

Praktický diagnostický benefit z rutinního stanovení holotranskobalaminu u pacientů metabolické ambulance

Hyánek J.¹, Hájek Z.³, Dubská L.², Pejznochová H.², Vaingátová S.², Maťoška V.², Hejtmánková J.⁴, Křížová M.⁵, Vondráčková D.⁶, Pehal F.¹, Hoffman R.¹, Matoušková J.⁷, Hyánek T.⁸, Martiníková V.¹, Privarová J.¹

¹Metabolická ambulance Nemocnice Na Homolce, Praha

²Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie Nemocnice Na Homolce, Praha

³Gynekologicko-porodnická klinika VFN a 1. LF UK, Praha

⁴Genet, Oddělení lékařské genetiky, s. r. o., Praha

⁵Interní oddělení Nemocnice Na Homolce, Praha

⁶Neurologické oddělení Nemocnice Na Homolce, Praha

⁷Kardiologické oddělení Nemocnice Na Homolce, Praha

⁸Anesteziologické a resuscitační oddělení Nemocnice Na Homolce, Praha

SOUHRN

Cíl studie: Autoři popisují velice dobré zkušenosti s rutinním stanovením aktivního vitamínu B₁₂ – holotranskobalaminu (HTC) u pacientů odeslaných do metabolické ambulance Nemocnice Na Homolce za posledních 5 let.

Pacienti a metody: Za rok navštíví ambulanci zhruba 1000 dospělých i dětských pacientů s metabolickými poruchami, u kterých je diferenciálnědiagnosticky indikováno vyšetření HTC a stanoveno metodikou MEIA AxSym Active B-12 Assay (Abbott).

Výsledky: Deficit HTC nacházíme kromě makrocytární anémie také u pacientů s nepoznanými neuropsychiatrickými, gastrointestinálními, srdečními a perikoncepčními problémy. Zřetelný deficit HTC je také prokazován při mozkových příhodách, infarktech myokardu, emboliích plicnice, trombóze, tromboembolií, typických i atypických perniciózních anémiích, u mentálního opoždění a kognitivních poruch, u žen trpících dysfertiilitou aj. Vybrané kazuistiky jsou stručně dokumentovány a dokazují, že správná diagnóza byla možná jen díky zavedení tohoto vyšetření do rutinního provozu laboratoře.

Závěr: Autoři doporučují vyšetření HTC u shora uvedených klinických symptomů, protože spolu se stanovením metylmalonátu a homocysteinu dokáže snížená hladina HTC překvapivě objasnit vyvolávající příčinu mnoha různorodých nálezů a určit tu správnou diagnózu či pochopit neočekávané komplikace.

Klíčová slova: aktivní vitamin B₁₂, holotranskobalamin, kobalamin, deficit vitamínu B₁₂.

SUMMARY

Hyánek J., Hájek Z., Dubská L., Pejznochová H., Vaingátová S., Maťoška V., Hejtmánková J., Křížová M., Vondráčková D., Pehal F., Hoffman R., Matoušková J., Hyánek T., Martiníková V., Privarová J.: Practical diagnostic benefit of routine holotranscobalamin estimation in patients from metabolic surgery

Objective: Authors are commenting very good experience with routinely use of holotranscobalamin (HTC) in patients attending the metabolic surgery of Hospital Homolka within last 5 yrs.

Patients and Method: Among 1000 adult or children patients attending yearly the metabolic surgery the typical cases of HTC deficiency were detected in patients with unexplained neurological, psychiatric, gastroenterological, cardiologic, obstetric, nutritional and metabolic symptoms. The MEIA AxSym Active B-12 Assay (Abbott) method was introduced in routine laboratory use instead of total vitamin B-12 estimation.

Results: Typical clinical cases of patients suffering from heart attacks, pulmonary embolism, typical or atypical pernicious anemias as well as in patients with deep vein thrombosis, thromboembolism, in patients with neuronal and perception disorders, in females suffering from fertility disorders are presented in details. All these patients were detected only thanks to introducing of very efficient method for HTC estimation in the routine use in clinical chemical laboratory.

Conclusion: In many typical or atypical clinical cases of known or unknown origin, the estimation of active form of vitamin B-12-HTC together with methylmalonic acid and total homocysteine could be very helpful to find the reason for corresponding diagnosis or complications.

Key words: active vitamin B-12, holotranscobalamin, cobalamin, deficiency of vit. B-12.

Úvod

Kobalamin (Cbl), vitamin B₁₂, m. h. 1357 daltonů, patří do skupiny B vitaminů, ve vodě je rozpustný, v korinovém jádře má podobnou strukturu jako mají porfyriny tj. dvě pyrolová jádra spojená molekulou kobaltu [10]. Je syntetizován pouze bakteriemi. Objevený byl

relativně pozdě a na jeho izolaci a identifikaci se podílí už dvě Nobelovy ceny. Zdaleka přesto nejsou dosud všechny jeho patofyziologické účinky dostatečně prozkoumány. Existuje několik analogů vitamínu B₁₂ biologicky pro člověka neúčinných nebo naopak působících jako antivitaminy, ale např. účinných jako růstový faktor pro bakterie. U lidí účinkuje vitamin B₁₂ jako apoenzym,

specificky vázaný na receptor buňky syntetizující DNA. Nejrozšířenějším a nejdostupnějším komerčním produktem je stabilní kyanokobalamin (CNCbl) červené barvy, získávaný z bakteriálních kultur nebo extrakcí ze stolice, který však nemá žádnou vitaminovou aktivitu. Tu získává až jeho kyanidová skupina buňkou metabolizována na metyl-, adenosyl- nebo hydroxykobalamin. I když největším zdrojem Cbl by mohly být pro člověka vlastní bakterie v distální části tlustého střeva, není tomu tak, protože tam už Cbl nemůže být absorbován a odchází stolicí [8, 10, 23, 25, 32].

