

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2022

Kateřina Ludvíková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Deficit vitamínu B₁₂ – rizika, příčiny, projevy
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kateřina Ludvíková**
Osobní číslo: **C19358**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Deficit vitamínu B12 – rizika, příčiny, projevy**
Téma práce anglicky: **Vitamin B12 deficiency – risks, causes, manifestations**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Z dostupných literárních zdrojů vypracujte rešerši o vitamínu B12, jeho struktuře a funkci v organismu. V další části se zaměřte na zdravotní komplikace v souvislosti s jeho nedostatkem (příčiny, projevy).
2. Dále uveďte zdroje vitamínu B12 a v poslední části popište možnosti jeho stanovení.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

NEODPORUČUJEME VYUŽITÍ
ZEMSKÉHO PRŮMYSLU

Seznam doporučené literatury:

Pro vypracování rešerše využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. NCBI Pubmed, ScienceDirect, Web of Science, Scopus, apod. Jako zdroje využijte zejména odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech. Další dle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **7. února 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Ing. Karel Ventura, CSc. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 21. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Deficit vitamínu B₁₂ – rizika, příčiny, projevy jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 29.6.2022

Kateřina Ludvíková v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala doc. RNDr. Lucii Korecké Ph.D. za odborný dohled, cenné rady a vstřícný přístup při psaní této bakalářské práce.

Velké poděkování patří i mé rodině za neochvějnou podporu a trpělivost.

ANOTACE

Tato bakalářská práce je zaměřena na téma vitamínu B₁₂ a komplikace spojené s jeho nedostatkem. V úvodu jsou uvedeny základní informace o struktuře a vlastnostech tohoto vitamínu a jeho funkci v organismu. Hlavní část této práce se zabývá příčinami vzniku deficitu tohoto vitamínu, jaké jsou projevy nedostatku a způsoby následné terapie. V závěru jsou krátce popsány zdroje vitamínu B₁₂ a metody jeho stanovení v potravinách a organismu.

KLÍČOVÁ SLOVA

vitamín B₁₂, kobalamin, hypovitaminóza, deficit

TITLE

Vitamin B₁₂ deficiency – risks, causes, symptoms

ANNOTATION

This bachelor thesis is focused on the topic of vitamin B₁₂ deficiency and complications associated with this deficiency. The introduction provides basic information about the structure and properties of this vitamin and his functions in the body. The main part of this work deals with the causes of deficiency of this vitamin, what are the manifestations of deficiency and methods of subsequent therapy. Finally, the sources of vitamin B₁₂ and methods of his determination in food and the organism are briefly described.

KEYWORDS

vitamin B₁₂, cobalamin, hypovitaminosis, deficiency

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	11
TERMINOLOGIE	13
ÚVOD.....	15
1. STRUKTURA A STABILITA.....	15
1.1. Kyanokobalamin.....	17
1.2. Adenosylkobalamin a methylkobalamin	17
1.3. Hydroxykobalamin a další deriváty vitamínu B ₁₂	18
1.4. Pseudokobalamin.....	18
2. VITAMIN B ₁₂ V ORGANISMU	20
2.1. Funkce	20
2.1.1. Kofaktor enzymu methyoninsyntasa	20
2.1.2. Kofaktor enzymu L-methylmalonyl-CoA-mutasa.....	21
2.1.3. Antioxidační vlastnosti vitamínu B ₁₂ a role v imunitním systému.....	22
2.2. Vstřebávání vitamínu B ₁₂	22
3. DEFICIT VITAMINU B ₁₂	25
3.1. Vrozená onemocnění.....	25
3.1.1. Imerslund-Gräsbeck syndrom.....	25
3.1.2. Porucha hlavního transportního proteinu.....	26
3.1.3. Porucha vnitřního faktoru	26
3.2. Získaná onemocnění.....	26
3.2.1. FCBM syndrom	26
3.2.2. Bakteriální a parazitické infekce.....	27
3.2.3. Gastrektomie.....	27
3.2.4. Diabetes mellitus II. typu.....	27
3.3. Životní styl	27
3.3.1. Vegetariánství a veganství.....	27
3.3.2. Alkoholismus	28
3.4. Interakce s léčivý.....	28
3.4.1. Oxid dusný.....	28
3.4.2. Inhibitory a antagonisté protonové pumpy	28
3.4.3. Metmorfin	29
4. PROJEVY DEFICITU VITAMINU B ₁₂	30

