija kobalamina i folata nije bilo povezanosti. Starost i kreatinin su pokazali veći uticaj na vrednosti Hcy od kobalamina i folata. Ovi parametri su bili u jakoj pozitivnoj korelaciji sa Hcy i tek nakon korekcije njihovog

uticaja pojavila se slaba negativna korelacija sa kobalaminom i folatom. Višestruka regresiona analiza istakla je kreatinin kao najznačajniji prediktor vrednosti Hcy (Tabela 11). Između polova je postojala razlika prema zastupljenosti različitih nivoa Hcy (Slika 18), jer su muškarci bili značajno stariji od žena i imali veću zastupljenost smanjene funkcije bubrega (Slika 11B).

Rezultati prikazane teze potvrđuju već dokumentovan uticaj starosti i funkcije bubrega na Hcy (65, 84, 240) i ukazuju da Hcy kod pacijenata koji imaju rizik za deficit vitamina B12, ali nemaju kliničku sliku, nije pouzdan pokazatelj statusa vitamina B12.

Analiza MMA je urađena za deo istraživačke populacije, tj. za 177 pacijenata koji su imali kobalamina  $< 300$  pmol/L i/ili Hcy  $> 8$   $\mu$ mol/L. Cilj ovakvog odabira pacijenata bio je da se obuhvate pacijenti koji imaju vrednosti kobalamina koje bi trebalo da odgovaraju povećanim vrednostima Hcy (307) ili pacijenti koji imaju vrednosti Hcy koje ukazuju da su rezerve kobalamina počele da se iscrpljuju (84). U ovoj grupi ispitanika analizirana je povezanost MMA sa kobalaminom i Hcy.

Za MMA kao biomarkera statusa vitamina B12 korišćena je granična vrednost od 210 nmol/L. Koncentracije MMA  $\leq 210$  nmol/L ukazuju na adekvatnu snabdevenost kobalaminom kod pacijenata sa normalnim vrednostima kreatinina u serumu (325). Prema dobijenim rezultatima, 68% pacijenata od 177 imalo je MMA  $> 210$  nmol/L. Za razliku od izostanka povezanosti niskih koncentracija kobalamina i folata sa povećanim koncentracijama Hcy, pacijenti sa vrednostima MMA  $> 210$  nmol/L imali su značajno veću zastupljenost kobalamina  $< 150$  pmol/L i Hcy  $\geq 15$   $\mu$ mol/L u odnosu na pacijente sa MMA  $\leq 210$  nmol/L (Slika 23).

Kao i u radu Vogiatzoglou i saradnika (250), ustanovili smo postojanje pozitivne korelacije između MMA i Hcy i negativne korelacije između MMA i kobalamina (Tabela 12). Korelaciona analiza je ukazala na postojanje povezanosti MMA sa kreatininom i starošću pacijenata, što potvrđuje rezultate drugih studija (240, 250). Za razliku od Hcy, na čije je vrednosti najviše uticala bubrežna funkcija, višestruka regresiona analiza je izdvojila kobalamin kao najznačajniji prediktor vrednosti MMA (Tabela 13). Lewerin i saradnici su, takođe, ukazali da bubrežna funkcija ima veći uticaj na koncentraciju Hcy u odnosu na MMA (240). Istraživanje Vogiatzoglou i saradnika

(250) navodi da pol, kreatinin, starost i vitamin B12 zajedno objašnjavaju 16% varijacije u koncentraciji MMA, dok je naš rezultat 25% varijacije. U prikazanoj tezi pol nije bio značajan prediktor vrednosti MMA, za razliku od istraživanja Vogiatzoglou i saradnika (250). Muškarci i žene se nisu razlikovali prema zastupljenosti različitih nivoa MMA, ali se nisu razlikovali ni prema zastupljenosti različitih nivoa kobalamina.

## **5.2. Povezanost anemije sa statusom vitamina B12 u odnosu na funkciju bubrega**

Makrocitna anemija u rezultatu krvne slike svakako je indikacija za određivanje nivoa kobalamina (80). Međutim, normalan MCV nije pouzdan pokazatelj odsustva deficita vitamina B12 (80, 124). Uzroci izostanka povećanja MCV se kod pacijenata sa deficitom kobalamina istražuju, a kao mogući razlozi navode se: istovremeno prisutan deficit gvožđa, talasemija, anemija hronične bolesti (50, 80, 123, 125), životni vek eritrocita i individualna vrednost pacijentovog MCV (80). Takođe, odsustvo anemije ne znači da pacijent nema deficit kobalamina. Publikovana istraživanja navode različite podatke o procentu pacijenata koji nisu bili anemični i/ili nisu imali makrocitozu u prisustvu deficita vitamina B12 (82, 124).

Uzorak pacijenata u prikazanoj tezi je bio heterogen u pogledu prisustva anemije (55%), smanjene funkcije bubrega (33%) i deficita gvožđa (43%). Takođe, zastupljenost smanjene funkcije bubrega bila je veća kod pacijenata sa anemijom. Ispitivanje uzroka anemije kod pacijenata sa smanjenom funkcijom bubrega zahteva više laboratorijskih analiza. Među njima su najznačajnije: krvna slika, vitamin B12, folat, koncentracija feritina, saturacija transferina gvožđem (328).

S obzirom na to da deficit gvožđa, kobalamina i folata, kao i smanjena funkcija bubrega, mogu biti uzročnici anemije, ispitana je njihova prediktivna vrednost. Dobijeni rezultati binarne logističke regresije pokazali su da koncentracije kobalamina i folata nisu značajni prediktori prisustva anemije, za razliku od deficita gvožđa i smanjene funkcije bubrega (Tabela 14). Između anemičnih pacijenata i pacijenata bez anemije nije bilo razlika prema zastupljenosti niskih koncentracija kobalamina (Slika 14A) i folata (Slike 16B). Takođe, pacijenti sa anemijom i pacijenti bez anemije nisu se razlikovali prema zastupljenosti niskih koncentracija kobalamina i folata kada je

funkcija bubrega bila normalna i kada je bila smanjena (Tabela 15). Zastupljenost povećanih vrednosti Hcy nije se razlikovala između pacijenata sa anemijom i bez nje kada su se pacijenti razdvojili prema funkciji bubrega (Tabela 15).

Za razliku od deficita kobalamina i folata, deficit gvožđa je bio značajno više zastupljen kod anemičnih pacijenata (Slika 26). Razlika u zastupljenosti deficita gvožđa između anemičnih pacijenata i pacijenata bez anemije zadržala se i kada su se pacijenti razdvojili prema funkciji bubrega (Tabela 15).

Prema dobijenim rezultatima, deficit gvožđa jeste povezan sa prisustvom anemije, ali ne i deficit vitamina B12 bez obzira na funkciju bubrega. To ne znači da deficit kobalamina ne može da dovode do anemije, već da može postojati i u njenom odsusutvu.

### **5.3. Uticaj pola i starosti na morfometrijske parametre neurofila i monocita**

Usavršavanjem tehnologije hematoloških brojača potreba za izradom razmaza periferne krvi značajno je smanjena. Na Beckman Coulter hematološkim brojačima leukocitarna formula dobija se na osnovu morfometrijskih parametara leukocita. Ovi parametri se dobijaju merenjem promena električnog otpora koji je izazvala ćelija, provodljivosti struje kroz ćeliju i rasipanja laserske svetlosti od strane ćelija. Signali koje ćelije generišu u interakciji sa električnim naponom, strujom i svetlošću konvertuju se analogno-digitalno i pomoću algoritma obrađuju. Kao krajnji rezultat dobijaju se srednje vrednosti za zapreminu, provodljivost struje i rasipanje svetlosti sa standardnim devijacijama za neutrofile, monocite, limfocite i eozinofile. Njihova primarna upotreba jeste diferencijacija leukocita i provera rada hematoloških brojača (138, 139). Međutim, sprovedena istraživanja ukazuju da se mogu koristiti u prepoznavanju različitih stanja u kojima dolazi do promene morfologije leukocita poput bakterijskih (142–149) i virusnih infekcija (151–153), malarije (154, 155), sepse (150), hematoloških oboljenja (152, 156, 157), kao i deficita vitamina B12 i folata (161, 162). Za sada je američka Agencija za hranu i lekove (engl. Food and Drug Administration, FDA) odobrila primenu standardne devijacije zapremine monocita kao ranog markera sepse (160).



Očekivano je da izmenjena morfologija leukocita usled deficita kobalamina i/ili folata dovede do promene signala preko kojih se CPD parametri određuju. Takođe, očekivano je da se zbog načina određivanja, promene na CPD parametrima detektuju ranije nego promene na razmazu periferne krvi. Hipersegmentacija jedra neutrofila smatra se najranijim hematološkim markerom megaloplastnih promena u krvi (80, 131), ali je kod pacijenata sa umerenim oblikom deficita kobalamina slabo korelirana sa ostalim parametrima statusa vitamina B12 (80, 133). Određivanje CPD parametara neutrofila i monocita vrši se na velikom broju ćelija, tj. 8000 na hematološkom brojaču sa petodelnom diferencijacijom leukocita određenog proizvođača instrumenata Beckman Coulter (139). Time se postiže veća tačnost i preciznost u poređenju sa razmazom periferne krvi kada se analizira 100 ćelija. Druga prednost CPD parametara nad razmazom periferne krvi u slučaju potvrde njihovog značaja u dijagnostici deficita kobalamina ili folata jeste automatsko dobijanje u sklopu rezultata krvne slike bez utroška dodatnih reagenasa.

Do sada je urađen mali broj istraživanja o povezanosti koncentracija biomarkera statusa vitamina B12 i CPD parametara (161, 162). Risch i saradnici su uočili povezanost sniženih vrednosti koeficijenata varijacije zapremine neutrofila i monocita sa smanjenim koncentracijama holotranskobalamina kod osoba starijih od 60 godina bez simptoma deficita (162). Sa druge strane, Simon-Lopez i saradnici su ustanovili povezanost povećanih vrednosti srednjih zapremina neutrofila i monocita sa niskim koncentracijama kobalamina i folata (161).

Pre analize povezanosti CPD parametara neutrofila i monocita i statusa vitamina B12, izvršena je analiza uticaja pola i starosti na ove parametre u kontrolnoj grupi koju su činili zdravi dobrovoljci. Njihovi hematološki i biohemijski parametri potvrdili su odsustvo anemije, smanjene funkcije bubrega, inflamacije, deficita vitamina B12 i folata. Rezultati su pokazali da se vrednosti morfometrijskih parametara neutrofila i monocita nisu razlikovale između polova, kao ni između starijih i mlađih od 60 godina (Tabela 17). Risch i saradnici (162) su u svom istraživanju odnosa srednjih zapremina neutrofila i monocita i njihovih koeficijenata varijacije sa holotranskobalaminom takođe istakli odsustvo uticaja starosti i pola na ove parametre.

U prikazanoj studiji analizirani su svi morfometrijski parametri neutrofila i monocita koji su se mogli dobiti na hematološkom brojaču Coulter® LH750 Hematology Analyzer (Beckman Coulter, USA): srednja vrednost za zapreminu, provodljivost i rasipanje svetlosti, kao i njihove standardne devijacije. S obzirom na to da smo kod svih ispitanika dobili sadržaj folata u eritrocitima iznad granice koju je WHO predložila za deficit (85), ovaj parametar nije uključen u statističku obradu podaka. Analiza morfometrijskih parametara neutrofila i monocita nije uključila ispitivanje uticaja inflamacije, jer je njen uticaj već potvrđen u prethodno objavljenim istraživanjima (142–150).

#### **5.4. Uticaj vitamina B12, folata i homocisteina na morfometrijske parametre neutrofila i monocita**

Radi ispitivanja povezanosti CPD parametara neutrofila i monocita sa koncentracijama kobalamina, folata i Hcy u serumu, pacijenti su podeljeni u 3 grupe prema koncentraciji vitamina B12 i folata: bez deficita vitamina, sa izolovanim deficitom kobalamina i sa izolovanim deficitom folata. Za granične vrednosti korišćene su koncentracije vitamina koje WHO predlaže za označavanje deficita (85).

Upoređene grupe pacijenata se nisu razlikovale prema zastupljenosti polova, anemije, smanjene funkcije bubrega i deficita gvožđa. Takođe, nije bilo razlika prema vrednostima kreatinina i većine hematoloških parametara (hemoglobin, hematokrit, RDW). Izostanak razlike prema hemoglobinu između pacijenata sa deficitom kobalamina i folata u odnosu na pacijente bez deficita vitamina potvrda je rezultata binarne logističke regresije da kobalamin i folat nisu značajni prediktori prisustva anemije. Postojale su razlike prema starosti i broju leukocita, ali su imale mali statistički značaj.

Homocistein je dobar pokazatelj statusa vitamina B12 u slučaju manifestnog deficita (111, 166). Očekivano je da vrednosti Hcy budu značajno veće kod pacijenata sa koncentracijama vitamina B12 i folata koje označavaju deficit u odnosu na pacijente bez niskih koncentracija ovih vitamina. Međutim, takav rezultat je izostao. Razlog može biti korišćena granična vrednost za vitamin B12, kao i drugi faktori koji pored kobalamina i folata utiču na vrednost Hcy. Granična vrednost za kobalamin od 150

pmol/L definisana je prema najnižoj vrednosti MMA (85, 307). Kada bi se Hcy koristio za utvrđivanje adekvatnog nivoa kobalamina, granična vrednost za deficit vitamina B12 iznosila bi 300 pmol/L (307). Prema ovoj graničnoj vrednosti za kobalamin, u grupi bez deficita vitamina bilo je pacijenata sa deficitom vitamina B12. Kada se pogleda raspon vrednosti za Hcy (Tabela 18) može se videti da u svim grupama postoje koncentracije Hcy  $\geq 15$   $\mu\text{mol/L}$ , što bi značilo da u svim grupama postoji ili deficit kobalamina i/ili folata ili je neki drugi faktor doveo do prisustva povećanih vrednosti Hcy. Višestruka regresiona analiza ukazala je na kreatinin kao najznačajniji prediktor vrednosti Hcy (Tabela 11). Iako se grupe nisu razlikovale prema zastupljenosti smanjene bubrežne funkcije, njeno prisustvo kod određenog broja pacijenata u svakoj od upoređenih grupa doprinelo dobijanju povećanih vrednosti Hcy.

S obzirom na to da nije bilo razlika prema anemiji, deficitu gvožđa i bubrežnoj funkciji, može se govoriti o isključivom efektu koncentracija vitamina B12 i folata na CPD parametre neutrofila i monocita. Koncentracije folata  $< 10$  nmol/L uticale su na veći broj CPD parametara u odnosu na koncentracije vitamina B12  $< 150$  pmol/L. Pacijenti sa deficitom folata imali su veće vrednosti NeV-SD, MoV-SD, NeC-SD, MoC-SD i NeS-SD, a niže vrednosti MoC i NeS u odnosu na pacijente bez deficita vitamina. Promene na parametrima NeV-SD i MoV-SD su ukazale na prisustvo monocita i neutrofila različitih zapremina, a promene na NeC-SD, NeS-SD, MoC-SD, MoC i NeS na to da su u krvi pacijenata sa deficitom folata prisutni neutrofili i monociti sa različitim unutrašnjom strukturom. Najznačajnije razlike su bile prema MoV-SD i NeC-SD, dok su razlike prema ostalim CPD parametrima imale mali statistički značaj.