Fyziologie a patofyziologie

Jako všechny vitaminy i kobalamin musí být u člověka přijímán potravou z vnějších zdrojů [16]. Nejvydatnějším zdrojem jsou živočišné bílkoviny, ale vstřebávání kobalaminu z nich je velice složitý a snadno zranitelný mechanismus, který v případě nedostatků může být zdrojem celé řady poruch s klinickou manifestací neurologickou, psychiatrickou, hematologickou, gastroenterologickou aj. V živočišných bílkovinách je Cbl vázán peptidickou vazbou, ze které jej uvolní žaludeční kyselina chlorovodíková a proteolytické enzymy. pH musí být ovšem dostatečně kyselé a také dostatečná sekrece vnitřního faktoru a efektivní proteolýza [9, 22, 25]. Okamžitě po uvolnění z bílkovinné vazby kompetují o Cbl dva transportní proteiny: Intrinsic Factor (IF) produkovaný z parietálních buněk a haptokorin (HC) produkovaný ve velkém množství slinnou žlázou. Haptokorin má mnohem vyšší vazebnou afinitu ke Cbl než IF.

Po 30minutovém trávení opouští žaludek Cbl většinou navázaný na haptokorin do duodena a horních částí jejunu. Teprve tam mocný účinek alkalického pH a pankreatických proteáz uvolní kobalamin z haptokorinu, aby se mohl více navázat na IF. A to je příčinou deficitu vitamínu B₁₂ u pankreatické a jejunální insuficience [27]. V distální části ilea jsou komplexy CblIF a CblHC rozpoznány a vychytávány kubilinovými receptory a transportovány přes střevní stěnu do krevního oběhu. V plazmě je Cbl vázán opět na dva transportní proteiny:

- transkobalamin s velmi krátkým, jen 5–6minutovým poločasem přeměny nesoucí „aktivní Cbl“ – holotranskobalamin (HTC) – dříve označovaný transkobalamin II;
- haptokorin (HC) cirkulující protein s dlouhým poločasem přeměny (přes 2 týdny), na který je Cbl pevně navázaný a dosud se neví proč.

Z nerozlišování funkce těchto 2 proteinů asi pramení vysoké referenční hodnoty celkového vitamínu B₁₂, dosud nejčastěji rutinně vyšetřovaného. Oba proteiny v krevním řečišti se vážou na buněčné receptory především jaterních a ostatních retikuloendoteliálních buněk. Uvnitř jaterních buněk se HTC přeměňuje na dvě aktivní koenzymové formy – metylkobalamin (mCbl), který je významný kofaktor pro klíčový a složitý enzym methioninsyntázu (MS), a adenosylkobalamin (aCbl) – koenzym potřebný pro další dva enzymové systémy: reduktázu methioninsyntázy (MRR) a metylmalonyl-CoA-mutázu v mitochondriích. Tím se teprve Cbl stává disponibilní pro všechny buňky v těle syntetizující DNA nebo RNA (obr. 1. – levá část metabolického schématu [8, 25]).

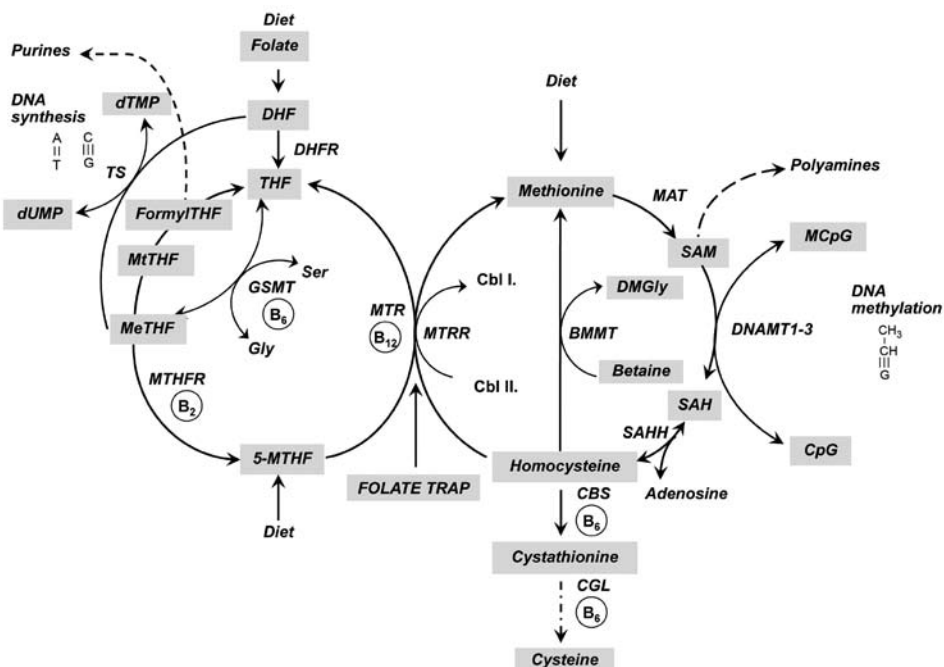


Fig. 1. Simplified scheme of methionine cycle, one-carbon metabolites cycle and methylation of DNA and CpG in humans. Abbreviations: BMMT – betaine methionine methyltransferase, CBS – cystathionine-beta-synthase, CGL – cystathionine-gamalyase, DHF – dihydrofolate, DHFR – dihydrofolate reductase, DMGly – dimethylglycine, DNAMT – DNA methyltransferases, dUMP – deoxyuridine monophosphate, DTP – deoxythymidine monophosphate, FormylTHF – formyltetrahydrofolate, GSMT – glycin/serin methyltransferase, MeTHF – methylenetetrahydrofolate, MTHF – methenyltetrahydrofolate, 5-MTHF – 5-methyltetrahydrofolate, MTHFR – methyltetrahydrofolate reductase, MTR – methionine synthase, MTRR – methionine synthase reductase, SAM-S – adenosylmethionine, SAH-S – adenosylhomocysteine, SAHH-S – adenosylhomocysteine hydrolase, THF – tetrahydrofolate, TS – thymidilate synthase