4.1.	Nervová soustava	30
4.1.1.	Subakutní kombinovaná degenerace	30
4.1.2.	Aktivace N-methyl-D-aspartátového receptoru.....	30
4.1.3.	Neuropatie.....	31
4.1.4.	Neuropsychiatrické stavy.....	31
4.1.5.	Demence	31
4.1.6.	Neurodegenerativní choroby	32
4.2.	Kardiovaskulární choroby	32
4.2.1.	Megaloblastická (makrocytární) anémie	32
4.2.2.	Perniciózní anémie.....	33
4.3.	Nádorová onemocnění	33
4.4.	Nedostatek vitamínu B ₁₂ u těhotných žen a novorozenců	34
4.5.	Stáří	35
4.6.	Onemocnění COVID 19.....	36
5.	BIOSYNTÉZA KOBALAMINU	37
6.	LÉČBA DEFICITU VITAMINU B ₁₂	39
6.1.	Kyanokobalamin	39
6.2.	Methylkobalamin a Adenosylkobalamin	39
6.3.	Hydroxykobalamin.....	40
7.	ZDROJE KOBALAMINU	41
7.1.	Rostlinné zdroje, řasy, sinice a houby.....	41
7.2.	Živočišné zdroje	43
8.	STANOVENÍ.....	49
8.1.	Stanovení v potravinách.....	49
8.1.1.	Biologické testy	49
8.1.2.	Atomová absorpční spektrometrie	49
8.2.	Stanovení v organismu	49
8.2.1.	Stanovení celkové hladiny screengovými metodami	50
8.2.2.	Stanovení vstřebaného množství	53
9.	ZÁVĚR	55
	POUŽITÁ LITERATURA	57

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Struktura korrinoidů	Chyba! Záložka není definována.
Obrázek 2: Genom a struktura Sars-CoV-2	19
Obrázek 3: Funkce mikroorganismu v organismu	21
Obrázek 4: Vstřebávání kobalaminu v organismu	23
Obrázek 5: Metabolismus homocysteinu a kyseliny methylmalonové	50
Tabulka 1: Obsah kobalaminu v mořských živočiších	Chyba! Záložka není definována.
Tabulka 2: Obsah kobalaminu v různých typech masa	45
Tabulka 3: Obsah kobalaminu v různých druzích mléka	46
Tabulka 4: Koncentrace kobalaminu ve fyziologickém a patologickém stavu	48

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AAS	atomová absorpční spektrometrie
AdoCbl	adenosylkobalamin
AMN	gen bez amnionu
^{xy} Co	izotopy kobaltu
Cbl	kobalamin
CUBN	kubilin
DMB	5,6-dimethylbenzimidazol
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EEG	elektroencefalografie
ELISA	(enzyme-linked immunosorbent assay), enzymatický imunosorpční test
FAB ₁₂	test frakční absorpce pro kobalamin
FCBM	(Food cobalamine syndrome) nedostatečné vyvážení Cbl z potravy
GF-AAS	(Graphite furnace-atomic absorption spectrometer), AAS v grafitové peci
GC-MS	(Gass chromatography - mass spektrometry), plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
Hcy	homocystein
HoloTC	holotranskobalamin
HPLC	(High – performance liquid chromatography), kapalinová chromatografie
HydroxyCbl	hydroxykobalamin
IF	vnitřní faktor
IGS	Imerslund-Gräsbeck syndrom
KyanoCbl	kyanokobalamin
MCM	methylmalonyl-CoA-mutasa
MetCbl	methylkobalamin
MMA	methylmalonová kyselina
MS	methioninsyntasa
N ⁵ -CH ₃ -THF...N ⁵	methyltetrahydrofolát
PseudoB ₁₂	pseudovitamín B ₁₂

PPI	inhibitory protonové pumpy
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní forma kyslíku
SAH	S-adenosylhomocystein
SAM	S-adenosylmethionin
TCH	hlavní transportní protein
THF	tetrahydrofolát
TLC	(Thin layer chromatography), tenkovrstvá chromatografie
TNF α	tumor nekrotizující faktor α