Vrednosti kobalamina  $< 150$  pmol/L bile su statistički značajno povezane samo sa jednim CPD parametrom, NeC-SD. Na NeC-SD je uticao i deficit folata i njegov uticaj je bio veći. U ROC analizi za NeC-SD dobijena je dobra dijagnostička osetljivost za izolovani deficit vitamina B12 i veoma dobra dijagnostička osetljivost za prepoznavanje izolovanog deficita folata (Tabela 21).

Još jedan CPD parametar koji se istakao bio je MoV-SD. Pacijenti sa deficitom folata, pored toga što su imali veće vrednosti ovog parametra u odnosu na pacijente bez deficita oba vitamina, imali su veće vrednosti MoV-SD u poređenju sa pacijentima koji su imali samo deficit kobalamina. Parametar MoV-SD je imao dobru dijagnostičku

osetljivost za niske vrednosti folata i moglo bi se zaključiti da je karakterističan za deficit folata. Međutim, specifičnost granične vrednosti MoV-SD > 18 razlikovala se u zavisnosti od pacijenata u odnosu na koje je izvršeno poređenje. Najmanja specifičnost od 56.8% je dobijena u odnosu na pacijente sa niskim koncentracijama kobalamina (Tabela 23). To upućuje na veći procenat lažno pozitivnih rezultata kod pacijenata sa deficitom kobalamina. Moguć uzrok jeste prisustvo normalnih vrednosti folata kod istovremeno prisutnog deficita folata i kobalamina (199), što bi značilo da je u grupi sa deficitom kobalamina bilo pacijenata koji su zbog normalnih vrednosti folata svrstani u ovu grupu iako su zapravo imali deficit folata.

Kao i kod standardnih hematoloških manifestacija deficita folata i kobalamina, na osnovu povećanih vrednosti NeC-SD i MoV-SD ne može se ustanoviti da li osoba ima deficit jednog ili oba vitamina. S obzirom na dobijene male pozitivne i velike negativne prediktivne vrednosti u svim poređenjima za odabranu graničnu vrednost, iako se radi o grupi sa visokim rizikom za deficit kobalamina, ovi CPD parametri imaju veći značaj u isključivanju deficita vitamina B12 i folata.

Dobijeni rezultati za CPD parametre se razlikuju u odnosu na objavljene studije. U prethodno objavljenim istraživanjima (161, 162) nisu ispitani svi morfometrijski parametri neutrofila i monocita. Samim tim ostaje nejasno kakve bi rezultate dobili za standardnu devijaciju provodljivosti neutrofila. Istraživačke populacije su se takođe razlikovale. Simon-Lopez i saradnici (161) su istraživali srednje zapremine neutrofilia i monocita kod pacijenata sa anemijom i bez nje, a anemija je bila jedini kriterijum za selekciju pacijenata. Risch i saradnici (162) su svoje istraživanje sprovedli u grupi starijih od 60 godina bez inflamacije i bolesti kompatibilnih sa deficitom vitamina B12. Biomarker statusa vitamina B12 u odnosu na koji je vršeno poređenje takođe je bio različit. Kod Simon-Lopez i saradnika (161) to su bile niske koncentracije kobalamina i folata, a kod Risch i saradnika (162) nizak nivo holo-TCII. I ova dva istraživanja imaju različite rezultate. Risch i saradnici navode da se srednje zapremine neutrofila i monocita nisu razlikovale između ispitanika sa različitim koncentracijama holo-TCII (162), dok Simon-Lopez i saradnici navode upravo ove parametre kao različite (161). Sve navedene razlike između istraživanja su mogle uticati na dobijanje različitih rezultata.

## **5.5. Uticaj metilmalonske kiseline i funkcije bubrega na morfometrijske parametre neutrofila i monocita**

Metilmalonska kiselina je metabolički marker deficita vitamina B12, jer njene koncentracije počinju da rastu kada ćelija nema dovoljno kobalamina za reakciju konverzije metilmalonil-CoA u sukcinil-CoA (65). Ovaj biomarker važi za osetljiviji indikator u odnosu na serumski kobalamin za klinički manifestni oblik deficita vitamina B12 (111). Međutim, osetljivost zavisi od primenjenih graničnih vrednosti (99). Ukoliko se kao granične vrednosti za MMA i kobalamin primene vrednosti koje su sredina opisanih vrednosti u literaturi kada se javlja deficit, razlika prema osetljivosti za klinički deficit i nije velika, MMA vs kobalamin: 95–98% vs >90% (99). Glavni razlog zašto MMA nema veliku primenu u kliničkoj praksi jeste cena određivanja i potreba za dodatnom laboratorijskom opremom (134). Obično se MMA određuje onim pacijentima kod kojih postoji klinička slika ili sumnja na deficit vitamina B12, ali su koncentracije kobalamina u referentnom opsegu (134).

Kada je u pitanju SCCD, nema podataka o osetljivosti MMA, jer se ovaj oblik deficita utvrđuje na osnovu biohemijskih parametara za koje ne postoji zlatni standard. Obično se u odnosu na MMA porede drugi biomarkeri (99). U epidemiološkim istraživanjama je prevalenca povećanih vrednosti MMA viša u odnosu na prevalencu niskih koncentracija kobalamina (98), ali postoje i drugi faktori koji utiču na vrednost MMA osim deficita vitamina B12 (84, 250). Zato se i preporučuje istovremeno određivanje kobalamina i MMA kako bi se izbegli lažno pozitivni rezultati (248).

U prikazanoj tezi ispitivali smo odnos MMA sa ostalim biomarkerima statusa vitamina B12, kao i sa CPD parametrima neutrofila i monocita kod pacijenata sa rizikom za deficit kobalamina. Korišćena je grupa od 177 pacijenata, kojima je određena MMA. Iz analize su isključeni pacijenti sa deficitom folata zbog uticaja na CPD parametre. Pacijenti su podeljeni u 4 grupe prema eGFR i statusu vitamina B12: pacijenti bez smanjene bubrežne funkcije i bez deficita kobalamina, pacijenti bez smanjene funkcije bubrega i sa izolovano smanjenim koncentracijama kobalamina, pacijenti bez smanjene bubrežne funkcije i sa povećanom MMA i pacijenti sa smanjenom funkcijom bubrega i povećanom MMA. Vrednosti eGFR  $\leq 60$  mL/min/1.73

m<sup>2</sup> su predstavljale smanjenu funkciju bubrega, a vrednosti kobalamina < 221 pmol/L i/ili MMA > 210 nmol/L predstavljale su neadekvatan status vitamina B12. Za ove pacijente nismo koristili izraz deficit kobalamina, jer prema WHO kobalamin < 150 pmol/L označava deficit (85). Sa druge strane, pacijenti sa vrednostima kobalamina 150–221 pmol/L imaju iscrpljene rezerve (309). Zato je upotrebljen termin neadekvatan status vitamina B12. Za samu MMA još uvek ne postoji konsenzus oko granične vrednosti. U prikazanoj studiji koristili smo najmanju graničnu koncentraciju koja se pojavljuje u literaturi kako bismo obuhvatili pacijente koji pripadaju tzv. sivoj zoni i analizirali da li će imati promene na CPD parametrima. Pored odnosa biomarkera, kao i odnosa MMA sa CPD parametrima, želeli smo da ispitamo da li će pacijenti sa izolovano niskim koncentracijama kobalamina (< 221 pmol/L) biti povezani sa promenama na NeC-SD.

Kada je u pitanju odnos MMA i kobalamina može se uočiti da su vrednosti MMA > 210 nmol/L bez obzira na vrednost eGFR bile praćene koncentracijama kobalamina koje odgovaraju deficitu i iscrpljenim rezervama (Tabela 24). Takođe, pacijenti sa povećanim vrednostima MMA bez obzira na funkciju bubrega imali su ravnomerno zastupljene izolovano povećane koncentracije MMA i kombinovano povećane vrednosti MMA i snižene vrednosti kobalamina (Slika 29). Ipak, postojala je grupa pacijenata koja je imala niske koncentracije kobalamina bez povećanih vrednosti MMA. Idealno slaganje biomarkera statusa vitamina B12 nije moguće postići, a naročito ne u uslovima kada ne postoji zlatni standard i nisu utvrđene granične vrednosti za deficit. Moguće objašnjenje je da odabrane granične vrednosti ne mogu odgovarati svim pacijentima, tj. promene u statusu vitamina B12 ne moraju kod svih pacijenata krenuti od istih koncentracija kobalamina i MMA. Drugo moguće objašnjenje jeste da je došlo do pada u koncentraciji vitamina B12, ali još uvek ne i do porasta MMA, što Golding objašnjava u svom modelu nastanka deficita kobalamina (110).

Iako su pacijenti za određivanje MMA selektovani prema nivou kobalamina < 300 pmol/L i/ili Hcy > 8 µmol/L, kao i to da se za Hcy kao metabolički marker deficita kobalamina očekuje da bude povećan kada je i MMA povećana (99), prema našim rezultatima Hcy je pratio razliku prema starosti i funkciji bubrega. Pacijenti sa smanjenom bubrežnom funkcijom i povećanim MMA vrednostima bili su značajno

stariji od ostalih pacijenata i imali su značajno veće vrednosti Hcy. Sličan rezultat za odnos kobalamina, Hcy i MMA dobili smo u prethodno objavljenom istraživanju kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12, bez inflamacije i sa normalnim MCV (329). Grupe su formirane prema MMA tercilima:  $\leq 226$  nmol/L, 227–367 nmol/L i  $> 367$  nmol/L. Pacijenti sa vrednostima MMA koje odgovaraju drugom i trećem tercilu imali su značajno manje koncentracije kobalamina u poređenju sa ispitanicima čije su MMA vrednosti bile  $\leq 226$  nmol/L. Vrednosti Hcy, uz korekciju uticaja kreatinina, bile su različite samo između trećeg i prvog tercila, tj. između grupa sa vrednostima MMA  $> 367$  nmol/L i  $\leq 226$  nmol/L. Ova dva terčila su se najviše razlikovale prema starosti i funkciji bubrega (329).

U drugom objavljenom istraživanju (330) ispitivali smo, pored CPD parametara neutrofila i monocita, uticaj funkcije bubrega na Hcy u prisustvu sniženih koncentracija kobalamina i/ili folata. Rezultati su pokazali da bubrežna funkcija ima veći uticaj na Hcy od niskih koncentracija kobalamina i folata kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12 i normalnim MCV. Razlika prema Hcy je bila prisutna kada su upoređeni pacijenti sa različitim statusom vitamina i istom bubrežnom funkcijom, kao i kada su upoređeni pacijenti sa istim statusom vitamina, ali različitom funkcijom bubrega (330). Međutim, u prvom slučaju razlike prema Hcy imale su mali statistički značaj, a u drugom veliki. Takođe, vrednosti Hcy kod pacijenata sa niskim koncentracijama kobalamina i/ili folata i normalnom funkcijom bubrega nisu bile značajno veće od 15  $\mu$ mol/L. Sa druge strane, pacijenti koji su imali smanjenu funkciju bubrega, bez obzira na status vitamina B12 i folata imali su vrednosti Hcy značajno veće od 15  $\mu$ mol/L (330).

Navedeni rezultati upućuju da su kobalamin i MMA bolji biomarkeri za SCCD u odnosu na Hcy. Na Hcy veći uticaj imaju starost pacijenta i vrednost kreatinina, tj. funkcija bubrega. Ove varijable treba uzeti u obzir prilikom interpretacije rezultata za Hcy kod pacijenata koji nemaju kliničke manifestacije deficita.

Rezultati poređenja su još jednom potvrdili značaj bubrežne funkcije kao prediktora anemije. Kod pacijenata sa smanjenom funkcijom bubrega i povećanim vrednostima MMA uočene su značajno niže vrednosti hemoglobina tj. veća

zastupljenost anemije u poređenju sa pacijentima koji su imali normalnu bubrežnu funkciju bez obzira na status vitamina B12 (Slika 31). S obzirom na to da se grupe nisu razlikovale prema zastupljenosti polova i statusu gvožđa, razlike prema hemoglobinu bile su posledica smanjene funkcije bubrega. Prisustvo normocitne anemije kod pacijenata sa smanjenom funkcijom bubrega može biti nezavisno od deficita gvožđa i vitamina B12, ali zahteva ispitivanje njihovog statusa (331).

Još jedan parametar koji potvrđuje da su pacijenti sa vitaminom B12 < 221 pmol/L i/ili MMA > 210 nmol/L imali neadekvatan status kobalamina jeste NeC-SD. Na njega nije uticala funkcija bubrega, već samo status vitamina B12. Pacijenti sa neadekvatnim statusom kobalamina bez obzira na bubrežnu funkciju imali su veće vrednosti NeC-SD u odnosu na pacijente bez deficita vitamina B12. Parametar NeC-SD je imao dobru dijagnostičku osetljivost za klasifikaciju pacijenata prema kobalaminu ili MMA (Tabela 29). S obzirom na to da razlika prema drugim CPD parametrima neutrofila i monocita nije bilo, funkcija bubrega i status vitamina B12 nisu uticali na njih.

U prethodno objavljenom radu (330) opisali smo povezanost CPD parametara neutrofila i monocita sa deficitom kobalamina i/ili folata u prisustvu smanjene bubrežne funkcije. Rezultati su pokazali da deficit kobalamina (< 150 pmol/L) i/ili folata (< 10 nmol/L) utiče na NeV-SD, NeC-SD, NeS-SD, MoV-SD, MoC-SD i NeS, a da funkcija bubrega nije uticala na ove parametre. Najznačajniji među CPD parametrima bio je NeC-SD, dok su razlike prema ostalim CPD parametrima imale mali statistički značaj. Nije ispitivan deficit svakog vitamina odvojeno, samim tim nije se moglo utvrditi koji od CPD parametara jeste pod uticajem deficita vitamina B12, a koji pod uticajem deficita folata. U prikazanoj tezi je potvrđeno da su niske koncentracije kobalamina i folata povezane sa povećanim vrednostima NeC-SD, a samo niske koncentracije folata sa povećanim vrednostima NeV-SD, NeS-SD, MoV-SD i MoC-SD, i smanjenim NeS.