Za fyziologických podmínek je 80–85 % cirkulujícího Cbl vázáno na zásobní HC, odkud se uvolňuje velice málo a pomalu (měsíce až rok), tj. v době, kdy už absorpce ve střevě třeba dávno ustala a manifestace deficitu „aktivního“ HTC je už dávno zřetelná. Může trvat 3–6 let, než se hladina komplexu CblHC, a tedy celkového vitamínu B₁₂, sníží < 150 pmol/l. Pouze aktivní HTC, který je receptory buněk dychtivě vychytáván reprezentuje aktuálně účinné hladiny aktivního Cbl s poklesem ihned po zhoršení intestinální absorpce! Stanovení HTC je proto diagnosticky cennější a výhodnější než celkový vitamin B₁₂ – hlavně v jeho „šedé zóně“ 150–300 pmol/l [11, 23, 33, 34].

Metabolické změny z deficitu vitamínu B₁₂

Deficit se v organismu projevuje na dvou úrovních:

- Bez Cbl neprobíhá remetylace homocysteinu (Hcy) složitým enzymovým komplexem methioninsyntázy a její reduktázy na esenciální methionin (viz obr. 1). Hromadí se Hcy kromě toxických účinků vyvolaných homocysteinylizací proteinů především koagulačních, dále změnami glykoproteinů, redukcí disulfidických můstků nedovoluje stabilizaci peptidových vazeb, urychluje tvorbu radikálů aj. Především však blokuje efektivní metylaci cytosinu v CpG ostrůvcích, tolik potřebného pro syntézu DNA, RNA, dalších ribonukleotidů a fosfatidů, z čehož rezultuje deficitní proteosyntéza a maligní onkogeneze (viz obr. 1 – pravá strana schématu) [31]. Nadbytek folátu stimuluje nádorový růst [10].
- Deficit aktivního HTC připravuje tzv. **folátovou nebo metylfolátovou past**: kromě inhibice funkce MS a MRR (uprostřed schématu) se 5-methyltetrahydrofolát = **aktivní folát** (5-MTHF) – nejpotřebnější to folátový metabolit v lidském organismu, dostatečně efektivně „nedemetyluje“. V plazmě je životu nezbytného 5-MTHF málo, v buňkách (erytrocytech) mnoho, dokonce v různých jiných formách, ale je bez metylovaného Cbl prakticky nevyužitelný [8, 23]. Vzniklý nedostatek tetrametylfolátu a metyltetrahydrofolátu způsobí, že se netvoří puriny a thymidilátsyntáza nemůže přeměňovat uracil na thymin. Nevhodný uracil vstupuje do syntézy DNA a opět vznikají katastrofické cykly syntézy DNA a následuje deficitní proteosyntéza. Deficit thymidinsyntázy je obecně považován za příčinu megaloblastózy.

Klinická manifestace deficitu vitamínu B₁₂ a vybrané rizikové skupiny onemocnění vyvolané jeho deficitem

Zásadně je třeba rozlišovat:

- deficit vitamínu B₁₂ z potravy,
- deficit vstřebávání vitamínu B₁₂,
- deficit tkáňového transportu vitamínu B₁₂.

Pro klinickou manifestaci je pak důležitá jednak doba působení vitaminového deficitu, a jednak věkové období, ve kterém nastává, jak intenzivně by se mohla projevit porucha syntézy DNA či RNA:

- Vznik megaloblastické (makrocytární) anémie z deficitu vitamínu B₁₂. Pro svoji malignitu je tato anémie nazývána perniciózní, je léčitelná jaterními extrakty (za které dostal Minot v roce 1937 Nobelovu cenu). Tuto typickou klinickou manifestaci s makrocytózou a hypersegmentací granulocytů, únavou, bledostí a neurologickou manifestací, nacházejí hematologové jen za delší dobu trvajícího deficitu [10]. Potvrzuje se klasickým a dnes už pro svoji radioaktivitu neprováděným Schillingovým testem, deficitem IF a pozitivním dexyuridinovým testem. Pouze 2–5 % pacientů s floridní perniciózní anémií je správně diagnostikováno, většina klinicky netypických forem zůstává nepoznána [6, 7].
- Neurologické poruchy hlubokého čítí, polyneuropatie a neuropsychiatrické či psychotické a demenční postižení s deficitem kognitivních funkcí běžná u pacientů > 50 let věku jsou vyvolány porušenou myelinizací, ale byla nalezena i u adolescentních veganů [2, 11, 17, 23, 29]. Alzheimerova choroba je také provázena sníženým HTC, kterou však ani intenzivní suplementace nedokáže normalizovat [24]. Až u 30 % pacientů s diabetem 2. typu při dlouhodobém podávání metforminu dochází k deficitu HTC, který se upravuje podáváním kalcia. Metformin negativně ovlivňuje receptory DNA syntézy, které jsou Ca-dependentní a zřejmě zvyšuje spotřebu vitamínu B₁₂ [2]. Deficit vitamínu B₁₂ u dětí narozených a kojených vegetariánskými matkami působí změny organogeneze už v průběhu těhotenství, závažné poruchy psychomotorického vývoje, mozkové opoždění v poporodním období ze zpomalení myelinizace; deficit u matek samotných může být přitom dlouho bezpříznakový [1, 14, 15].
- Primární deficit vitamínu B₁₂ už v potravě je nejspíš manifestní u rostoucích vegetariánů a veganů. Je akcentován ještě nedostatečnou sekrecí HC ve slinách a charakterizován jen subklinickými příznaky, mírným mentálním postižením a často rafinovaně maskován podáváním velmi složitých dietních náhražek [13, 19].
- Deficit vnitřních faktorů (IF) z nedostatečné sekrece a funkce žaludečních parietálních buněk. Jedna protilátka proti IF, která blokuje vazebné místo a znemožňuje navázání Cbl v žaludku; druhá protilátka proti IF, zase brání vazbě IF na Cbl a jeho vstřebání v terminální části ilea. Deficit je vyvolán nejen přítomností protilátek, ale také málo kyselým pH žaludečního obsahu u primární achlorhydrie či hypochlorhydrie, u chronických zánětů žaludku, atrofické gastritidy. Prokázaná přítomnost dalších protilátek na lymfocytech parietálních buněk proti H⁺/K⁺ ATPáze vyvolává autoimunní gastritidu s nedostatečnou tvorbou kyseliny chlorovodíkové. Příčina je genuinní anebo sekundární následkem dlouhodobého a nízkým nekontrolovaného podávání inhibitorů protonové pumpy při „pálení žáhy“ a podobných žaludečních obtížích (Omeprazol, Panto-