TERMINOLOGIE

ANÉMIE	chudokrevnost
ANTIDOTUM	protijed
APOPTÓZA	indukovaná buněčná smrt
BONITAS	kmen středně velkých dravých ryb s paprskovitými ploutvemi, které patří do rodiny <i>Scombridae</i> , kam se řadí např. makrela
DIABETES MELLITUS	cukrovka
DUODENUM	dvanáctník
EDÉM	otok
ERGOKALCIFEROL	vitamín D ₂
G2 FÁZE BUNĚČNÉHO CYKLU	fáze, kdy dochází ke zdvojnásobení organel a ke tvorbě struktur potřebných k dělení buňky
GASTREKTOMIE	chirurgické vynětí žaludku
HYPERTENZE	vysoký krevní tlak
ILEUM	tenké střevo
INTRAMUSKULÁRNĚ	do svalu
INTRAVENÓZNĚ	do žíly
ISCHIAS	zánět sedacího nervu
KIMCHI	korejský pikantní salát z fermentované zeleniny
LEUKOPENIE	snížený počet leukocytů
MEFUN	solené a fermentované ledviny z lososa
NEURALGIE TROJKLANNÉHO NERVU	bolest vzniklá poruchou systému signalizace bolesti
OLIGOSPERMIE	nižší počet spermií než 15 milionů spermií na 1 ml spermatu
PANCYTOPENIE	snížené množství všech krevních elementů
PREVALENCE	počet pacientů s daným onemocněním v určitém okamžiku
PROPRIOCEPCE	hloubková citlivost
PROTEINURIE	zvýšené množství bílkovin v moči

REN	ledvina
RENÁLNÍ INSUFICIENCE	akutní nebo chronické onemocnění ledvin
RETINOL	vitamín A
SÉRUM	krvní tekutina po odstranění všech krevních elementů vysrážením krve a následném oddělení sraženiny, bez přítomnosti fibrinogenu a srážecích faktorů
SOUS-VIDE	vaření při nízké teplotě ve vakuu

ÚVOD

Vitamín B₁₂ byl objeven v roce 1824 náhodou při pokusu o léčbu pacientů trpících perniciózní anémií, která byla až do 20. století považována za nevléčitelné onemocnění s fatálními následky. První lék na tuto nemoc, tzv. anti-perniciózní faktor, objevili vědci George Minot a William Murphy, kteří pozorovali zlepšení stavu pacientů po požití jater. Za svoji práci byli o sto let později odměněni Nobelovou cenou za medicínu a fyziologii. O objev vnitřního faktoru se zasloužil americký vědec William Bosworth Castle. (Randaccio et al. 2010; Scott and Molloy 2012).

Po Druhé světové válce izolovali účinnou látku z jater nezávisle na sobě dva vědci: Karl August Folkers a Emil L. Smith, která byla pojmenována vitamín B₁₂, dnes známá jako kyanokobalamin. Skutečnou strukturu vitamínu B₁₂ objevila v roce 1955 Dorothy Hodgkin pomocí rentgenového záření, za což obdržela v roce 1964 Nobelovu cenu (Randaccio et al. 2010; Scott and Molloy 2012)

Tento esenciální mikronutrient má nezastupitelnou roli v lidském těle. Účastní se biochemických reakcí jako kofaktor enzymů, má antioxidační účinky a je také součástí imunitního systému. Jeho deficit způsobuje řadu patologických procesů, které mohou vyústit až v závažná onemocnění jako např. anémie nebo neurodegenerativní choroby. Vitamín B₁₂ je předmětem intenzivního zkoumání zejména vzhledem k možnému předejití neurologických problémů, např. Alzheimerovy choroby (Scott and Molloy 2012; Z., D., and D. 2021; Lauer et al. 2022; Kinney et al. 2018).

Příčiny nedostatku kobalaminu mohou být vrozená nebo získaná onemocnění, interakce s léčivými nebo životní styl. Vhodně zvolené stravování může předcházet vzniku hypokobalaminémie, proto se tato práce zabývá i přehledem vhodných potravin a jejich porovnáním. V roce 1972 Robert Burns Woodward a Albert Jacob Eschenmoser provedli první úspěšnou syntézu kobalaminu. Tento objev umožnil dodávat vitamín B₁₂ do organismu jinak než z potravy, což umožňuje prevenci před vznikem deficitu právě u rizikových skupin, zejména vegetariánů a veganů. Zároveň nabízí i možnou léčbu pro dotčené pacienty. (Randaccio et al. 2010; T., Y., and F. 2018; Watanabe et al. 2014; Lauer et al. 2022; Oh, Cave, and Lu 2021)