Povećane vrednosti NeC-SD dobijene su i kod pacijenata sa izolovano smanjenim koncentracijama kobalamina. Pacijent sa normalnom vrednošću kreatinina i MMA ≤ 210 nmol/L ne bi trebalo da ima deficit vitamina B12 (325). Međutim, sve ćelije nemaju jednake rezerve kobalamina i u svim ćelijama neće istovremeno nastati metabolički deficit (110). Nervne ćelije i neke ćelije krvi imaju male zalihe vitamina



B12 (110). Kada se iscrpe rezerve kobalamina, količina vezanog vitamina B12 na TCII počinje naglo da opada i odmah dolazi do subnormalne sinteze DNK u granulocitima (110). S obzirom na to da se parametar NeC-SD odnosi na unutrašnju morfologiju neutrofila, moguće je da je u grupi pacijenata sa izolovano smanjenim koncentracijama vitamina B12 došlo do promena u morfologiji neutrofila pre povećanja MMA.

## **5.6. Uticaj anemije i statusa gvožđa na morfometrijske parametre neutrofila i monocita**

Istovremeno prisustvo deficita gvožđa i deficita kobalamina dovodi do pojave normalnog MCV (50). U zavisnosti od toga koji deficit je više izražen, MCV može biti smanjen, normalan ili povećan (50). Na razmazu periferne krvi uočavaju se i mikrociti i makroovalociti (50), ali se u rezultatu krvne slike pojavljuje normalan MCV.

S obzirom na to da je istraživanje izvršeno na uzorku pacijenata sa normalnim MCV i da je deficit gvožđa bio prisutan kod 43% pacijenata, analizirali smo uticaj deficita gvožđa i anemije na CPD parametre neutrofila i monocita. Iz analize su isključene žene sa feritinom  $> 150 \mu\text{g/L}$  i muškarci sa feritinom  $> 200 \mu\text{g/L}$  zbog rizika od opterećenja organizma gvožđem (324, 326), kao i ispitanici sa deficitom folata. Pacijenti su zatim podeljeni u 4 grupe prema prisustvu deficita gvožđa i deficita kobalamina: pacijenti bez deficita, pacijenti sa izolovanim deficitom kobalamina, pacijenti sa izolovanim deficitom gvožđa i pacijenti sa kombinovanim deficitom gvožđa i kobalamina. Deficit gvožđa je definisan kao feritin  $< 15 \mu\text{g/L}$  i/ili saturacija transferina  $< 16\%$  (324, 326), a deficit kobalamina kao vitamin B12  $< 150 \text{ pmol/L}$  (85).

Kombinovani deficit jeste bio prisutan kod određenog broja pacijenata, ali su postojali i pacijenti sa izolovanim deficitom gvožđa, kao i izolovanim deficitom kobalamina. U njihovom slučaju odsustvo promena u MCV govori o nedovoljno ispoljenom deficitu gvožđa ili kobalamina. Kod pacijenata sa deficitom gvožđa, bez obzira na status vitamina B12, anemija je bila značajno više zastupljena u odnosu na pacijente bez deficita gvožđa (Slika 35). Razlike prema zastupljenosti smanjene funkcije bubrega nije bilo. Koncentracije sTfR bile su značajno više kod pacijenata sa deficitom gvožđa u odnosu na pacijente bez deficita, bez obzira na status vitamina B12.

Vrednosti sTfR > 1.55 mg/L potvrđuju prisustvo anemije izazvane deficitom gvožđa kod pacijenata sa feritinom < 15µg/L i/ili SAT < 16% (Tabela 32).

Koeficijent varijacije veličine eritrocita ili RDW jeste parametar na koga utiču faktori koji utiču i na veličinu eritrocita. Deficiti gvožđa, kobalamina i folata svakako spadaju u te faktore. Povećane vrednosti RDW u prisustvu normalnog MCV upućuju da u krvi postoje eritroci različitih veličina, ali da je izračunata prosečna vrednost zapremine eritrocita u referentnom opsegu. Takođe, vrednosti RDW u referentnom opsegu u zavisnosti od MCV znače da su eritrociti uniformno male, normalne ili velike zapremine. Rezultati poređenja RDW između pacijenata sa različitim statusom vitamina B12 i gvožđa ukazuju na postojanje razlika. Međutim, prema interkvartilnom rasponu sve grupe imale su većinu vrednosti RDW u referentnom opsegu (Tabela 32). Rezultat RDW se ne može interpretirati odvojeno od MCV. S obzirom na to da su prema ovim parametrima pacijenti bili normocitni i bez anizocitoze eritrocita, može se zaključiti da kod određenog broja pacijenata deficit gvožđa i deficit kobalamina nisu bili dovoljno ispoljeni, dok je kod ostalih pacijenata prisustvo eritrocita normalne zapremine i bez izražene anizocitoze moglo biti posledica kombinovanog deficita gvožđa i kobalamina.

Razlika prema Hcy je bila prisutna između pacijenata sa izolovanim deficitom kobalamina i izolovanim deficitom gvožđa i poticala je od razlike prema starosti. Ostale grupe, uprkos razlici prema koncentraciji kobalamina, nisu se razlikovale prema Hcy.

Gvožđe je neophodno za maturaciju i funkcionisanje ćelija. Dosadašnje studije o CPD parametrima nisu se bavile uticajem gvožđa, ali postoje studije koje su razmatrale odnos gvožđa i leukocita kroz uticaj na broj, funkciju i morfologiju ćelija. Gvožđe učestvuje u oksido-redukcionim reakcijama, sintezi hema i DNK (332). Diferencijacija monocita i makrofaga takođe je zavisna od gvožđa (332). Narušena sinteza DNK usled deficita gvožđa može dovesti do izmenjene apoptoze ćelija (332). Međutim, rezultati in vitro studija o efektu deficita gvožđa na apoptozu ćelija se razlikuju. Prema jednim autorima apoptoza se povećava u uslovima hipoksije i helacije gvožđa, a prema drugim autorima nema razlike u apoptozi neutrofila i mononuklearnih ćelija u odnosu na kontrolnu grupu (332). U studiji Berrak i saradnika (332) u anemiji izazvanoj deficitom gvožđa apoptoza neutrofila i monocita je smanjena, kao i procenat nekrotičnih ćelija u poređenju sa kontrolnom grupom. Do povećanja apoptoze je došlo nakon

suplementacije pacijenata gvoždem. Prema istraživanju Özcan i saradnika (333), u anemiji deficit gvožđa povećava broj granulocita, smanjuje broj limfocita, ali ne utiče na broj monocita. Nije bilo značajne razlike u ukupnom broju leukocita. Molekulska osnova ovakvog uticaja gvožđa na leukocite još uvek je u velikoj meri neobjašnjena. Rezultati istraživanja Westerman i saradnika (334) su ukazali da pacijenti sa anemijom izazvanom deficitom gvožđa, bez deficita kobalamina i folata, mogu imati u perifernoj krvi hipersegmentovane neutrofile. Mehanizam uticaja deficita gvožđa na hipersegmentaciju neutrofila još uvek nije poznat. Prema istraživanju Lim i saradnika (335) pacijenti sa anemijom izazvanom deficitom gvožđa imaju visoku incidencu leukopenije čija težina korelirala sa smanjenjem hemoglobina.

U prikazanoj tezi nije utvrđena povezanost broja leukocita, neutrofila i monocita sa deficitom gvožđa. Međutim, rezultati potvrđuju uticaj deficita gvožđa na unutrašnju strukturu neutrofila u vidu promena NeS-SD. Pacijenti sa izolovanim deficitom gvožđa razlikovali su se od ostalih pacijenata prema ovom CPD parametru, uključujući i pacijente sa kombinovanim deficitom gvožđa i kobalamina. Deficit folata, takođe, je uticao na NeS-SD, ali na suprotan način. Deficit gvožđa je povezan sa smanjenim vrednostima NeS-SD, dok je deficit folata povezan sa povećanim vrednostima NeS-SD. Dodatna istraživanja su potrebna kako bi se ispitale promene parametra NeS-SD kod istovremeno prisutnog deficita gvožđa i deficita folata. Uticaj deficita gvožđa na morfometrijske parametre monocita nije utvrđen.

Drugi značajan CPD parametar u ovom poređenju bio je NeC-SD. Deficit gvožđa i anemija nisu uticali na NeC-SD, već je promena u vrednostima NeC-SD pratila promenu u koncentraciji kobalamina. I u prisustvu i u odsustvu deficita gvožđa, NeC-SD je imao dobru dijagnostičku osetljivost za deficit kobalamina (Tabela 36).

Mogućnost da se na osnovu vrednosti NeS-SD prepozna izolovani deficit gvožđa, a na osnovu NeC-SD deficit kobalamina i/ili folata može olakšati interpretaciju rezultata krvne slike, naročito normocitne anemije kod pacijenta sa rizikom za deficit vitamina B12. S obzirom na to da hipersegmentacija neutrofila slabo korelira sa parametrima statusa vitamina B12 u blažim oblicima deficita, povezanost promena na NeC-SD sa statusom kobalamina omogućava detekciju njegovog deficita i pre nego što promene postanu vidljive pod mikroskopom.

## 6. Zaključci

Subklinički deficit kobalamina podrazumeva da je koncentracija jednog ili više biomarkera statusa vitamina B12 izvan referentnog opsega u odsustvu kliničkih manifestacija deficita. S obzirom na to da ne postoji zlatni standard u laboratorijskom ispitivanju statusa vitamina B12, teško je reći koji biomarker najbolje ukazuje na SCCD. Jedino je moguće analizirati povezanost biomarkera, tj. odnos njihovih graničnih koncentracija za deficit i analizirati uticaje drugih faktora na njihove vrednosti.

Povezanost povećanih vrednosti standardne devijacije provodljivosti neutrofila i niskih koncentracija kobalamina i/ili povećanih koncentracija metilmalonske kiseline ukazuje da kod pacijenata sa subkliničkim deficitom ipak dolazi do pojave hematoloških manifestacija u vidu izmenjene morfologije neutrofila.

U skladu sa postavljenim ciljevima može se zaključiti:

1. Kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12 i normalnim MCV, korelacija između koncentracija kobalamina i MMA u serumu veća je u poređenju sa korelacijom koncentracija kobalamina i Hcy, tj. MMA i Hcy. Kobalamin je najznačajniji prediktor vrednosti metilmalonske kiseline, ali ne i homocisteina.
2. U subkliničkom, kao i u klinički manifestnom deficitu vitamina B12, postoji određen broj pacijenata koji ima sniženu koncentraciju kobalamina ( $< 221$  pmol/L) u prisustvu normalnih vrednosti MMA ( $\leq 210$  nmol/L) i obrnuto. Razlog zbog čega se to dešava tek treba utvrditi. Jedno od objašnjenja je da su faze u razvoju deficita u zavisnosti od uzroka praćene neslaganjem promena u koncentracijama biomarkera. Drugi mogući razlog je da svim pacijentima ne odgovaraju odabrane granične vrednosti za deficit, odnosno da može postojati individualna promena u koncentraciji biomarkera koja odstupa od utvrđenih graničnih koncentracija.
3. Kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12 i normalnim MCV koncentracije kobalamina nisu pod uticajem pola, starosti i funkcije bubrega. Uticaj starosti i kreatinina postoji na koncentraciju MMA, ali je značajno manji od uticaja kobalamina. Na vrednosti Hcy u odsustvu kliničkih manifestacija deficita vitamina B12

veći uticaj imaju kreatinin i starost pacijenta od kobalamina. Zbog toga Hcy ne treba da se koristi u ispitivanju subkliničkog deficita vitamina B12, već kobalamin i/ili MMA.

4. Kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12 i normalnim MCV nije utvrđena povezanost biomarkera statusa vitamina B12 i anemije. Normalne vrednosti hemoglobina ne isključuju biohemjski deficit kobalamina i/ili folata. Na pojavu anemije kod pacijenata sa rizikom za deficit kobalamina i normalnim MCV najveći uticaj ima deficit gvožđa i smanjena funkcija bubrega. Normalan MCV sa anemijom ili bez nje može biti posledica istovremenog prisustva deficita gvožđa i deficita kobalamina, ali može biti posledica i nedovoljno ispoljenih izolovanih deficita gvožđa i kobalamina.

5. Kada su u pitanju morfometrijski parametri neutrofila i monocita nije utvrđen uticaj pola, starosti i bubrežne funkcije. Nađena je povezanost povećanih vrednosti standardne devijacije provodljivosti neutrofila (NeC-SD) sa koncentracijama kobalamina  $< 221$  pmol/L, folata  $< 10$  nmol/L i MMA  $> 210$  nmol/L. Ovaj CPD parametar, koji predstavlja različitost neutrofila prema unutrašnjoj strukturi, pokazuje da pacijenti sa rizikom za deficit vitamina B12 i normalnim MCV, a koji imaju niske koncentracije kobalamina i/ili folata, imaju u krvi i neutrofile različite morfologije.

6. Koncentracije folata  $< 10$  nmol/L imaju uticaj na veći broj CPD parametara neutrofila i monocita u poređenju sa niskim koncentracijama kobalamina i povećanim koncentracijama MMA: NeV-SD, NeC-SD, NeS-SD, MoV-SD, MoC-SD, MoC i NeS. Najznačajniji među njima su NeC-SD i MoV-SD, tj. standardne devijacije provodljivosti neutrofila i zapremine monocita.

7. Povećane vrednosti Hcy nisu povezane sa morfometrijskim parametrima neutrofila i monocita kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12 i normalnim MCV.

8. Snižene vrednosti hemoglobina same po sebi nisu povezane sa promenama u CPD parametrima neutrofila i monocita. Izolovani deficit gvožđa, kao najznačajniji uzročnik anemije, jeste povezan sa smanjenim vrednostima NeS-SD.

**9.** Zbog uticaja inflamacije na CPD parametre neutrofila i monocita, NeC-SD ne može se koristiti za procenu statusa vitamina B12 i/ili folata u inflamatornim stanjima.

**10.** Na osnovu promena parametra NeC-SD ne može se utvrditi da li je deficit kobalamina i/ili folata, jer je deficit oba vitamina povezan sa povećanim vrednostima NeC-SD. Parametar NeS-SD je pogodan za ispitivanje statusa gvožđa, ali ne kada je istovremeno prisutan i deficit folata, jer deficit folata utiče na njega. U slučajevima kada nema deficita kobalamina i/ili folata, tj. kada nema povećanja NeC-SD, snižene vrednosti NeS-SD mogu ukazati na izolovani deficit gvožđa. Odgovarajućim izborom granične vrednosti moguće je dobiti visoku negativnu prediktivnu vrednost za oba parametra i koristiti ih za isključivanje deficita kobalamina, folata i gvožđa.

**11.** U slučaju da se NeC-SD koristi kao indikator deficita kobalamina i/ili folata potrebno je njegove povećane vrednosti potvrditi testovima za vitamin B12 i folat. S obzirom na to da nema razlike između povezanosti NeC-SD sa kobalaminom i NeC-SD sa MMA, kobalamin bi trebalo da bude test izbora zbog veće dostupnosti i niže cene.