prazol, Helicid aj.). Snížený HTC tak nahrazuje často zapomenutý test na Helicobacter u ethyliků, kuřáků a narkomanů končících na JIP s typickým infarktem [16, 22, 27, 30].

- e) Chronická onemocnění pankreatu s nedostatečnou sekrecí a deficitem pankreatických enzymů i bikarbonátů, ostatní chronické střevní záněty tenkého střeva jako celiakie, malabsorpční syndrom, sprue, chronické pooperační záněty a lokalizované peritonitidy ileocekální krajiny po apendektomii, gynekologických operacích, které i za přítomnosti receptoru kubulinu znemožní vstřebání komplexu CblIF v terminální části ilea.
- f) AIDS a jiné celotělové infekce se zvýšenou potřebou vitamínu B₁₂ a pokleslou střevní absorpcí, stejně jako etylismus dokazující snížený přívod a vyžadující nadměrnou spotřebu vitamínu B₁₂. Již 30 let je z americké literatury známo, že starší populace (> 60 let) je až ve 40 % deficitní na vitamín B₁₂ [11, 12, 23, 28]. Bývá provázen HHC, sníženým folátem a zvýšenou kyselinou metylmalonovou, jak perfektně potvrdil Lindebaum et al. na kohortě dosud žijících starých účastníků Framinghamské studie, i když nevykazují žádné ledvinné postižení [21].
- h) Dědičné metabolické poruchy z molekulární odchylky bílkovinné struktury CblA až CblG (např. syndrom Immerslundové-Grasbecka) se manifestují nejčastěji u dětí, jsou provázené megaloblastickou anémií. Děti trpí deficitem aCbl a mCbl, hyperhomocysteinémií (HHC), někdy hypermethioninémií, zvýšením hladiny kyseliny metylmalonové (MMA) [25, 36]. Geneticky způsobený enzymový defekt CNCbl decyanázy, která katalyzuje reduktivní decyanaci cytosolickou diflavinoxidoreduktázou a působící inhibicí uvolnění kyanidové skupiny z kobalaminu, je velice vzácný, projevuje se brzy po narození a má špatnou prognózu [18].

Denní spotřeba vitamínu B₁₂ v dospělosti je celosvětově uznávána od 2,5 do 7,0 µg/d, s mírnými etnickými rozdíly. Avšak **během gravidity** a hlavně při kojení výrazně stoupá k zajištění zdárné syntézy rychleji rostoucích tkání a jen při dostatečném přívodu folátu [1, 15]. Deficit v tomto kritickém období byl popsán i u nás [14, 15]. Zatímco hladina Cbl v těhotenství zůstává stabilní, Hcy během zdravého těhotenství výrazně klesá na životní minimum.

Metodika laboratorních stanovení k podpoře správné diagnózy deficitu vitamínu B₁₂

Stanovení celkového vitamínu B₁₂ prodělalo svůj analytický vývoj od mikrobiologických metod až po imunochemické metody na automatických analyzáto-rech (Acces, Centaur, AxSym), ale jeho praktický klinický význam je už dnes malý – jen pro výzkumné účely. Největší nevýhodou je fakt, že hodnoty jeho „šedé zóny“ referenčních hodnot (150–300 pmol) už neodhalí zřetelný deficit HTC v buňkách. Srovnání klinické významnosti je uvedeno v tabulce 1.

Table 1. Comparison of clinical utility of total vitamin B-12 and holotranscobalamin estimation in different stages of deficiency

Holo TC < 40 pmol/l No clinical symptoms Normal total Vit B-12	I.
Holo TC < 15 pmol/l MMA+; tHcy norm. No clinical symptoms Neg. Vit B-12 balance	II.
Holo TC < 5 pmol/l Total B-12 < 150 pmol/l MMA+++; MCV+	III.
Holo TC not detectable Total B-12 < 75 pmol/l; MCV++ Deficit erythropoiesis; MMA+++ Neurology symptoms ++	IV.
Holo TC not detectable Total B-12 < 75 pmol/l Neurology irreversible; MMA+++ Erythropoiesis irreversible; MCV > 110	V.

Stanovení aktivního HTC RIA metodikou Axis-Shield Co. je známo již od r. 1995 [33]. Pro cenovou náročnost vyšetření nebylo dostatečně rozšířeno a teprve modifikace stanovení MEIA, které dává naprosto shodné výsledky – je dostupnější i jako rutinní v klinicko-biochemické laboratoři, a tak dosáhlo širokého použití [5, 33]. V souboru 50 pacientů vyšetřených oběma metodami jsme nacházeli zřetelné snížené hodnoty HTC už od 300 pmol celkového vitamínu B₁₂. Přímá korelace stanovení HTC a celkový vitamín B₁₂ není možná, protože se jedná o dvě metody s různou protilátkou. U nás používáme metodiku pro AxSym Active B-12 Assay (2006) [5, 33], referenční hodnoty uvádí tabulka 2. Stanovení je hrazeno pojišťovnou, a tak stanovení celkového vitamínu B₁₂ už v rutinním provozu vůbec neprovádíme. **Stabilita HTC** při odběru do EDTA, heparinu či v séru je dostatečná při teplotě 2–8 °C až 28 dní. Velkou výhodou stanovení HTC je skutečnost, že při chronickém ledvinném selhání se HTC nezvyšuje tak, jako např. tHcy MMA nebo celkový vitamín B₁₂ [13].