1. STRUKTURA A STABILITA

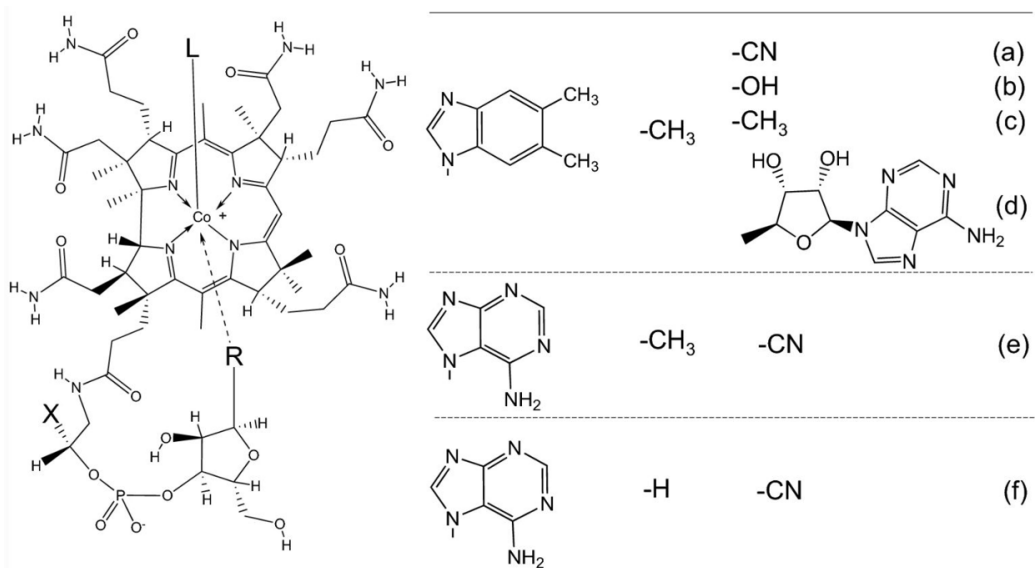
Vitamin B₁₂, označovaný také jako kobalamin, se řadí do vitamínů skupiny B, které jsou, spolu s vitamínem C, označovány jako vitamíny rozpustné ve vodě. Jedná se v chemickém složení o velmi nesourodou skupinu látek, které ale mají podobné vlastnosti. Do B-komplexu, jak je tato skupina také označována, řadíme 8 různých sloučenin, z nichž téměř každá se vyskytuje ve více funkčních i substitučních variantách (Randaccio et al. 2010).

Po strukturní stránce je vitamin B₁₂ nejvíce komplikovanou sloučeninou ze skupiny vitamínů B. V molekule obsahuje centrální atom šestivazného kobaltu v oxidačním čísle +III, na který jsou koordinačně-kovalentní vazbou přes atomy dusíku navázána 4 pyrrolová jádra korinového skeletu. Vyskytuje se v několika substitučních derivátech dle navázaného ligandu. Na páté vazbě, zespodu korinového kruhu, je navázán druhý dusík 5,6 - dimethylbezimidazolu. Právě existence této vazby odlišuje kobalaminy od jiných jim podobných látek. Šestá koordinačně-kovalentní vazba kobaltu může být rovněž obsazena ligandem. Ten určuje derivát vitamínu B₁₂: kyanokobalamin obsahuje kyanoskupinu, hydroxykobalamin hydroxylovou skupinu, methylkobalamin methylovou skupinu a v případě adenosylkobalaminu je ligandem 5'-deoxyadenosin. Struktura korinoidů je znázorněna na Obr.1.

Variace v horním axiálním ligandu ovlivňuje specifčnost kofaktoru, zatímco substituent navázaný v dolní axiální poloze určuje jeho účinnost (G. A. 2016) .

Kobalaminy jsou strukturně podobné hemoglobinu, chlorofylu a cytochromům. Tato skupina se také označuje jako „pigmenty života“ (Linnell and Ray Bhatt 1995).

Vitamin B₁₂ je fotolabilní, tzn. že se vlivem světelného záření rozkládá, a zároveň je také částečně degradován vysokou teplotou. Je také citlivý na oxidační a redukční činidla zejména siřičitany, kyselinu askorbovou (vitamín C) a soli železa. (D. and A. 2015)



Obrázek 1: Struktura korinoidů: (a) kyanokobalamin, (b) hydroxykobalamin, (c) methylkobalamin (d) 5'-deoxyadenosylkobalamin, (e) pseudokobalamin, (f) nor-pseudokobalamin (K.R. et al. 2017)

1.1. Kyanokobalamin

Kyanokobalamin, jehož specifickým ligandem je kyanoskupina, byl první objevenou formou kobalaminu, (Linnell and Ray Bhatt 1995; M. et al. 2020).