## 7. Literatura

1. Combe JS. History of a case of anaemia. *Trans Med Chir Soc Edinb* 1824;1:194–204
2. Sinclir L. Recognizing, treating and understanding pernicious anaemia. *J R Soc Med* 2008;101(5):262–264
3. Addison T. Anaemia - disease of the suprarenal capsules. *Med Gazette.* 1849;43:517–518
4. Biermer MA. Eine eigenthunliche form von progressiver pernicioser anaemie. *Schweizer Aerzte (Basel)* 1872;2:15–18
5. Smith EL. Purification of anti-pernicious anaemia factors from liver. *Nature.* 1948;161:638–639
6. Rickes EL, Brink NG, Koniuszy FR, Wood TR, Folkers K. Crystalline vitamin B12. *Science* 1948;107(2781):396–397
7. Hodgkin DC, Pickworth J, Robertson JH, Trueblood KN, Prosen RJ, White J. Structure of vitamin B12: The Crystal Structure of the Hexacarboxylic Acid derived from B12 and the Molecular Structure of the Vitamin. *Nature* 1955;176:325–328
8. Hodgkin DC, Kamper J, Mackay M, Pickworth M, Trueblood KN, White JG. Structure of vitamin B12. *Nature* 1956;178:64–66
9. Hodgkin DC, Kamper J, Lindsey J, McKay M, Pickworth J, Robertson JH, Brink Shoemaker C. The structure of vitamin B12 I. An outline of the crystallographic investigation of vitamin B12. *Proc R Soc Lond Ser A* 1957;242:228–263
10. Lenhert PG, Hodgkin DC. Structure of the 5,6-dimethylbenzimidazolylcobamide coenzyme. *Nature* 1961;192:937–938

11. Barker HA, Weissbach H, Smyth RD. A coenzyme containing pseudovitamin B12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1958;44(11):1093–1097
12. Gurnani S, Mistry SP, Johnson BC. Function of vitamin B12 in methylmalonate metabolism. I. Effect of a cofactor form of B12 on the activity of methylmalonyl-CoA isomerase. *Biochim Biophys Acta* 1960;38:187–188
13. Stern JR, Friedmann DL. Vitamin B12 and methylmalonyl-CoA isomerase. I. Vitamin B12 and propionate metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 1960;2(2):82–87
14. Lindstrand K. Isolation of methylcobalamin from natural source material. *Nature* 1964;204:188–189
15. Weissbach H, Taylor R. Role of vitamin B12 in methionine synthesis. *Fed Proc* 1966;25(6):1649–1656
16. Rossi M, Glusker JP, Randaccio L, Summers MF, Toscano PJ, Marzilli LG. The structure of a B12 coenzyme: methylcobalamin studies by X-ray and NMR methods. *J Am Chem Soc* 1985;107:1729–1738
17. Shenkin A, Baines M, Fell SG, Lyon TDG. Vitamin and trace elements. In: Burtis AC, Ashwood RE, Bruns ED, editors. *Tietz Textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 4th ed. Missouri: Elseviers Inc, 2006:1100–1105
18. Fedosov SN. Physiological and molecular aspects of cobalamin transport. *Subcell Biochem* 2012;56:347–367
19. Froese SD, Gravel AR. Genetic disorders of vitamin B12 metabolism: eight complementation groups – eight genes. *Expert Rev Mol Med* 2010;12:e37
20. Roth JR, Lawrence JG, Bobik TA. Cobalamin (coenzyme B12): synthesis and biological significance. *Annu Rev Microbiol* 1996;50:137–181



21. Martens JH, Barg H, Warren MJ, Jahn D. Microbial production of vitamin B12. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002;58:275–285
22. Wuerges J, Garau G, Geremia S, Fedosov SN, Petersen TE, Randaccio L. Structural basis for mammalian vitamin B12 transport by transcobalamin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(12):4386–4391
23. Banerjee R, Gherasim C, Padovani D. The tinker, tailor, soldier in intracellular B12 trafficking. *Curr Opin Chem Biol* 2009;13(4):484–491
24. Schrauzer GN, Deutsch E, Windgassen RJ. The nucleophilicity of vitamin B12. *J Am Chem Soc* 1968;90(9):2441–2442
25. Stich TA, Yamanishi M, Banerjee R, Brunold TC. Spectroscopic evidence for the formation of a four-coordinate  $\text{Co}^{2+}$  cobalamin species upon binding to the human ATP: cobalamin adenosyltransferase. *J Am Chem Soc* 2005;127(21):7660–7661
26. Kozyraki R, Cases O. Vitamin B12 absorption: Mammalian physiology and acquired and inherited disorders. *Biochimie* 2013;95(5):1002–1007
27. Watanabe F, Yabuta Y, Bito T, Teng F. Vitamin B12-Containing Plant Food Sources for Vegetarians. *Nutrients* 2014;6(5):1861–1873
28. Lerner-Ellis JP, Tirone JC, Pawelek PD, Doré C, Atkinson JL, Watkins D, Morel CF, Fujiwara TM, Moras E, Hosack AR, Dunbar GV, Antonicka H, Forgetta V, Dobson CM, Leclerc D, Gravel RA, Shoubridge EA, Coulton JW, Lepage P, Rommens JM, Morgan K, Rosenblatt DS. Identification of the gene responsible for methylmalonic aciduria and homocystinuria, cblC type. *Nat Genet* 2006;38(1):93–100
29. Kim J, Gherasim C, Banerjee R. Decyanation of vitamin B12 by a trafficking chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(38):14551–14554

30. Hannibal L, Kim J, Brasch NE, Wang S, Rosenblatt DS, Banerjee R, Jacobsen DW. Processing of alkylcobalamins in mammalian cells: a role for the MMACHC (cblC) gene product. *Mol Genet Metab* 2009;97(4):260–266
31. Kräutler B, Ostermann S. Structure, reactions, and functions of B12 and B12-proteins. In: Kadish KM, Smith KM, Guilard R, editors. *The porphyrin handbook, Volume 11 / Bioinorganic and Bioorganic Chemistry*. 1st ed. New York: Elsevier Inc, 2003:229–276
32. Hardlei TF, Obeid R, Herrmann W, Nexo E. Cobalamin Analogues in Humans: A Study on Maternal and Cord Blood. *PLoS One* 2013;8(4):e61194
33. Hardlei TF, Nexo E. A new principle for measurement of cobalamin and corrinoids, used for studies of cobalamin analogs on serum haptocorrin. *Clin Chem* 2009;55(5):1002–1010
34. Allen RH, Stabler SP. Identification and quantitation of cobalamin and cobalamin analogues in human feces. *Am J Clin Nutr* 2008;87(5):1324–1335
35. Fang H, Kang J, Zhang D. Microbial production of vitamin B12: a review and future perspectives. *Microb Cell Fact* 2017;16(1):15
36. Spasojević-Kalimanovska V. Biohemijska osnova eritropoeze. U: Dopsaj V, urednik. *Osnove laboratorijske dijagnostike i lečenja anemije*. Drugo izdanje. Beograd: Farmaceutski fakultet u Beogradu, 2012: 9–39.
37. Rizzo G, Laganà AS, Rapisarda AMC, La Ferrera GMG, Buscema M, Rossetti P, Nigro A, Muscia V, Valenti G, Sapia F, Sarpietro G, Zigarelli M, Vitale SGV. Vitamin B12 among Vegetarians: Status, Assessment and Supplementation. *Nutrients* 2016; 8(12):pii:E767.
38. Koyyalamudi SR, Jeong SC, Cho KY, Pang G. Vitamin B12 is the active corrinoid produced in cultivated white button mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J Agric Food Chem* 2009;57(14):6327–6333

39. Croft TM, Warren JM, Smith GA. Algae Need Their Vitamins. *Eukaryotic cell* 2006;5(8):1175–1183.
40. Kittaka-Katsura H, Watanabe F, Nakano Y. Occurrence of Vitamin B12 in Green, Blue, Red, and Black Tea Leaves. *J Nutr Sci Vitaminol* 2004;50(6):438–440
41. Stemme K, Meyer U, Lebzien P, Flachowsky G, Scholz H. Cobalt and vitamine B12 requirement of dairy cows. *Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier, 9. Symposium*; 2003 Sep 24–25
42. Quadros VE. Advances in the understanding of cobalamin assimilation and metabolism. *Br J Haematol* 2010;148(2):195–204
43. Andrès E, Vogel T, Federici L, Zimmer J, Ciobanu E, Kaltenbach G. Cobalamin Deficiency in Elderly Patients: A Personal View. *Curr Gerontol Geriatr Res* 2008;2008:848267
44. Seetharam B, Yammani RR. Cobalamin transport proteins and their cell-surface receptors. *Expert Rev Mol Med* 2003;5(18):1–18
45. Fedosov SN, Fedosova NU, Berglund L, Moestrup SK, Nexø E, Petersen TE. Composite organization of the cobalamin binding and cubilin recognition sites of intrinsic factor. *Biochemistry* 2005;44(9):3604–3614
46. Gherasim C, Lofgren M, Banerjee R. Navigating the B12 Road: Assimilation, Delivery, and Disorders of Cobalamin. *J Biol Chem* 2013;288(19):13186–13193
47. Alpers HD, Russell-Jones G. Gastric intrinsic factor: The gastric and small intestinal stages of cobalamin absorption. A personal journey. *Biochimie* 2013;95(5):989–994
48. Allen HR, Seetharam B, Podell E, Alpers DH. Effect of proteolytic enzymes on the binding of cobalamin to R protein and intrinsic factor. In vitro evidence that a failure to partially degrade R protein is responsible for cobalamin malabsorption in pancreatic insufficiency. *J Clin Invest* 1978;61(1):47–54

49. Banerjee R. B 12 trafficking in mammals: a for coenzyme escort service. *ACS Chem Biol* 2006;1(3):149–159
50. Babior MB. Folate, cobalamin and megaloblastic anemias. In: Lichtman AM, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps JT, Prchal TJ, editors. *Williams Hematology*. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 2007
51. Gordon MM, Howard T, Becich MJ, Alpers DH. Cathepsin L mediates intracellular ileal digestion of gastric intrinsic factor. *Am J Physiol* 1995;268(1 Pt 1):G33–40
52. Nielsen MJ, Rasmussen MR, Andersen CB, Nexø E, Moestrup SK. Vitamin B12 transport from food to the body's cells--a sophisticated, multistep pathway. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9(6):345–354
53. Heyssel RM, Bozian RC, Darby WC, Bell MC. Vitamin B12 turnover in man: The assimilation of vitamin B12 from natural foodstuff by man and estimates of minimal daily dietary requirements. *Am J Clin Nutr* 1966;18(3):176–184
54. Brada N, Gordon MM, Wen J, Alpers DH. Transfer of cobalamin from intrinsic factor to transcobalamin II. *J Nutr Biochem* 2001;12(4):200–206
55. 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):1632–1639
56. Allen RH. Human vitamin B12 transport proteins. *Prog Hematol* 1975;9:57–84
57. Fedosov SN, Berglund L, Fedosova NU, Nexø E, Petersen TE. Comparative analysis of cobalamin binding kinetics and ligand protection for intrinsic factor, transcobalamin and haptocorrin. *J Biol Chem* 2002;277(12):9989–9996
58. Hall CA, Finkler AE. A second vitamin B12-binding substance in human plasma. *Biochim Biophys Acta* 1963;78:233–236

59. Finkler AE, Hall CA. Nature of the relationship between vitamin B12 binding and cell uptake. *Arch Biochem Biophys* 1967;120(1):79–85
60. Jacobsen DW, Glushchenko AV. The transcobalamin receptor, redux. *Blood* 2009;113(1):3–4
61. Quadros EV, Nakayama Y, Sequeira JM. The protein and the gene encoding the receptor for the cellular uptake of transcobalamin-bound cobalamin. *Blood* 2009;113(1):186–192
62. Mørkbak AL, Hvas AM, Lloyd-Wright Z, Sanders TA, Bleie O, Refsum H, Nygaard OK, Nexø E. Effect of vitamin B12 treatment on haptocorrin. *Clin Chem* 2006;52(6):1104–1111
63. Neale G. B12 Binding proteins. *Gut* 1990;31(1):59–63
64. Alpers D. Absorption and blood/cellular transport of folate and cobalamin: Pharmacokinetic and physiological concentrations. *Biochimie* 2016;126:52–56
65. Hamilton SM, Blackmore S. Investigation of megaloblastic anaemia: cobalamin, folate and metabolic status. In: Bain JB, Bates I, Laffan AM, Lewis SM, editors. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 11th ed. London: Elsevier Churchill Livingstone, 2012:201–228
66. EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), 2015. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for cobalamin (vitamin B12). *EFSA Journal* 2015;13(7):4150
67. Hannibal L, DiBello MP, Jacobsen WD. Proteomics of vitamin B 12 processing. *Clin Chem Lab Med* 2013;51(3):477–488
68. Coelho D, Kim JC, Miousse IR, Fung S, du Moulin M, Buers I, Suormala T, Burda P, Frapolli M, Stucki M, Nürnberg P, Thiele H, Robenek H, Höhne W, Longo N, Pasquali M, Mengel E, Watkins D, Shoubbridge EA, Majewski J, Rosenblatt DS, Fowler B, Rutsch F, Baumgartner MR. Mutations in ABCD4

- cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism. *Nat Genet* 2012;44(10):1152–1155
69. Kim J, Hannibal L, Gherasim C, Jacobsen DW, Banerjee R. A human vitamin B12 trafficking protein uses glutathione transferase activity for processing alkylcobalamins. *J Biol Chem* 2009;284(48):33418–33424
  70. Mah W, Deme JC, Watkins D, Fung S, Janer A, Shoubridge EA, Rosenblatt DS, Coulton JW. Subcellular location of MMACHC and MMADHC, two human proteins central to intracellular vitamin B12 metabolism. *Mol Genet Metab* 2013;108(2):112-118
  71. Suormala T, Baumgartner MR, Coelho D, Zavadakova P, Kozich V, Koch HG, Berghäuser M, Wraith JE, Burlina A, Sewell A, Herwig J, Fowler B. The cblD defect causes either isolated or combined deficiency of methylcobalamin and adenosylcobalamin synthesis. *J Biol Chem* 2004;279(41):42742–42749
  72. Watkins D, Ru M, Hwang HY, Kim CD, Murray A, Philip NS, Kim W, Legakis H, Wai T, Hilton JF, Bing Ge B, Doré C, Hosack A, Wilson A, Gravel RA, Shane B, Hudson TJ, Rosenblatt DS. Hyperhomocysteinemia Due to Methionine Synthase Deficiency, cblG: Structure of the MTR Gene, Genotype Diversity, and Recognition of a Common Mutation, P1173L. *Am J Hum Genet* 2002;71(1):143–153
  73. Randaccio L, Geremia S, Demitri N, Wuerges J. Vitamin B12: Unique Metalorganic Compounds and the Most Complex Vitamins. *Molecules* 2010;15(5):3228–3259
  74. Mera PE, Escalante-Semerena JC. Dihydroflavin-driven adenosylation of 4-coordinate Co(II) corrinoids: are cobalamin reductases enzymes or electron transfer proteins? *J Biol Chem* 2010;285(5):2911–2917
  75. Banerjee R. Radical peregrinations catalyzed by coenzyme B12-dependent enzymes. *Biochemistry* 2001;40(21):6191–6198