Stanovení MMA v plazmě je velice diagnosticky rozšířené ve skandinávských zemích, protože už při mírných deficitech Cbl je MMA zvýšená a promptně reaguje na léčebné podání, a je tedy velmi vhodná pro monitorování úspěšnosti perorální či parenterální léčby. U nás stanovujeme na GC/MS Finnigan MAT 2010 po derivatizaci etylchloroformiátem [15].

Stanovení protilátek proti vnitřnímu faktoru (IF) a H⁺/K⁺ATPáze parietálních buněk bylo provedeno multiplexovou luminexovou metodou (diagnostická souprava FIDIS Gastric, BMD). Stanovení protilátek proti parietálním buňkám provedeno nepřímou imuno fluorescencí diagnostickou soupravou Fy BioSystems s kvantitativním odečítáním na fluorescenčním mikroskopu Olympus AX70.

Rutinní algoritmus vyšetřování deficitu HTC v naší ambulanci je uveden na obrázku 2.

Table 2. Reference Values of Critical Metabolites of Vitamin B-12

Holotranscobalamin (HTC)	19–133 pmol/l	Abbott, 2006
	40–150 pmol/l	Nexö, 2002
Total vit. B-12 (Cobalamins)	200–600 pmol/l	Nexö, 1983
Methylmalonic Acid (MMA)	100–300 nmol/l (nonsmokers)	Hyánek, 2000
Total Homocysteine (tHcy)	< 15 µmol/l (females)	Hyánek, 2000
	< 20 µmol/l (men)	

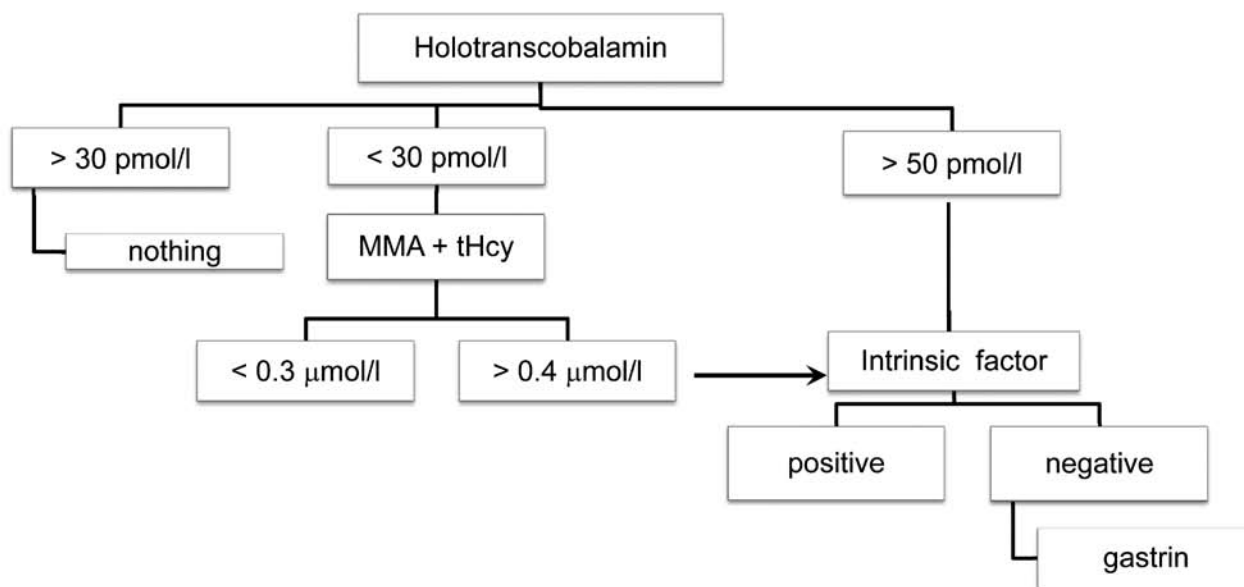


Fig. 2. Laboratory algorithm for differentiation of Vitamin B-12 deficiencies [Klee, G. G., Clin. Chem., 2000, 46, p. 1281]

Genetika

Molekulový genetický polymorfismus bílkovinné molekuly transkobalaminu se vyskytuje ve dvou typech: 776C > G a 67 A > G; oba kódují tvorbu proteinu, a určují tak hladinu HTC v plazmě. Pozitivně korelují s věkem, folátem, methioninem, negativně s MMA a tHcy. Průměrné hodnoty HTC jsou u nositelů TC67A > G nižší proti zdravým o 5–10 pmol/l, obdobně je tomu u polymorfismu 776G > G [35]. U nás toto vyšetření zatím není běžně dostupné.

Léčebné způsoby podání při deficitu B₁₂

Pokud je prokázáno porušené vstřebávání, je logické podání i. m. v dávkách 300–1000 µg/m. Jsou však pacienti, kterým se i po opakovaném i. m. podávání hladina HTC v krvi už za týden po podání rychle snižuje s typickým zvýšením MMA a tHcy. Toto dlouhodobé i. m. a častější podávání bylo už v 90. letech nahrazeno u mnoha pacientů perorálním podáváním s dobrými zkušenostmi ze Skandinávie, USA i NSR. Berlin a Berlin zjistili už v r. 1986, že nejméně 1 % z podané orální dávky krystalického vitamínu B₁₂ je absorbováno pasivní absorpcí po vysokém koncentračním spádu do dlouhého tenkého střeva i bez asistence IF [3, 10, 20]. Pro normalizaci léčebné hladiny HTC to znamená denní nebo obdenní podávání nejméně 1000 µg v tabletové formě (Milgamma, Neuromax) nebo po lžičkách z otevřené ampulky CNCbl (Vitamin B₁₂, Léčiva) [12, 16, 20, 29]. Léčebné dávky menší

než 500 µg/d jsou zde podle našich zkušeností zcela neefektivní a hodí se pouze k preventivnímu podávání u starých pacientů.