V přírodě se téměř nevyskytuje, a proto se musí uměle syntetizovat ve formě krystalické látky růžového až červeného zbarvení. Je chemicky stálý, a proto se nejvíce využívá jako suplement ve farmaceutických přípravcích obsahující vitamin B₁₂. Nevýhodou je, že není biologicky aktivní formou vitamínu, ale provitaminovou formou. Proto, aby byl v organismu účinný, musí dojít k jeho přeměně na biologicky aktivní adenosylkobalamin nebo methylkobalamin (E. 2017; G. et al. 2016; M. et al. 2000; Z., D., and D. 2021).

Kyanokobalamin je v malé míře přítomný v krevním řečišti, kde na sebe váže zbytky kyanidů z potravin, např. z manioku, mandlí nebo meruňkových pecek, které obsahují amygdalin, tj. kyanogenní glykosid zodpovědný za hořkou chuť (G. et al. 2016).

1.2. Adenosylkobalamin a methylkobalamin

Adenosylkobalamin (AdoCbl) a methylkobalamin (MetCbl) mají řadu podobných vlastností. Jsou aktivní formou vitamínu B₁₂ u lidí i zvířat, ale kvůli své nízké fotostabilitě a náchylnosti k oxidaci se terapeuticky nevyužívají. Vlivem světla dochází k rozštěpení vazby mezi

methylovou nebo 5'-adenosylovou skupinou za vzniku hydroxykobalaminu a formaldehydu. Je-li potřeba čistá forma těchto derivátů, musí se syntetizovat uměle. V obou případech mají vzhled červeného krystalického prášku, který je v případě AdoCbl hygroskopický (L. M. et al. 2020).

Deriváty se od sebe liší navázaným ligandem a také místem výskytu v buňce. Zatímco AdoCbl má navázanou funkční skupinu 5'-deoxyadenosyl, vyskytuje se především v mitochondriích a je hlavní intracelulární formou vitamínu B₁₂. Naproti tomu ligandem MetCbl methylová skupina a je nejvíce zastoupen v cytoplasmě a tělesných tekutinách, např. v mateřském mléce (Linnell and Ray Bhatt 1995; E. 2017; L. M. et al. 2020).

1.3. Hydroxykobalamin a další deriváty vitamínu B₁₂

Hydroxykobalamin je přirozenou formou vitamínu B₁₂, která se vyskytuje v potravinách. Ligandem kobaltu na šesté koordinačně-kovalentní vazbě je hydroxyskupina (L. M. et al. 2020).

Ostatní vitamínové deriváty nejsou farmaceuticky ani metabolicky příliš významné. Jedná se o sulfitokobalamin, kde je ligandem thiolová skupina, akvakobalamin s navázanou vodou a nitrokobalamin, kde je na kobalamin navázaná nitroskupina (L. M. et al. 2020).