76. Yamanishi M, Vlasie M, Banerjee R. Adenosyltransferase: an enzyme and an escort for coenzyme B12? *Trends Biochem Sci* 2005;30(6):304–308
77. Marisavljević D. Klinički aspekti anemija. U: Dopsaj V, urednik. *Osnove laboratorijske dijagnostike i lečenja anemija*. Drugo izdanje. Beograd: Farmaceutski fakultet u Beogradu, 2012:41–69
78. Metz J. A high prevalence of biochemical evidence of vitamin B12 or folate deficiency does not translate into a comparable prevalence of anemia. *Food Nutr Bull* 2008;29(2 Suppl):S74–S85
79. Shane B, Stokstad EL. Vitamin B12-folate interrelationships. *Annu Rev Nutr* 1985;5:115–141
80. Green R. Cobalamin and folate deficiency: the antecedents and associations of anemia. In: Education Program of the 26th Congress of the International Society of Haematology. Singapore: International Society of Haematology, Asian-Pacific Division; 1996:128–136
81. Voukelatou P, Vrettos I, Kalliakmanis A. Neurologic symptoms as the only manifestation of B12 deficiency in a young patient with normal hematocrit, MCV, peripheral blood smear and homocysteine levels. *Oxf Med Case Reports* 2016;12:302–304
82. Lindenbaum J, Healton EB, Savage DG, Brust JC, Garrett TJ, Podell ER, Marcell PD, Stabler SP, Allen RH. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. *N Engl J Med* 1988;318(26):1720–1728
83. Healton EB, Savage DG, Brust JC, Garrett TJ, Lindenbaum J. Neurologic aspects of cobalamin deficiency. *Medicine (Baltimore)* 1991;70(4):229–245
84. Green R, Allen LH, Bjørke-Monsen AL, Brito A, Guéant JL, Miller JW, Molloy AM, Nexø E, Stabler S, Toh BH, Ueland PM, Yajnik C. Vitamin B12

- deficiency. *Nat Rev Dis Primers* 2017;3:17040. Erratum in: *Nat Rev Dis Primers* 2017;3:17054
85. De Benoist B. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. *Food Nutr Bull* 2008;29(2 Suppl):S238–244
  86. Martin DC, Francis J, Protech J, Huff FJ. Time dependency of cognitive recovery with cobalamin replacement: report of a pilot study. *J Am Geriatr Soc* 1992;40(2):168–172
  87. Carmel R. Subclinical cobalamin deficiency. *Curr Opin Gastroenterol* 2012;28(2):151–158
  88. Carmel R. Cobalamin, the stomach, and aging. *Am J Clin Nutr* 1997;66(4):750–759
  89. Carmel R. Discussion: Causes of vitamin B12 and folate deficiencies. *Food Nutr Bull* 2008;29(2 Suppl):S35–S37
  90. Carmel R, Green R, Rosenblatt DS, Watkins D. Update on cobalamin, folate, and homocysteine. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003:62–81
  91. Carmel R, Karnaze DS. The deoxyuridine suppression test identifies subtle cobalamin deficiency in patients without typical megaloblastic anemia. *JAMA* 1985;253(9):1284–7
  92. Carmel R, Sinow RM, Karnaze DS. Atypical cobalamin deficiency: subtle biochemical evidence of deficiency is commonly demonstrable in patients without megaloblastic anemia and is often associated with protein-bound cobalamin malabsorption. *J Lab Clin Med* 1987;109(4):454–63
  93. Karnaze DS, Carmel R. Low serum cobalamin levels in primary degenerative dementia: Do some patients harbor atypical cobalamin deficiency states? *Arch Intern Med* 1987;147(3):429–431



94. Carmel R, Sinow RM, Siegel ME, Samloff IM. Food cobalamin malabsorption occurs frequently in patients with unexplained low serum cobalamin levels. *Arch Intern Med* 1988;148(8):1715–1719
95. Carmel R. Reversal by cobalamin therapy of minimal defects in the deoxyuridine suppression test in patients without anemia: further evidence for a subtle metabolic cobalamin deficiency. *J Lab Clin Med* 1992;119(3):240–244
96. Carmel R, Rasmussen K, Jacobsen DW, Green R. Comparison of the deoxyuridine suppression test with serum levels of methylmalonic acid and homocysteine in mild cobalamin deficiency. *Br J Haematol* 1996;93(2):311–318
97. Carmel R. Subtle and atypical cobalamin deficiency states. *Am J Hematol* 1990; 34(2):108–114
98. 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):348S–358S
99. Carmel R. Diagnosis and management of clinical and subclinical cobalamin deficiencies: why controversies persist in the age of sensitive metabolic testing. *Biochimie* 2013;95(5):1047–1055
100. Carmel R. Malabsorption of food cobalamin. *Baillieres Clin Haematol* 1995;8(3):639–655
101. Wong CW. Vitamin B12 deficiency in the elderly: is it worth screening? *Hong Kong Med J* 2015;21(2):155–164
102. Aimone-Gastin I, Pierson H, Jeandel C, Bronowicki J, Plenat F, Lambert D, Nabet-Belleville F, Gueant J. Prospective evaluation of protein bound vitamin B12(cobalamin) malabsorption in the elderly using trout flesh labeled in vivo with <sup>57</sup>Co-cobalamin. *Gut* 1997;41:475–479

103. Doscherholmen A, Swaim WR. Impaired assimilation of egg Co57 vitamin B12 in patients with hypochlorhydria and achlorhydria and after gastric resection. *Gastroenterology* 1973;64(5):913–919
104. Carmel R, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and food-cobalamin malabsorption. *Dig Dis Sci* 1994;39(2):309–314
105. Cohen H, Weinstein WM, Carmel R. The heterogeneity of gastric histology and function in food cobalamin malabsorption: absence of atrophic gastritis and achlorhydria in some patients with severe malabsorption. *Gut* 2000;47(5):638–645
106. Valuck RJ, Ruscin JM. A case-control study on adverse effects: H2 blocker or proton pump inhibitor use and risk of vitamin B12 deficiency in older adults. *J Clin Epidemiol* 2004;57(4):422–428
107. Carmel R, Sarrai, M. Diagnosis and management of clinical and subclinical cobalamin deficiency: advances and controversies. *Curr Hematol Rep* 2006;5(1):23–33
108. Herbert V. The 1986 Herman award lecture. Nutrition science as a continually unfolding story: the folate and vitamin B-12 paradigm. *Am J Clin Nutr* 1987;46(3):387–402
109. Herbert V. Staging vitamin B-12 (cobalamin) status in vegetarians. *Am J Clin Nutr* 1994;59(5 Suppl):1213S–1222S
110. Golding PH. Holotranscobalamin (HoloTC, Active-B12) and Herbert’s model for the development of vitamin B12 deficiency: a review and alternative hypothesis. *Springerplus*. 2016;5(1):668
111. Lindenbaum J, Savage DG, Stabler SP, Allen RH. Diagnosis of cobalamin deficiency: II. Relative sensitivities of serum cobalamin, methylmalonic acid and total homocysteine concentrations. *Am J Hematol* 1990;34(2):99–107

112. Fedosov SN, Brito A, Miller JW, Green R, Allen LH. Combined indicator of vitamin B12 status: modification for missing biomarkers and folate status and recommendations for revised cut-points. *Clin Chem Lab Med* 2015;53(8):1215–1225
113. Bailey RL, Carmel R, Green R, Pfeiffer CM, Cogswell ME, Osterloh JD, Sempos CT, Yetley EA. Monitoring of vitamin B-12 nutritional status in the United States by using plasma methylmalonic acid and serum vitamin B-12. *Am J Clin Nutr* 2011;94(2):552–561
114. Lindenbaum J, Rosenberg IH, Wilson PW, Stabler SP, Allen RH. Prevalence of cobalamin deficiency in the Framingham elderly population. *Am J Clin Nutr* 1994;60(1):2–11
115. Clarke R, Grimley Evans J, Schneede J, Nexo E, Bates C, Fletcher A, Prentice A, Johnston C, Ueland PM, Refsum H, Sherliker P, Birks J, Whitlock G, Breeze E, Scott JM. Vitamin B12 and folate deficiency in later life. *Age Ageing* 2004;33(1):34–41
116. Clarke R, Sherliker P, Hin H, Nexo E, Hvas AM, Schneede J, Birks J, Ueland PM, Emmens K, Scott JM, Molloy AM, Evans JG. Detection of vitamin B12 deficiency in older people by measuring vitamin B12 or the active fraction of vitamin B12, holotranscobalamin. *Clin Chem* 2007;53(5):963–970
117. McLean ED, Allen LH, Neumann CG, Peerson JM, Siekmann JH, Murphy SP, Bwibo NO, Demment MW. Low plasma vitamin B-12 in Kenyan school children is highly prevalent and improved by supplemental animal source foods. *J Nutr* 2007;137(3):676–82
118. Siekmann JH, Allen LH, Bwibo NO, Demment MW, Murphy SP, Neumann CG. Kenyan school children have multiple micronutrient deficiencies, but increased plasma vitamin B-12 is the only detectable micronutrient response to meat or milk supplementation. *J Nutr* 2003;133(11 Suppl 2):3972S–3980S

119. Refsum H, Yajnik CS, Gadkari M, Schneede J, Vollset SE, Orning L, Guttormsen AB, Joglekar A, Sayyad MG, Ulvik A, Ueland PM. Hyperhomocysteinemia and elevated methylmalonic acid indicate a high prevalence of cobalamin deficiency in Asian Indians. *Am J Clin Nutr* 2001;74(2):233–241
120. Kaferle J, Strzoda CE. Evaluation of Macrocytosis. *Am Fam Physician* 2009;79(3):203–208
121. Keenan WF. Macrocytosis as an indicator of human disease. *J Am Board Fam Pract* 1989;2(4):25–26
122. Breedveld FC, Bieger R, van Wermeskerken RKA. The clinical significance of macrocytosis. *Acta Med Scand* 1981;209(4):319–322
123. Spivack JL. Masked megaloblastic anemia. *Arch Intern Med* 1982;142(12):2111–2114
124. Carmel R. Pernicious anemia. The expected findings of very low serum cobalamin levels, anemia, and macrocytosis are often lacking. *Arch Intern Med* 1988;148(8):1712–1714
125. Green R, Kuhl W, Jacobson RJ, Johnson C, Carmel R, Beutler E. Masking of macrocytosis by  $\alpha$ -thalassemia in blacks with pernicious anemia. *N Engl J Med* 1982;307(21):1322–1325
126. Gloster ES, Strauss RA. More on spurious red blood cell parameters. *Am J Clin Pathol* 1985;84(6):775–776
127. van Duijnhoven HL, Treskes M. Marked interference of hyperglycemia in measurements of mean (red) cell volume by Technicon H analyzers. *Clin Chem* 1996;42(1):76–80
128. Francis DA, Francis JL, Roath OS. Improved assessment of haemoglobin and red cell indices in blood samples with high white cell counts. *Med Lab Sci* 1985;42(3):285–286

129. Dopsaj V, Memon L. Laboratorijska dijagnostika anemija. U: Dopsaj V, urednik. Osnove laboratorijske dijagnostike i lečenja anemija. Drugo izdanje. Beograd: Farmaceutski fakultet u Beogradu, 2012:71–140
130. Oh RC, Holt SN, Hitchcock K, Hoekzema G. How do you evaluate macrocytosis without anemia? *J Fam Pract* 2008;57(8):548–550
131. Chanarin I. *The Megaloblastic Anaemias*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1979
132. Aslinia F, Mazza JJ, Yale SH. Megaloblastic anemia and other causes of macrocytosis. *Clin Med Res* 2006;4(3):236–241
133. Carmel R, Green R, Jacobsen DW, Qian GD. Neutrophil nuclear segmentation in relation to metabolic tests of cobalamin status in mild cobalamin deficiency. *Am J Clin Pathol* 1996;106(1):57–63
134. Vinod Devalia, Malcolm S. Hamilton, Anne M. Molloy, British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and treatment of cobalamin and folate disorders. *Br J Haematol* 2014;166(4):496–513
135. Beckman Coulter. The Coulter Principle (1954–1955). Dostupno na: <https://www.beckman.com/resources/fundamentals/history-of-flow-cytometry/the-coulter-principle> (pristupljeno 10.10.2019.)
136. Longanbach S, Chapman DH, Miers MK. Automated Cell-Counting Instrumentation. Dostupno na: <https://oncohemakey.com/automated-cell-counting-instrumentation/> (pristupljeno 10.10.2019.)
137. Ormerod MG. The Flow Cytometer. In: Ormerod MG, editor. *Flow Cytometry - A Basic Introduction*. Dostupno na: <https://flowbook.denovosoftware.com/> (pristupljeno 10.10.2019.)
138. Xu D. Clinical applications of leukocyte morphological parameters. *Int J Pathol Clin Res* 2015;1:002

139. COULTER® 3-D VCS Technology. Dostupno na: <http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/cyto2/6/coulter/ss000125.htm> (pristupljeno 03.11.2019.)
140. Beckman Coulter. Advancements in Technology: WBC Differential Methodology. UniCel® DxH 800 Coulter® Cellular Analysis System
141. Beckman Coulter. Advancements in Technology: Flow Cytometric Morphology – The Analytical Module. UniCel® DxH 800 Coulter® Cellular Analysis System
142. Chaves F, Tierno B, Xu D. Quantitative determination of neutrophil VCS parameters by the Coulter automated hematology analyzer: new and reliable indicators for acute bacterial infection. *Am J Clin Pathol* 2005;124(3):440–444
143. Chaves F, Tierno B, Xu D. Neutrophil volume distribution width: a new automated hematologic parameter for acute infection. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130(3):378–380
144. Bagdasaryan R, Zhou Z, Tierno B, Rosenman D, Xu D. Neutrophil VCS parameters are superior indicators for acute infection. *Lab Hematol* 2007;13(1):12–16
145. Lee AJ, Kim SG. Mean cell volumes of neutrophils and monocytes are promising markers of sepsis in elderly patients. *Blood Res* 2013;48(3):193–197
146. Mardi D, Fwity B, Lobmann R, Ambrosch A. Mean cell volume of neutrophils and monocytes compared with C-reactive protein, interleukin-6 and white blood cell count for prediction of sepsis and nonsystemic bacterial infections. *Int J Lab Hematol* 2010;32(4):410–418
147. Charafeddine KM, Youssef AM, Mahfouz RA, Saredine DS, Daher RT. Comparison of neutrophil volume distribution width to C-reactive protein and procalcitonin as a proposed new marker of acute infection. *Scand J Infect Dis* 2011;43(10):777–784