Diskuse

Z uvedeného je zřejmé, že toho o vitamínu B₁₂ nevíme mnoho a mnohé fyziologické či patologické skutečnosti dodnes nejsou jasné a zcela prozkoumané. Teprve zavedení metodiky stanovení HTC setem AxSYM Active-B12 před 5 lety a systematicky doplněné stanovením MMA nám umožnilo zachytit a vysvětlit důvod mnoha nejasných těžkých HHC z deficitu kobalaminu a odhalit celou řadu jeho deficitů u do té doby neznámých klinických obrazů, jako např. dysfertilít, tromboembolických komplikací, patologického lipidového spektra, dlouhodobě nekontrolovaného užívání antacid a inhibitorů protonové pumpy. Doplnilo to naše dřívější poznatky pozorované u typických infarktů, mozkových příhod, plicních embolií, tromboembolií, při podání perorálních hormonálních antikonceptiv, u nevysvětlitelných poruch psychického vývoje. Deficit HTC je zde primárním vyvolavatelem metabolických změn anebo nechtěným spouštěčem nežádoucích komplikací.

Tento zdánlivě složitý, ale pořád ještě zjednodušený metabolický úvod byl nutný, abychom pochopili základnosti metabolismu vitamínu B₁₂. Podle našich dlouhodobých zkušeností je deficit vitamínu B₁₂ kromě

chronického ledvinného onemocnění nejčastější příčinou rizikové a stále tolik diskutované hyperhomocysteinémie (tab. 3). Dále uvedené kazuistiky jsou dokladem existence velmi častého výskytu deficitu vitamínu B₁₂ v naší populaci, a tedy i u pacientů v naší ambulanci až od té doby, co jsme rutinně zavedli metodiku stanovení HTC. Není to – jak jsme si podle Herberta a Valentia bláhově mysleli – jenom těch 10–30 % pacientů v seniorské populaci, kteří zatím většinou unikají naší pozornosti [10, 11, 12, 34].

Table 3. The Etiology of Severe Hyperhomocysteinemia (> 30 μmol/l) in 5000 Patients Followed in Hospital Homolka (2001–2009)

Renal Failure	38 %
Vit. B-12 deficiency	34 %
MTHFR and folate deficiency	18 %
Positive antibodies IF, ATPase	6 %
Inherited metabolic disorders	2 %
Liver failure	2 %

Kazuistiky

Náhodně objevení a dosud bezpříznakoví pacienti

Padesátiletý řidič dálkového kamionu, kuřák, s pozitivní RA pro KVO v rodině ze strany matky (trombóza), alergik. Na vojně trpěl vředovou chorobou léčenou dietou a inhibitory po řadu let; po prodělané trombóze LDK, vyšetřen v Trombotickém centru VFN, s normálním nálezem TEM, jen PAI-1 polymorfismus 4G/5G. Celkový vitamin B₁₂ pouze 300 pmol/l, MCV a KO v normě. U nás dovyšetřen tHcy, který je >100 μmol/l, methionin však pouze 26 μmol/l, ale HTC s hladinou 6 pmol/l, zvýšenou MMA > 800 nmol/l. Pozitivní jak parietální protilátky, tak antiH⁺/K⁺ATPáze. Suplementaci vitamínem B₁₂ odmítá, cítí se zdravý. Po roce však přichází s únavou při nočních jízdách a je ochoten se léčit. Perorální podávání CNCbl 1000 μg/d za dobu 3 měsíců není efektivní (malá compliance?). Podávání i. m. 3krát týdně 1000 μg zvýšila za 1 měsíc hladinu HTC pouze na 33 pmol/l, vysoký folát v erythrocytech (> 3500 nmol/ml) se snížil k normě, tHcy i MMA pokles k normálním hodnotám. Fibroskopie provedena s negativním nálezem na žaludeční sliznici.

Infarkty myokardu a embolie plicnice

Dvačtyřicetiletý řidič-sportovec bez zátěže pro KVO s CCh 4, 8 mmol/l je po několikanásobném stupňujícím se dušnosti dovezen na ARO s podezřením na IM, který se laboratorně ani klinicky a EKG nepotvrzuje. Plicní hypertenze přítomna, provedena PTCA s negativním výsledkem, CT-angio: masivní embolizace obou ramen art. pulmonalis, následuje úspěšná trombolýza a warfarinizace, MCV 115 μm³, ale tHcy 74 μmol/l. Celkový B₁₂ < 75 pmol/l, MMA > 750 nmol/l, doplněn HTC < 5 pmol/l, v rekonvalescenci provedena fibroskopie s nálezem atrofické gastritidy. Schillingův test < 5 %. Podáván i. m. CNCbl 1000 μg/t, po normalizaci perorální léčba CNCbl 1000 μg/ob den.

Za uplynulých 12 let registrujeme už 17 pacientů s „perniciózní anémií“ dosud nepoznanou a detekovanou až na ARO s akutní koronární příhodou jen díky nálezu vysokého tHcy a nízkého HTC.

Centrální mozkové příhody

Devatenáctiletý zdravý pacient je přivezen s akutní mozkovou příhodou na neurologické oddělení, kde je diagnostikována rozsáhlá mozková ischemie; po symptomatické léčbě se stav rychle upravuje, parézy většinou mizí; v laboratorním nálezů s normálním lipidovým spektrem je tHcy 49 μmol/l a HTC 5 pmol/l, MMA > 750 nmol/l, folát 5 nmol/l, MCV a KO v normě. Hmzg T < T MTHFR 677; ostatní TEM neprokázány; Schillingův test 25 %; protilátky antiIF a antiH⁺/K⁺ATP: negativní, pacient je v péči neurologů, suplementován Millgamou, později Neuromaxem forte a folátem 2krát týdně/1tbl. Stejný nález laboratorní u jeho 46leté matky hmzg T < T pro 677 MTHFR, zatím bez ischemické příhody.