148. Zhu Y, Cao X, Chen Y, Zhang K, Wang Y, Yuan K, Xu D. Neutrophil cell population data: useful indicators for postsurgical bacterial infection. *Int J Lab Hematol* 2012;34(3):295–299
149. Zhu Y, Cao X, Zhang K, Xie W, Xu D, Zhong C. Delta mean neutrophil volume ( $\Delta$ MNV) is comparable to procalcitonin for predicting postsurgical bacterial infection. *J Clin Lab Anal* 2014;28(4):301–305
150. Crouser EC, Parrillo JE, Seymour C, Angus DC, Bicking K, Tejedor L, Magari R, Careaga D, Williams J, Closser DR, Samoszuk M, Herren L, Robart E, Chaves F. Improved Early Detection of Sepsis in the ED with a Novel Monocyte Distribution Width Biomarker. *Chest* 2017;152(3):518–526
151. Zhu Y, Cao X, Xu D. Detection of morphologic changes in peripheral mononuclear cells in hepatitis B virus infection using the beckman coulter LH750. *Lab Hematol* 2011;17(3):22–26
152. Silva M, Fourcade C, Fartoukh C, Lenormand B, Buchonnet G, Callat MP, Leclerc C, Basuyau JP, Vasse M. Lymphocyte volume and conductivity indices of the haematology analyser Coulter GEN.S in lymphoproliferative disorders and viral diseases. *Clin Lab Haematol* 2006;28(1):1–8
153. Zhu Y, Cao X, Tao G, Xie W, Hu Z, Xu D. The lymph index: a potential hematological parameter for viral infection. *Int J Infect Dis* 2013;17(7):490–493
154. Fourcade C, Casbas MJ, Belaouni H, Gonzalez JJ, Garcia PJ, Pepio MA. Automated detection of malaria by means of the haematology analyser Coulter GEN.S. *Clin Lab Haematol* 2004;26(6):367–372
155. Sharma P, Bhargava M, Sukhachev D, Datta S, Wattal C. LH750 hematology analyzers to identify malaria and dengue and distinguish them from other febrile illnesses. *Int J Lab Hematol*. *Int J Lab Hematol* 2014;36(1):45–55

156. Miguel A, Orero M, Simon R, Collado R, Perez PL, Pacios A, Iglesias R, Martinez A, Carbonell F. Automated neutrophil morphology and its utility in the assessment of neutrophil dysplasia. *Lab Hematol* 2007;13(3):98–102
157. Virk H, Varma N, Naseem S, Bihana I, Sukhachev D. Utility of cell population data (VCS parameters) as a rapid screening tool for Acute Myeloid Leukemia (AML) in resource-constrained laboratories. *J Clin Lab Anal* 2019;33(2):e22679
158. Xu D. Neutrophil volume index: a useful neutrophil size parameter. *Int Jnl Lab Hem* 2011;33(Suppl. 1):78
159. Neal A, Simon-Lopez R, Barella S. Use of Neutrophil Cell Population Data for the Detection of Neutrophil Hypergranulation and Other Neutrophil Inclusions As Dohle Bodies, Cytoplasm Vacuolation. *Blood* 2014;124(21):4966
160. 510(k) Substantial equivalence determination decision summary. Dostupno na: [https://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/reviews/K181599.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K181599.pdf) (pristupljeno 12.10.2019.)
161. Simon-Lopez R, Sukhacheva E, Tsvetaeva N, Egorova M, Kolenkin S, Achildieva T. High Sensitivity New Parameters for the Detection of Vitamin B12 and Folate Deficiencies. *Blood* 2008;112(11):5379
162. Risch C, Medina P, Nydegger UE, Bahador Z, Brinkmann T, Von Landenberg P, Risch M, Risch L. The relationship of leukocyte anisocytosis to holotranscobalamin, a marker of cobalamin deficiency. *Int J Lab Hematol* 2012;34(2):192–200
163. Hamilton HE, Sheets RF, DeGowin EL. Studies with inagglutinable erythrocyte counts: VII. Further investigation of the hemolytic mechanism in untreated pernicious anemia and the demonstration of a hemolytic property in the plasma. *J Lab Clin Med* 1958;51(6):942–955



164. Nexo E, Hoffmann-Lücke E. Holotranscobalamin, a marker of vitamin B-12 status: analytical aspects and clinical utility. *Am J Clin Nutr* 2011;94(suppl):359S–365S
165. Green R. Indicators for assessing folate and vitamin B12 status and for monitoring the efficacy of intervention strategies. *Food Nutr Bull* 2008;29(2 Suppl):S52–63
166. Savage DG, Lindenbaum J, Stabler SP, Allen RH. Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. *Am J Med* 1994;96(3):239–246
167. Harrington DJ. Holotranscobalamin: in the middle of difficulty lies opportunity. *Clin Chem Lab Med* 2016;54(9):1407–1409
168. Kolhouse JF, Kondo H, Allen NC, Podell E, Allen RH. Cobalamin analogues are present in human plasma and can mask cobalamin deficiency because current radioisotope dilution assays are not specific for true cobalamin. *N Engl J Med* 1978;299(15):785–792
169. Bock JL, Eckfeldt JH. Advances in standardization of laboratory measurement procedures: implications for measuring biomarkers of folate and vitamin B-12 status in NHANES. *Am J Clin Nutr* 2011;94(1):332S–336S
170. Harrington DJ. Laboratory assessment of vitamin B12 status. *J Clin Pathol* 2017;70(2):168–173
171. NIST. Development of Standard Reference Materials for Vitamins B6 and B12 in Human Serum. Dostupno na: <https://www.nist.gov/programs-projects/development-standard-reference-materials-vitamins-b6-and-b12-human-serum> (pristupljeno 13.10.2019.)
172. Nexo E. Variation with age of reference values for P-cobalamins. *Scand J Haematol* 1983;30(5):430–432

173. Fernandes-Costa F, van Tonder S, Metz J. A sex difference in serum cobalamin and transcobalamin levels. *Am J Clin Nutr* 1985;41(4):784–786
174. Margalit I, Cohen E, Goldberg E, Krause I. Vitamin B12 Deficiency and the Role of Gender: A Cross-Sectional Study of a Large Cohort. *Ann Nutr Metab* 2018;72(4):265–271
175. Björkegren K, Svärdsudd K. Serum cobalamin, folate, methylmalonic acid and total homocysteine as vitamin B12 and folate tissue deficiency markers amongst elderly Swedes--a population-based study. *J Intern Med* 2001;249(5):423–432
176. Carmel R, Green R, Jacobsen DW, Rasmussen K, Florea M, Azen C. Serum cobalamin, homocysteine and methylmalonic acid concentrations in a multiethnic elderly population: ethnic and sex differences in cobalamin and metabolite abnormalities. *Am J Clin Nutr* 1999;70(5):904–910
177. McMahon GM, Hwang SJ, Tanner RM, Jacques PF, Selhub J, Muntner P, Fox CS. The association between vitamin B12, albuminuria and reduced kidney function: an observational cohort study. *BMC Nephrol* 2015;16:7
178. Carmel R. Current concepts in cobalamin deficiency. *Annu Rev Med* 2000;51:357–375
179. Metz J, McGrath K, Bennett M, Hyland K, Bottiglieri T. Biochemical indices of vitamin B12 nutrition in pregnant patients with subnormal serum vitamin B12 levels. *Am J Hemat* 1995;48(4):251–255
180. Morkbak AL, Hvas AM, Milman N, Nexø E. Holotranscobalamin remains unchanged during pregnancy. Longitudinal changes of cobalamins and their binding proteins during pregnancy and post partum. *Haematologica* 2007;92(12):1711–1712
181. Murphy MM, Molloy AM, Ueland PM, Fernandez-Ballart JD, Schneede J, Arija V, Scott JM. Longitudinal Study of the Effect of Pregnancy on Maternal and

- Fetal Cobalamin Status in Healthy Women and Their Offspring. *J Nutr* 2007;137(8):1863–1867
182. Snow CF. Laboratory diagnosis of vitamin B12 and folate deficiency: a guide for the primary care physician. *Arch Intern Med* 1999;159(12):1289–1298
  183. van Asselt DZ, de Groot LC, van Staveren WA, Blom HJ, Wevers RA, Biemond I, Hoefnagels WH. Role of cobalamin intake and atrophic gastritis in mild cobalamin deficiency in older Dutch subjects. *Am J Clin Nutr* 1998;68(2):328–334
  184. Pennypacker LC, Allen RH, Kelly JP, Matthews LM, Grigsby J, Kaye K, Lindenbaum J, Stabler SP. High prevalence of cobalamin deficiency in elderly outpatients. *J Am Geriatr Soc* 1992;40(12):1197–11204
  185. Drammeh BS, Schleicher RL, Pfeiffer CM, Jain RB, Zhang M, Nguyen PH. Effects of delayed sample processing and freezing on serum concentrations of selected nutritional indicators. *Clin Chem* 2008;54(11):1883–1891
  186. Lowrey I, Smith G. Elevated results in a vitamin B12 assay when using serum separator blood collection tubes. *Ann Clin Biochem* 2003;40(Pt 5):560–562
  187. Brokner M, Hager HB, Lindberg M. Biological variation of holotranscobalamin and cobalamin in healthy individuals. *Scand J Clin Lab Invest* 2017;77(6):433–436
  188. Arendt JFB, Nexo E. Cobalamin Related Parameters and Disease Patterns in Patients with Increased Serum Cobalamin Levels. *PLoS One* 2012;7(9):e45979
  189. Bowen RA, Dowdell KC, Dale JK, Drake SK, Fleisher TA, Hortin GL, Remaley AT, Nexo E, Rao VK. Elevated vitamin B12 levels in autoimmune lymphoproliferative syndrome attributable to elevated haptocorrin in lymphocytes. *Clin Biochem* 2012;45(6):490–492

190. Carmel R, Vasireddy H, Aurangzeb I, George K. High serum cobalamin levels in the clinical setting: clinical associations and holo-transcobalamin changes. *Clin Lab Haematol* 2001;23(6):365–371
191. Carmel R. Ethnic and racial factors in cobalamin metabolism and its disorders. *Semin Hematol* 1999;36(1):88–100
192. Hazra A, Kraft P, Selhub J, Giovannucci EL, Thomas G, Hoover RN, Chanock SJ, Hunter DJ. Common variants of FUT2 are associated with plasma vitamin B12 levels. *Nat Genet* 2008;40(10):1160–1162
193. Hamilton MS, Blackmore S, Lee A. Possible cause of false normal B-12 assays. *BMJ* 2006;333(7569):654–655
194. Carmel R, Agrawal Y P. Failures of cobalamin assays in pernicious anemia. *N Engl J Med* 2012;367(4):385–386
195. Shojania AM. Physician's management of suspected vitamin B12 deficiency. *Can Med Assoc J* 1980;123(11):1127–1130
196. Carmel R. R-binder deficiency: A clinically benign cause of cobalamin pseudodeficiency. *JAMA* 1983;250(14):1886–1890
197. Carmel R, Parker J, Kelman Z. Genomic mutations associated with mild and severe deficiencies of transcobalamin I (haptocorrin) that cause mildly and severely low serum cobalamin levels. *Br J Haematol* 2009;147(3):386–391
198. Carmel R. Mild transcobalamin I (haptocorrin) deficiency and low serum cobalamin concentrations. *Clin Chem* 2003;49(8):1367–1374
199. Aśok AC. Evidence for potential underestimation of clinical folate deficiency in resource-limited countries using blood tests. *Nutr Rev* 2017;75(8):600–615
200. Nixon PF, Bertino JR. Impaired utilization of serum folate in pernicious anemia. A study with radiolabeled 5-methyltetrahydrofolate. *J Clin Invest* 1972;51(6):1431–1439

201. Shojania AM. Oral contraceptives: effect of folate and vitamin B12 metabolism. *Can Med Assoc J* 1982;126(3):244–247
202. Berenson AB, Rahman M. Effect of hormonal contraceptives on vitamin B12 level and the association of the latter with bone mineral density. *Contraception* 2012;86(5):481–487
203. Nexo E, Hoffmann-Lücke E. Holotranscobalamin, a marker of vitamin B-12 status: analytical aspects and clinical utility. *Am J Clin Nutr* 2011;94(1):359S–365S
204. Lindemans J, Schoester M, van Kapel J. Application of a simple immunoadsorption assay for the measurement of saturated and unsaturated transcobalamin II and R-binders. *Clin Chim Acta* 1983;132(1):53–61
205. Carmel R. Measuring and interpreting holo-transcobalamin (holo-transcobalamin II). *Clin Chem* 2002;48(3):407–409
206. Ulleland M, Eilertsen I, Quadros EV, Rothenberg SP, Fedosov SN, Sundrehagen E, Orning L. Direct assay for cobalamin bound to transcobalamin (holo-transcobalamin) in serum. *Clin Chem* 2002;48(3):526–532
207. Nexo E, Christensen AL, Hvas AM, Petersen TE, Fedosov S. Quantification of holo-transcobalamin, a marker of vitamin B12 deficiency. *Clin Chem* 2002;48(3):561–562
208. Brady J, McGregor L, Valente E, Orning L. Active B12: a rapid, automated assay for holotranscobalamin on the Abbott AxSYM analyzer. *Clin Chem* 2008;54(3):567–573
209. Nexo E, Christensen AL, Petersen TE, Fedosov SN. Measurement of transcobalamin by ELISA. *Clin Chem* 2000;46(10):1643–1649
210. Risch M, Meier DW, Sakem B, Medina Escobar P, Risch C, Nydegger U, Risch L. Vitamin B12 and folate levels in healthy Swiss senior citizens: a prospective

- study evaluating reference intervals and decision limits. *BMC Geriatr* 2015;15:82
211. Miller JW, Garrod MG, Rockwood AL, Kushnir MM, Allen LH, Haan MN, Green R. Measurement of total vitamin B12 and holotranscobalamin, singly and in combination, in screening for metabolic vitamin B12 deficiency. *Clin Chem* 2006;52(2):278–285
  212. Bamonti F, Moscato GA, Novembrino C, Gregori D, Novi C, De Giuseppe R, Galli C, Uva V, Lonati S, Maiavacca R. Determination of serum holotranscobalamin concentrations with the AxSYM active B12 assay: Cut-off point evaluation in the clinical laboratory. *Clin Chem Lab Med* 2010;48(2):249–253
  213. Refsum H, Johnston C, Guttormsen AB, Nexø E. Holotranscobalamin and total transcobalamin in human plasma: determination, determinants, and reference values in healthy adults. *Clin Chem* 2006;52(1):129–137
  214. Thorpe SJ, Rigsby P, Roberts G, Lee A, Hamilton M, Craig D. An International Standard for holotranscobalamin (holoTC): international collaborative study to assign a holoTC value to the International Standard for vitamin B12 and serum folate. *Clin Chem Lab Med* 2016;54(9):1467–1472
  215. Sobczynska-Malefora A, Gorska R, Pelisser M, Ruwona P, Witchlow B, Harrington DJ. An audit of holotranscobalamin (“Active” B12) and methylmalonic acid assays for the assessment of vitamin B12 status: application in a mixed patient population. *Clin Biochem* 2014;47(1–2):82–86
  216. Heil SG, de Jonge R, de Rotte MC, van Wijnen M, Heiner-Fokkema RM, Kobold AC, Pekelharing JM, Adriaansen HJ, Sanders E, Trienekens PH, Rammeloo T, Lindemans J. Screening for metabolic vitamin B12 deficiency by holotranscobalamin in patients suspected of vitamin B12 deficiency: a multicentre study. *Ann Clin Biochem* 2012;49(Pt 2):184–189