Tromboembolické příhody

Čtyřiapadesátiletý, warfarinizovaný pacient, který přežil embolii plicnice, z velmi rizikové rodiny pro KVO přichází k ověření vysokého tHcy > 100 μmol/l, MMA > 750 nmol/l, celkový vitamin B₁₂ < 75 pmol/l, HTC neměřitelný, fibroskopie žaludku negativní, parietální protilátky a antiIF, antiH⁺/K⁺ATP negativní, MCV 102 μm³. Pacient suplementován *per os* 1000 μg CNCbl/ob den do normalizace hladiny HTC. V lipidovém spektru do půl roku po embolii vysoký LDL-Ch 8,5 mmol/l, apoB 1,8 g/l; Lp (a) > 1200 mg/l; apoE 3/4, proto nasazena kombinovaná statinová léčba.

Nutriční a perikoncepční patologie

Zdravá, 40letá inženýrka s dysfertilitou usilující řadu let o graviditu, nikdy neužívala KHA je odeslána z genetické ambulance k metabolickému vyšetření; v mládí prodělala těžkou peritonitidu po nepoznané a pozdě operované appendicitidě. HTC 4pmol/l, t-Hcy 95 μmol/l MMA > 750 nmol, folát 24 nmol/l, KO v normě; žaludeční fibroskopie negativní, MCV 110mm³; anti IFA antiH⁺/K⁺ APT negativní; suspektně fosfolipidový syndrom; 6 měsíců suplementována *per os* CNCbl 1000 μg/obden. Po normalizaci HTC na hladinu 48 pmol/l, poklesu tHcy i MMA, vyčkala 3 zdravé ovulace a povolena koncepce; pacientka úspěšně donosila a fyziologicky porodila v termínu zdravého chlapečka, nyní 2letý s normálním psychomotorickým vývojem. Trvale perorálně suplementována 1000 μg CNCbl/ob den.

Etylismus

Inženýr-chemik (45 let), bez rizika KVO, z rizikového pracoviště s toxickými látkami přichází k vyšetření výrazné HHC, aby mohl požádat o změnu pracoviště; výsledek tHcy > 100 μmol/l, folát v normě, MMA > 750 nmol/l, celkový vitamin B₁₂ < 75 pmol/l, HTC nedekovatelný; MCV 130 μm³; z rizikového pracoviště přeřazen a suplementován CNCbl 5 x 1000 μg i. m. týdně až do normalizace HTC, stabilizován a spokojen. Po 6 měsících nález HTC opět velice nízký a tHcy

vysoký – vzhledem ke špatné compliance stanoven CDT s výsledkem > 8 %. Pacient přiznává pravidelnou konzumaci tvrdého alkoholu 0,5–1,5 l/d; vyřazen z ambulance, ale suplementuje se sám megadávkami perorálního vitamínu B₁₂ pro veterinární účely.

Použité zkratky:

aCbl	– adenosylkobalamin
Cbl	– kobalamin
CDT	– carbohydrate deficient transferin
CNCbl	– kyanokobalamin/alfa- (5,6-dimethylbenzimidazolyl)-cobamid kyanid/, stabilní komerční produkt
HC	– haptokorin
HHC	– hyperhomocysteinémie
HTC	– holotranskobalamin = aktivní vitamín B ₁₂
tHcy	– celkový homocystein
hmzg	– homozygot
htzg	– heterozygot
IF	– Intrinsic factor (vnitřní faktor)
IM	– infarkt myokardu
KHA	– kombinovaná hormonální antikoncepce
KVO	– kardiovaskulární onemocnění
mCbl	– metylkobalamin
Met	– methionin
MMA	– metylmalonová kyselina
MS	– methionin syntáza
MRR	– reduktáza methioninsyntázy
5MTHF	– 5-metyltetrahydrofolát
MTHFR	– metyltetrahydrofolát reduktáza
OHCbl	– hydroxykobalamin
TEM	– tromboembolické mutace (FVLeiden, Prothrombin II, MTHFR)