217. Miller JW, Ramos MI, Garrod MG, Flynn MA, Green R. Transcobalamin II 775G>C polymorphism and indices of vitamin B12 status in healthy older adults. *Blood* 2002;100(2):718–720
218. Namour F, Olivier J, Abdelmouttaleb I, Adjalla C, Debard R, Salvat C, Guéant J. Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. *Blood* 2001;97(4):1092–1098
219. Zetterberg H, Nexö E, Regland B, Minthon L, Boson R, Palmér M, Rymo L, Blennow K. The transcobalamin (TC) codon 259 genetic polymorphism influences holo-TC concentration in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer disease. *Clin Chem* 2003;49(7):1195–1198
220. Sobczyńska-Malefora A, Pangilinan F, Plant GT, Velkova A, Harrington DJ, Molloy AM, Brody LC. Association of a transcobalamin II genetic variant with falsely low results for the holotranscobalamin immunoassay. *Eur J Clin Invest* 2016;46(5):434–439
221. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993;39(9):1764–1779
222. Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexö E, Clarke R, McPartlin J, Johnston C, Engbaek F, Schneede J, McPartlin C, Scott JM. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* 2004;50(1):3–32
223. Rasmussen K, Moller J. Methodologies of testing. In: Carmel R, Jacobsen DW, editors. *Homocysteine in Health and Disease*. Cambridge: Cambridge University Press, 2001:199–211
224. Kataoka H, Takagi K, Makita M. Determination of total plasma homocysteine and related aminothiols by gas chromatography with flame photometric detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995;664(2):421–425

225. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH. Quantitation of total homocysteine, total cysteine, and methionine in normal serum and urine using capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 1987;162(1):185–196
226. Magera MJ, Lacey JM, Casetta B, Rinaldo P. Method for the determination of total homocysteine in plasma and urine by stable isotope dilution and electron spray tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 1999;41(9):1517–1522
227. Pfeiffer CM, Twite D, Shih J, Holets-McCormack SR, Gunter EW. Method Comparison for Total Plasma Homocysteine between the Abbott IMx Analyzer and an HPLC Assay with Internal Standardization. *Clin Chem* 1999;45(1):152–153
228. Pfeiffer CM, Huff DL, Smith SJ, Miller DT, Gunter EW. Comparison of plasma total homocysteine measurements in 14 laboratories: an international study. *Clin Chem* 1999;45(8 Pt 1):1261–1268
229. Nexø E, Engbaek F, Ueland PM, Westby C, O'Gorman P, Johnston C, Kase BF, Guttormsen AB, Alfheim I, McPartlin J, Smith D, Møller J, Rasmussen K, Clarke R, Scott JM, Refsum H. Evaluation of novel assays in clinical chemistry: quantification of plasma total homocysteine. *Clin Chem* 2000;46(8 Pt 1):1150–1156
230. Huijgen HJ, Tegelaers FP, Schoenmakers CH, Pronk-Admiraal CJ, Ekema S. Multicenter analytical evaluation of an enzymatic method for the measurement of plasma homocysteine and comparison with HPLC and immunochemistry. *Clin Chem* 2004;50(5):937–941
231. Hanson NQ, Eckfeldt JH, Schwichtenberg K, Aras O, Tsai MY. Interlaboratory variation of plasma total homocysteine measurements: results of three successive homocysteine proficiency testing surveys. *Clin Chem* 2002;48(9):1539–1545



232. JCTLM. Database of higher-order reference materials, measurement methods/procedures and services. Dostupno na: <https://www.bipm.org/jctlm/home.do> (pristupljeno 18.10.2019.)
233. National Institute of Standards and Technology. Certificate of Analysis. Standard Reference Material® 1955, Homocysteine and Folate in Frozen Human Serum. Dostupno na: <https://www-s.nist.gov/srmors/certificates/archives/1955.pdf> (pristupljeno 18.10.2019.)
234. Satterfield MB, Sniegowski LT, Welch MJ, Nelson BC, Pfeiffer CM. Comparison of isotope dilution mass spectrometry methods for the determination of total homocysteine in plasma and serum. *Anal Chem* 2003;75(17):4631–4638
235. Satterfield MB, Sniegowski LT, Sharpless KE, Welch MJ, Hornikova A, Zhang NF, Pfeiffer CM, Fazili Z, Zhang M, Nelson BC. Development of a new standard reference material: SRM 1955 (homocysteine and folate in human serum). *Anal Bioanal Chem* 2006;385(3):612–622
236. Nelson BC, Pfeiffer CM, Sniegowski LT, Satterfield MB. Development and evaluation of an isotope dilution LC/MS method for the determination of total homocysteine in human plasma. *Anal Chem* 2003;75(4):775–784
237. Andersson A, Isaksson A, Hultberg B. Homocysteine export from erythrocytes and its implication for plasma sampling. *Clin Chem* 1992;38(7):1311–1315
238. 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(10):1048–1051
239. Allen RH, Stabler SP, Savage DG, Lindenbaum J. Diagnosis of cobalamin deficiency. I. Usefulness of serum methylmalonic acid and total homocysteine levels. *Am J Hematol* 1990;34(2):90–98

240. Lewerin C, Ljungman S, Nilsson-Ehle H. Glomerular filtration rate as measured by serum cystatin C is an important determinant of plasma homocysteine and serum methylmalonic acid in the elderly. *J Intern Med* 2007;261(1):65–73
241. Sobczyńska-Malefora A, Harrington DJ, Voong K, Shearer MJ. Plasma and red cell reference intervals of 5-methyltetrahydrofolate of healthy adults in whom biochemical functional deficiencies of folate and vitamin B12 had been excluded. *Adv Hematol* 2014;2014:465623
242. Cox EV, White AM. Methylmalonic acid excretion: index of vitamin B12 deficiency. *Lancet* 1962;2(7261):853–856
243. Norman EJ, Berry HK, Denton MD. Identification and quantitation of urinary dicarboxylic acids as their dicyclohexyl esters in disease states by gas chromatography mass spectrometry. *Biomed Mass Spectrom* 1979;6(12):546–553
244. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J. Assay of methylmalonic acid in the serum of patients with cobalamin deficiency using capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Invest* 1986;77(5):1606–1612
245. Rasmussen K. Solid-phase sample extraction for rapid determination of methylmalonic acid in serum and urine by a stable-isotope-dilution method. *Clin Chem* 1989;35(2):260–264. Erratum in: *Clin Chem* 1990;36(8):1530
246. Schneede J, Ueland PM. Automated assay of methylmalonic acid in serum and urine by derivatization with 1-pyrenyldiazomethane, liquid chromatography, and fluorescence detection. *Clin Chem* 1993;39(3):392–399
247. Schneede J, Ueland PM. Application of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for routine determination of methylmalonic acid in human serum. *Anal Chem* 1995;67(5):812–819
248. Yetley EA, Pfeiffer CM, Phinney KW, Bailey RL, Blackmore S, Bock JL, Brody LC, Carmel R, Curtin LR, Durazo-Arvizu RA, Eckfeldt JH, Green R, Gregory

- JF 3rd, Hoofnagle AN, Jacobsen DW, Jacques PF, Lacher DA, Molloy AM, Massaro J, Mills JL, Nexo E, Rader JI, Selhub J, Sempos C, Shane B, Stabler S, Stover P, Tamura T, Tedstone A, Thorpe SJ, Coates PM, Johnson CL, Picciano MF. Biomarkers of vitamin B-12 status in NHANES: a roundtable summary. *Am J Clin Nutr* 2011;94(1):313S–321S
249. Kahna SB, Williamsa WJ, Barnessa LA, Younga D, Shafera B, Vivacquaa RJ, Beauprea EM. Methylmalonic acid excretion: A sensitive indicator of vitamin B12 deficiency. *J Lab Clin Med* 1965;66(1):75–83
250. Vogiatzoglou A, Oulhaj A, Smith AD, Nurk E, Drevon CA, Ueland PM, Vollset SE, Tell GS, Refsum H. Determinants of plasma methylmalonic acid in a large population: implications for assessment of vitamin B12 status. *Clin Chem* 2009;55(12):2198–21206
251. Sentongo TA, Azzam R, Charrow J. Vitamin B12 status, methylmalonic acidemia and bacterial overgrowth in short bowel syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009;48(4):495–497
252. Milman N, Byg KE, Bergholt T, Eriksen L, Hvas AM. Cobalamin status during normal pregnancy and postpartum: a longitudinal study comprising 406 Danish women. *Eur J Haematol* 2006;76(6):521–525
253. Choi R, Choi S, Lim Y, Cho YY, Kim HJ, Kim SW, Chung JH, Oh SY, Lee SY. A Prospective Study on Serum Methylmalonic Acid and Homocysteine in Pregnant Women. *Nutrients* 2016;8(12). pii: E797
254. Bae S, West AA, Yan J, Jiang X, Perry CA, Malysheva O, Stabler SP, Allen RH, Caudill MA. Vitamin B-12 status differs among pregnant, lactating, and control women with equivalent nutrient intakes. *J Nutr* 2015;145(7):1507–1514
255. Rasmussen K, Nathan E. The clinical evaluation of cobalamin deficiency by determination of methylmalonic acid in serum or urine is not invalidated by the presence of heterozygous methylmalonic-acidaemia. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990;28(6):419–421

256. Molloy AM, Pangilinan F, Mills JL, Shane B, O'Neill MB, McGaughey DM, Velkova A, Abaan HO, Ueland PM, McNulty H, Ward M, Strain JJ, Cunningham C, Casey M, Cropp CD, Kim Y, Bailey-Wilson JE, Wilson AF, Brody LC. A common polymorphism in HIBCH influences methylmalonic acid concentrations in blood independently of cobalamin. *Am J Hum Genet* 2016;98(5):869–882
257. Valayannopoulos V, Haudry C, Serre V, Barth M, Boddaert N, Arnoux JB, Cormier-Daire V, Rio M, Rabier D, Vassault A, Munnich A, Bonnefont JP, de Lonlay P, Rötig A, Lebre AS. New SUCLG1 patients expanding the phenotypic spectrum of this rare cause of mild methylmalonic aciduria. *Mitochondrion* 2010;10(4):335–341
258. Ganji V, Kafai MR. Population Reference Values for Serum Methylmalonic Acid Concentrations and Its Relationship with Age, Sex, Race-Ethnicity, Supplement Use, Kidney Function and Serum Vitamin B12 in the Post-Folic Acid Fortification Period. *Nutrients* 2018;10(1). pii: E74
259. Rasmussen K, Møller J, Lyngbak M, Pedersen AM, Dybkjaer L. Age- and gender-specific reference intervals for total homocysteine and methylmalonic acid in plasma before and after vitamin supplementation. *Clin Chem* 1996;42(4):630–636
260. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. *Am J Clin Nutr* 2007;85(1):193–200
261. Hvas AM, Lous J, Ellegaard J, Nexø E. Use of plasma methylmalonic acid in diagnosing vitamin B-12 deficiency in general practice. *Scand J Prim Health Care* 2002;20(1):57–59
262. Fedosov SN. Metabolic signs of vitamin B(12) deficiency in humans: computational model and its implications for diagnostics. *Metabolism* 2010;59(8):1124–1138

263. Zuckier LS, Chervu LR. Schilling evaluation of pernicious anemia: current status. *J Nucl Med* 1984;25(9):1032–1039
264. Schilling RF. Intrinsic factor studies. II. The effect of gastric juice on the urinary excretion of radioactivity after the oral administration of radioactive vitamin B12. *J Lab Clin Med* 1953;42(6):860–866
265. International Committee for Standardization in Haematology. Recommended method for the measurement of vitamin B12 absorption. *J Nucl Med* 1981;22(12):1091–1093
266. Fairbanks VF, Wahner HW, Phylidy RL. Tests for pernicious anemia: The Schilling test. *Mayo Clin Proc* 1983;58(8):541–544
267. Von Castel-Roberts KM, Morkbak AL, Nexo E, Edgemon CA, Maneval DR, Shuster JJ, Valentine JF, Kauwell GP, Bailey LB. Holo-transcobalamin is an indicator of vitamin B-12 absorption in healthy adults with adequate vitamin B-12 status. *Am J Clin Nutr* 2007;85(4):1057–1061
268. Hvas AM, Morkbak AL, Nexo E. Plasma holotranscobalamin compared with plasma cobalamins for assessment of vitamin B12 absorption; optimisation of a non-radioactive vitamin B12 absorption test (CobaSorb). *Clin Chim Acta* 2007;376(1–2):150–154
269. Bor MV, Cetin M, Aytac S, Altay C, Nexo E. Nonradioactive vitamin B12 absorption test evaluated in controls and in patients with inherited malabsorption of vitamin B12. *Clin Chem* 2005;51(11):2151–2155
270. Hvas AM, Morkbak AL, Hardlei TF, Nexo E. The vitamin B12 absorption test, CobaSorb, identifies patients not requiring vitamin B12 injection therapy. *Scand J Clin Lab Invest* 2011;71(5):432–438
271. Hardlei TF, Morkbak AL, Bor MV, Bailey LB, Hvas AM, Nexo E. Assessment of vitamin B(12) absorption based on the accumulation of orally administered cyanocobalamin on transcobalamin. *Clin Chem* 2010;56(3):432–436

272. Bhat DS, Thuse NV, Lubree HG, Joglekar CV, Naik SS, Ramdas LV, Johnston C, Refsum H, Fall CH, Yajnik CS. Increases in plasma holotranscobalamin can be used to assess vitamin B-12 absorption in individuals with low plasma vitamin B-12. *J Nutr* 2009;139(11):2119–2123
273. Hvas AM, Buhl H, Laursen NB, Hesse B, Berglund L, Nexø E. The effect of recombinant human intrinsic factor on the uptake of vitamin B12 in patients with evident vitamin B12 deficiency. *Haematologica* 2006;91(6):805–808
274. Carkeet C, Dueker SR, Lango J, Buchholz BA, Miller JW, Green R, Hammock BD, Roth JR, Anderson PJ. Human vitamin B12 absorption measurement by accelerator mass spectrometry using specifically labeled <sup>14</sup>C-cobalamin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(15):5694–5699. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(27):10526
275. Metz J, Kelly A, Swett VC, Waxman S, Herbert V. Deranged DNA synthesis by bone marrow from vitamin B12-deficient humans. *Br J Haematol* 1968;14(6):575–592
276. Metz J. The deoxyuridine suppression test. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1984;20(3):205–241
277. Das KC, Manusselis C, Herbert V. In vitro DNA synthesis by bone marrow cells and PHA-stimulated lymphocytes. Suppression by nonradioactive thymidine of the incorporation of <sup>3</sup>H-deoxyuridine into DNA: enhancement of incorporation when inadequate vitamin B12 or folate is corrected. *Br J Haematol* 1980;44(1):51–63
278. Das D, Garawal G, Mohanty D. Derangement of DNA synthesis in erythroleukaemia: Normal deoxyuridine suppression and impaired thymidine incorporation in bone marrow culture. *Acta Haematol* 1980;64(3):121–130
279. Toh BH. Diagnosis and classification of autoimmune gastritis. *Autoimmun Rev* 2014;13(4–5):459–462