Literatura

1. **Allen, L. H.** Vitamin B-12 metabolism and status during pregnancy, lactation and infancy. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1994, 352, p. 173–186.
2. **Bauman, W. A., Shaw, S., Jayatileke, E. et al.** Increased intake of calcium reverses vitamin B-12 malabsorption induced by metformin. *Diabetes Care*, 2000, 23, p. 1227–1231.
3. **Berlin, H., Berlin, R., Brante, G.** Oral treatment of pernicious anemia with high doses of vitamin B-12 without intrinsic factor. *Acta Med. Scand.*, 1968, 184, p. 247–248.
4. **Blom, H. J., v. d. Linden, I. J. M.** Folate, homocysteine and MTHFR in neural tube closure: relevance on methylation. *Proc. 7th Congr. of Hyperhomocysteinemia*, Saarbrücken, 2007.
5. **Brady, J., Wilson, L., McGregor, L. et al.** Active B-12: a rapid, automated assay for holotranscobalamin on the Abbott AxSYM analyzer. *Clin. Chem.*, 2008, 54, p. 567–573.
6. **Carmel, R.** Subtle and atypical cobalamin deficiency states. *Am. J. Hematol.*, 1990, 34, p. 108–114.
7. **Carmel, R.** Prevalence of undiagnosed pernicious anemias in the elderly. *Arch. Intern. Med.*, 1996, 156, p. 1097–1100.
8. **Carmel, R., Jacobsen, D. W.** Homocysteine in Health and Disease. *Cambridge Univ. Press*: Cambridge, 2001.
9. **Force, R. W., Nahata, M. C.** Effect of histamine H-2receptor antagonists on vitamin B-12 absorption. *Ann. Pharmacother.*, 1992, 26, p. 1283–1286.
10. **Herbert V.** Vitamin B-12 deficiency. *The Royal Soc. Med. Press Ltd. Round Table Series 66*, 2002, London.
11. **Herbert, V., Fong, W., Guille, V.** Low holotranscobalamin II is the earliest serum marker for subnormal vitamin B-12 (cobalamin) absorption in patients, with AIDS. *Am. J. Hematol.*, 1990, 34, p. 132–139.
12. **Herbert, V.** The elderly need oral vitamin B₁₂. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998, 67, p. 739.
13. **Hermann, W., Schorr, H., Obeid, R. et al.** Vitamin B-12 status, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations and hyperhomocysteinemia in vegetarians. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003, 78, p. 131–136.
14. **Honzík, T., Adamovičová, M., Magner, M. et al.** Nutriční deficit vitamínu B₁₂ u kojených dětí. *Postgraduální medicína*, 2008, 10, s. 5604.
15. **Hyánek, J., Dubská, L., Pejznochová, H. et al.** Hyperhomocysteinémie nepoznané, nepoznatelné a zanedbané. *Klin. biochem. Metab.*, 2009, 17, 38, s. 83–92.
16. **Chang, E. B., Sitrin, M. D., Blaf, D. D.** Absorption of water-soluble vitamins and minerals. *Gastrointestinal, Hepatobiliary and Nutritional Physiology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.
17. **Joosten, E. V., Berg, D. A., Reizler, R.** Metabolic evidence the deficiencies of vitamin B12, folate, and vitamin B6 occur commonly in the elderly. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 1993, 58, p. 468–476.
18. **Kim, J., Gherasim, C., Banerjee, R.** Decyanation of vitamin B-12 by a trafficking chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105, p. 14551–14554.
19. **Krajčovičová-Kudláčková, M., Blažiček, P., Šebeková, K. et al.** Homocysteine levels in vegetarians versus omnivores. *Ann. Nutr. Metab.*, 2000, 44, p. 135–138.
20. **Kuzminski, A. M., DelGiaco, E. J., Allen, R. H. et al.** Effective treatment of cobalamin deficiency with oral cobalamin. *Blood*, 1998, 92, p. 1191–1198.
21. **Lindebaum, J., Rosenberg, I. H., Wilson, W. F. et al.** Prevalence of cobalamin deficiency in the Framingham study. *J. Clin. Nutr.*, 1994, 60, p. 2–11.
22. **Marcuard, S. P., Albernarz, L., Khauanmie, P. G.** Omeprazole therapy causes malabsorption of cyanocobalamin. *Ann. Intern. Med.*, 1994, 120, p. 211–215.
23. **Miller, J. W., Green, R., Herbert, V. D. et al.** Holotranscobalamin II is a reliable indicator of improved vitamin B-12 status in healthy elderly people with suboptimal B-12 status following oral B-12 supplements. *Blood*, 1999, 94, Suppl. 1/2, p. 17–18.
24. **Refsum, H., Smith, A. D.** Low vitamin B-12 status in confirmed Alzheimer's disease as revealed by serum holotranscobalamin. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2003, 74, p. 959–961.
25. **Rosenblatt, D. S., Fenton, W. A.** Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Metabolic Disorders In Scriver*, Ch., Edit, McGrawHill, Co: New York, 2001.
26. **Sedláčková, L., Dubská, L., Průcha, M.** Perniciózní anémie – diagnostický přínos detekce autoprotilátek proti vnitřnímu faktoru a terčovému antigenu parietálních buněk žaludku H⁺/K⁺ATPáze. *Epid. Mikrob. Imunol.*, 2010, 59, s. 126–132.
27. **Schjonsby, H.** Vitamin B-12 absorption and malabsorption. *Gut*, 1989, 30, p. 1686–1691.
28. **Stabler, S. P., Lindebaum, J., Allen, R. H.** Vitamin B-12 deficiency in the elderly: Current Dilemmas. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 1997, 66, p. 741–749.
29. **Stabler, S. P.** Vitamin B-12 deficiency in older people: improving diagnosis and preventing disability. *J. Am. Geriatr. Soc.*, 1998, 46, p. 1317–1319.

30. **Suovaniemi, O., Paloheimo, L., Härkönen, M. et al.** Atrophic gastritis – a disease with significant clinical impact. *Europ. Clin. Lab.*, 2003, p. 16–19.
31. **Valík, D., Radina, M., Štěřba, J. et al.** Homocysteine: a promising biomarker of folate antagonist chemotherapy. *Klin. Biochem. Metab.*, 2007, 45, s. 1737–1745.
32. **Vávrová, J. et al.** *Vitaminy a stopové prvky*. ČSKB ČLS JEP a SEKK, 2007.
33. **Valente, E., Johnson, F., Taylor, V. et al.** *A new microwell assay for the measurement of holotranscobalamin (active B₁₂) in huma serum*. Axis-Shield, 2006.
34. **Valente, E.** Vitamin B₁₂ deficiency in the elderly – a growing medical problem. *Europ. Clin. Laboratory*, 2001.
35. **Warden, D. R., Refsum, H.** Detection of SNP by PCR with universal transfer-labeled primers: application to folate and cobalamin related genes. *Clin. Chem.*, 2005, 51, p. 1713–1716.
36. **Zavadilová, P., Fowler, P., Zeman, J. et al.** CblE type of homocystinuria due to methionine synthase reductase deficiency: clinical and molecular studies and prenatal diagnosis in two families. *J. Inher. Metab. Dis.*, 2002, 25, p. 461–476.

Do redakce došlo dne 15. 10. 2010.

*Adresa pro korespondenci:
Prof. MUDr. Josef Hyánek, DrSc.
OKBHI Nemocnice Na Homolce
Roentgenova 2
150 30 Praha 5
e-mail: josef.hyaneck@homolka.cz*