280. Khan S, Del-Duca C, Fenton E, Holding S, Hirst J, Dore PC, Sewell WA. Limited value of testing for intrinsic factor antibodies with negative gastric parietal cell antibodies in pernicious anaemia. *J Clin Pathol* 2009;62(5):439–441
281. Slingerland DW, Cardarelli JA, Burrows BA, Miller A. The Utility of Serum Gastrin Levels in Assessing the Significance of Low Serum B12 Levels. *Arch Intern Med* 1984;144(6):1167–1168
282. Shackleton PJ, Fish DI, Dawson DW. Intrinsic factor antibody tests. *J Clin Pathol* 1989;42(2):210–212
283. Waters HM, Smith C, Howarth JE, Dawson DW, Delamore IW. New enzyme immunoassay for detecting total, type I, and type II intrinsic factor antibodies. *J Clin Pathol* 1989;42(3):307–312
284. Toh BH, van Driel IR, Gleeson PA. Pernicious anemia. *N Engl J Med* 1997;337(20):1441–1448
285. McNulty H, Pentieva K. Folate bioavailability. *Proc Nutr Soc* 2004;63(4):529–536
286. Joelson DW, Fiebig EW, Wu AH. Diminished need for folate measurements among indigent populations in the post folic acid supplementation era. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131(3):477–480
287. Drogan D, Klipstein-Grobusch K, Wans S, Luley C, Boeing H, Dierkes J. Plasma folate as marker of folate status in epidemiological studies: the European Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam study. *Br J Nutr* 2004;92(3):489–496
288. Yetley EA, Pfeiffer CM, Phinney KW, Fazili Z, Lacher DA, Bailey RL, Blackmore S, Bock JL, Brody LC, Carmel R, Curtin LR, Durazo-Arvizu RA, Eckfeldt JH, Green R, Gregory JF 3rd, Hoofnagle AN, Jacobsen DW, Jacques PF, Molloy AM, Massaro J, Mills JL, Nexo E, Rader JI, Selhub J, Sempos C,

- Shane B, Stabler S, Stover P, Tamura T, Tedstone A, Thorpe SJ, Coates PM, Johnson CL, Picciano MF. Biomarkers of folate status in NHANES: a roundtable summary. *Am J Clin Nutr* 2011;94(1):303S–312S
289. Shane B. Folate status assessment history: implications for measurement of biomarkers in NHANES. *Am J Clin Nutr* 2011;94(1):337S–342S
290. Nakazato M, Maeda T, Emura K, Maeda M, Tamura T. Blood folate concentrations analyzed by microbiological assay and chemiluminescent immunoassay methods. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2012;58(1):59–62
291. Pfeiffer CM, Fazili Z, McCoy L, Zhang M, Gunter EW. Determination of folate vitamers in human serum by stable-isotope-dilution tandem mass spectrometry and comparison with radioassay and microbiologic assay. *Clin Chem* 2004;50(2):423–432
292. Thorpe SJ, Heath A, Blackmore S, Lee A, Hamilton M, O’Broin S, Nelson BC, Pfeiffer C. International Standard for serum vitamin B12 and serum folate: international collaborative study to evaluate a batch of lyophilised serum for B12 and folate content. *Clin Chem Lab Med* 2007;45(3):380–386
293. Blackmore S, Pfeiffer CM, Lee A, Fazili Z, Hamilton MS. Isotope dilution-LC-MS/MS reference method assessment of serum folate assay accuracy and proficiency testing consensus mean. *Clin Chem* 2011;57(7):986–994
294. Thorpe SJ, Sands D, Heath AB, Hamilton MS, Blackmore S, Barrowcliffe T. An International Standard for whole blood folate: evaluation of a lyophilised haemolysate in an international collaborative study. *Clin Chem Lab Med* 2004;42(5):533–539
295. Bain BJ, Wickramasinghe SN, Broom GN, Litwinczuk RA, Sims J. Assessment of the value of a competitive protein binding radioassay of folic acid in the detection of folic acid deficiency. *J Clin Pathol* 1984;37(8):888–894



296. Omer A. Factors influencing the release of assayable folate from erythrocytes. *J Clin Pathol* 1969;22(2):217–221
297. Gibson RS. Assessment of folate and vitamin B12 status. In: Gibson RS, editor. *Principles of nutritional assessment*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 2005:601
298. Phekoo K, Williams Y, Schey SA, Andrews VE, Dudley JM, Hoffbrand AV. Folate assays: serum or red cell? *J R Coll Physicians Lond* 1997;31(3):291–295
299. Galloway M, Rushworth L. Red cell or serum folate? Results from the National Pathology Alliance benchmarking review. *J Clin Pathol* 2003;56(12):924–926
300. Farrell CJ, Kirsch SH, Herrmann M. Red cell or serum folate: what to do in clinical practice? *Clin Chem Lab Med* 2013;51(3):555–569
301. Klee GG. Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B(12) and folate. *Clin Chem* 2000;46(8 Pt 2):1277–1283
302. Vinker S, Krantman E, Shani M, Nakar S. Low clinical utility of folate determinations in primary care setting. *Am J Manag Care* 2013;19(3):100–105
303. WHO. Serum and red blood cell folate concentrations for assessing folate status in populations. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva: World Health Organization; 2015. Dostupno na: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162114/1/WHO\\_NMH\\_NHD\\_EPG\\_15\\_01.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162114/1/WHO_NMH_NHD_EPG_15_01.pdf?ua=1) (pristupljeno 26.10.2019.)
304. Nutritional anaemias. Report of a WHO scientific group. Geneva: World Health Organization; 1968 (WHO Technical Report Series, No. 405). Dostupno na: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_405.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_405.pdf) (pristupljeno 26.10.2019.)
305. Nutritional anaemias. Report of a WHO group of experts. Geneva: World Health Organization; 1972 (WHO Technical Report Series, No. 503). Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/40977> (pristupljeno 26.10.2019.)

306. Control of nutritional anaemia with special reference to iron deficiency. Report of an IAEA/USAID/WHO joint meeting. Geneva: World Health Organization; 1975 (WHO Technical Report Series, No. 580). Dostupno na: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/41172> (pristupljeno 26.10.2019.)
307. Selhub J, Jacques PF, Dallal G, Choumenkovitch S, Rogers G. The use of blood concentrations of vitamins and their respective functional indicators to define folate and vitamin B12 status. *Food Nutr Bull* 2008;29(2 Suppl):S67–S73
308. Stabler SP, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J. Clinical spectrum and diagnosis of cobalamin deficiency. *Blood* 1990;76(5):871–881
309. Allen LH. Vitamin B-12. *Adv Nutr* 2012;3(1):54–55
310. Chan CW, Liu SY, Kho CS, Lau KH, Liang YD, Chu WR, Ma SK. Diagnostic clues to megaloblastic anaemia without macrocytosis. *Int J Lab Hematol* 2007;29(3):163–171
311. Langan RC, Zawistoski KJ. Update on Vitamin B12 Deficiency. *Am Fam Physician* 2011;83(12):1425–1430
312. Oosterhuis WP, Niessen RW, Bossuyt PM, Sanders GT, Sturk A. Diagnostic value of the mean corpuscular volume in the detection of vitamin B12 deficiency. *Scand J Clin Lab Invest* 2000;60(1):9–18
313. Jain R, Kapil M, Gupta GN. MCV should not be the only criteria to order vitamin B12 for anemia under evaluation. *Open Journal of Gastroenterology* 2012;2:187–190
314. Higgins T, Beutler E, Doumas BT. Hemoglobin, iron and bilirubin. In: Burtis AC, Ashwood ER, Bruns ED, editors. *Tietz Textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 4th edition. Missouri: Elsevier Inc, 2006:1191
315. Higgins T, Beutler E, Doumas BT. Hemoglobin, iron and bilirubin. In: Burtis AC, Ashwood ER, Bruns ED, editors. *Tietz Textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*, fourth edition. Missouri: Elsevier Inc, 2006:1189

316. Ulmer DD, Vallee BL, Wacker WE. Metalloenzymes and myocardial infarction. II. Malic and lactic dehydrogenase activities and zinc concentrations in serum. *N Engl J Med*. 1956;255(10):450-456.
317. Jaffe MZ. *Physiol Chem* 1886;10:391
318. Levey AS, Coresh J, Greene T, Marsh J, Stevens LA, Kusek JW, Van Lente F, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration. Expressing the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate with standardized serum creatinine values. *Clin Chem* 2007;53(4):766–772
319. Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, Hogg RJ, Perrone RD, Lau J, Eknoyan G. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med* 2003;139(2):137–147
320. MEDCALC® easy-to-use statistical software. Dostupno na: <https://www.medcalc.org/calc/> (pristupljeno 11.11.2019.)
321. VassarStats: Website for Statistical Computation. Dostupno na: <http://vassarstats.net/> (pristupljeno 11.11.2019.)
322. Cohen JW. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. 2nd ed. New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates, 1988
323. Šimundić AM. Measures of diagnostic accuracy: basic definitions. *EJIFCC* 2009;19(4):203–211
324. WHO/UNICEF/UNU. *Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control, a guide for programme managers*. Geneva, World Health Organization, 2001. Dostupno na: [http://www.who.int/nutrition/publications/en/ida\\_assessment\\_prevention\\_control.pdf](http://www.who.int/nutrition/publications/en/ida_assessment_prevention_control.pdf) (pristupljeno 30.10.2019.)

325. Pfeiffer CM, Caudill SP, Gunter EW, Osterloh J, Sampson EJ. Biochemical indicators of B vitamin status in the US population after folic acid fortification: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000. *Am J Clin Nutr* 2005;82(2):442–450
326. WHO. Serum ferritin concentrations for the assessment of iron status and iron deficiency in populations. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva, World Health Organization, 2011 (WHO/NMH/NHD/MNM/11.2). Dostupno na: [http://www.who.int/vmnis/indicators/serum\\_ferritin.pdf](http://www.who.int/vmnis/indicators/serum_ferritin.pdf)  
(pristupljeno 30.10.2019.)
327. Andrès E, Serraj K, Zhu J, Vermorken AJ. The pathophysiology of elevated vitamin B12 in clinical practice. *QJM* 2013;106(6):505–515
328. Tsagalis G. Renal anemia: a nephrologist's view. *Hippokratia* 2011;15(Suppl 1): 39–43
329. Totoskovic D, Dopsaj V, Martinovic J. Methylmalonic acid and neutrophil morphometric index in laboratory diagnosis of cobalamin deficiency without macrocytosis. *Int J Lab Hematol* 2016;38(3):265–272
330. Totoskovic D, Dopsaj V, Martinovic J. Evaluation of cell population data as potential markers of cobalamin and folate deficiency in populations at risk with regard to renal function. *J Appl Biomed* 2017;15(3):204–209
331. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Anemia Work Group. K DIGO clinical practice guideline for anemia in chronic kidney disease. *Kidney International Supplements* 2012;2(4):288–291
332. Berrak SG, Angaji M, Turkkan E, Canpolat C, Timur C, Eksioglu-Demiralp E. The effects of iron deficiency on neutrophil/monocyte apoptosis in children. *Cell Prolif* 2007;40(5):741–754

333. Özcan A, Çakmak M, Toraman AR, Çolak A, Yazgan H, Demirdöven M, Yoku O, Gürel A. Evaluation of leucocyte and its subgroups in iron deficiency anemia. *International Journal of Medicine and Medical Sciences* 2011;3(5):135–138
334. Westerman DA, Evans D, Metz J. Neutrophil hypersegmentation in iron deficiency anaemia: a case–control study. *Br J Haematol* 1999;107(3):512–515
335. Lim Y, Lee EY, Choi IS, Kim TY, Yoon SS, Kim KW. Leukopenia in Patients with Iron Deficiency Anemia. *Blood* 2011;118(21):5279

## **Biografija**

Dragana Totošković je rođena 24.06.1984. u Leskovcu. Osnovnu školu je završila u Vlasotincu, a srednju školu, gimnaziju „Josif Pančić” u Bajinoj Bašti. Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, smer diplomirani farmaceut-medicinski biohemičar upisala je 2003., a diplomirala 2009. godine sa prosečnom ocenom 9.25 i ocenom 10 za završni rad. Doktorske akademske studije na Farmaceutskom fakultetu, Univerzitet u Beogradu, modul medicinska biohemija, upisala je 2010.

Nakon završetka osnovnih studija obavila je pripravnički staž na Vojnomedicinskoj akademiji. Kao diplomirani farmaceut-medicinski biohemičar radila je u laboratorijama: „Zdravlje” u Sremskoj Mitrovici i Šapcu, na Institutu za reumatologiju u Beogradu, opštoj bolnici „MediGroup”, a kao asistent na predmetu Medicinska biohemija II na Farmaceutskom fakultetu Novi Sad, Univerzitet Privredna akademija u Novom Sadu. Trenutno je zaposlena u laboratoriji DZ Bač u Baču.

Dragana Totošković je autor dva originalna rada objavljena u međunarodnim časopisima. Takođe, autor je 2 posterske prezentacije i bila je jedan od predavača u sklopu foruma mladih istraživača na 14. EFLM Simpozijumu za balkanski region 2018. godine.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Драгана Тошковић

Број индекса 06/10

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Значај биохемијских маркера и морфометријских карактеристика леукоцита у лабораторијској дијагностици судбиничког дефицита витамина B12

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 18.11.2019.

Тошковић

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Драгана Тотошковић

Број индекса 06/10

Студијски програм Докторске академске студије - медуци медицинарске дисциплине

Наслов рада Значај биохемијских маркера и морфометријских карактеристика  
десмосома у лабораторијској дијагностици и судитарици код десмоцитоматозе

Ментор проф. др. sc. Биљана Долић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 18. 11. 2019.

Драгана Тотошковић



## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Значај биохемијских маркера и морфометријских карактеристика  
леукоцитз у лабораторијској дијагностици и судбиничној професији  
вистеминз Б 12  
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

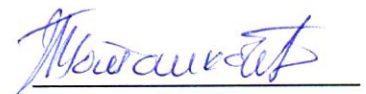
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 18. 11. 2019.



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.