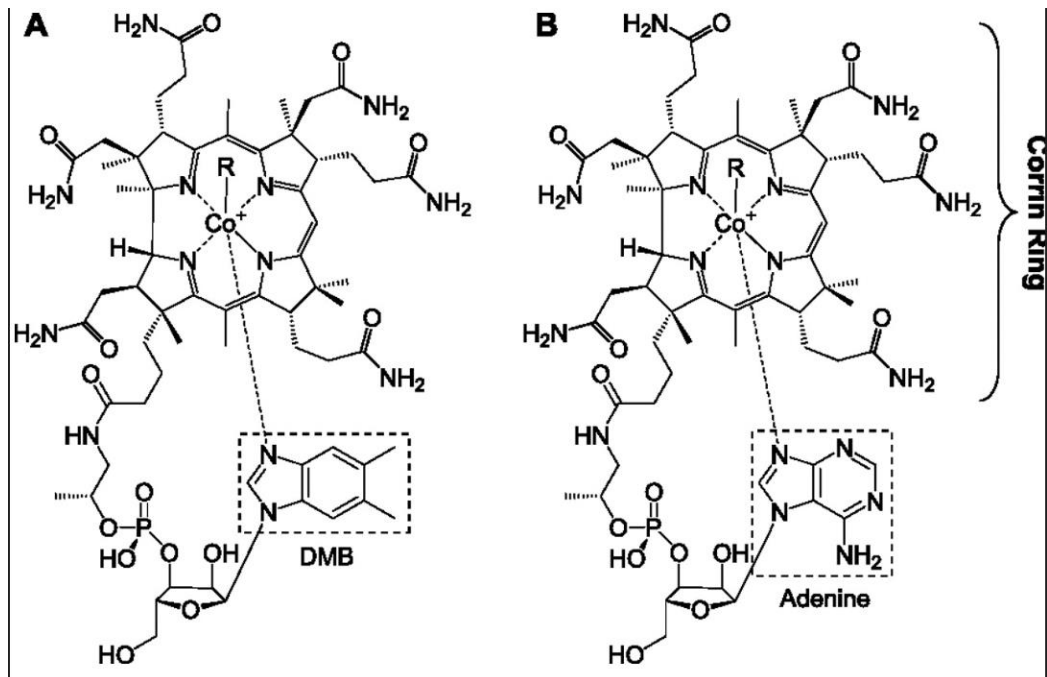
1.4. Pseudokobalamin

Tato sloučenina je v mnohém podobná vitamínu B₁₂. Skládá se z korinového skeletu, jehož centrálním atomem je kobalt. Stejně jako kobalamin, se vyskytuje ve více substitučních derivátech např. s navázanou kyanoskupinou, hydroxyskupinou, methylskupinou apod. Od vitamínu se odlišuje substituentem ve spodní axiální poloze. V případě B₁₂ je to 5,6-dimethylbezimidazol (DMB), zatímco v pseudoforně je zde navázán adenin. Byť je tato sloučenina kobalaminu velmi podobná, není u člověka biologicky aktivní. Porovnání struktury kobalaminu a jeho pseudoforny je zobrazena na Obr.2 (Helliwell 4AD; A.C. et al. 2016).

Produkce pseudokobalaminu je především spjata s řasami a sinicemi. V planktonu existují některé mikrořasy schopné přetvářet pseudokobalamin na biologicky aktivní formu vitamínu B₁₂. Tomuto procesu se říká přestavba vitamínu. Bylo prokázáno, že syntéza kobalaminu

a pseudokobalaminu se v jednom organismu nevyklučuje, pouze probíhá oddělenými cestami (G. A. 2016; J.A. et al. 2022; K.R. et al. 2017).

Biologická neaktivita pro člověka je způsobena nízkou afinitou pseudokobalaminu vůči vnitřnímu faktoru, tedy proteinu zodpovědnému za vylučování mikronutrientu ve střevě (K.E. et al. 2016).



Obrázek 2: Srovnání kobalaminu (A) a pseudokobalaminu (B) (Taga and Walker 2008)

2. VITAMIN B₁₂ V ORGANISMU

2.1. Funkce

Všechny biologické vlastnosti kobalaminu závisí na oxidaci nebo redukci centrálního atomu-tedy kobaltu. Kobalamin zastává v těle řadu funkcí, zejména v metabolismu homocysteinu, kyseliny malonové a jantarové. Dále se podílí na buněčném stresu, intracelulární transdukcí signálu, buněčné apoptóze a dalších procesech. Vitamin B₁₂ se nepřímo účastní i metabolismu kyseliny listové, neboli vitamínu B₉, a účastní se i syntézy DNA při transformaci purinových a pyrimidinových bází (Z., D., and D. 2021; L. M. et al. 2020; Wierzba et al. 2018).

Vitamin B₁₂ musí být po vstupu do efektorové buňky přeměněn na jednu z aktivních forem methylkobalamin nebo adenosylkobalamin, které působí jako kofaktory v příslušných metabolických drahách. Methylové a adenosylové skupiny vznikající při redukci těchto forem kobalaminu se nevyužívají k opětovné syntéze těchto aktivních kofaktorů. Přeměna izoform kobalaminu probíhá v peroxisomech pomocí dealkylačních, dekyanačních a redukčních reakcí, a poté jsou uvolňovány jako AdoCbl nebo MetCbl podle své funkce. Tento krok je důležitý pro aktivaci provitaminových forem. Jiné korinoidní sloučeniny pravděpodobně kvůli vazebné síle nižšího ligandu s atomy kobaltu nejsou schopny aktivovat peroxisomy a tím spustit nutnou přeměnu (Z., D., and D. 2021; G. et al. 2016).

2.1.1. Kofaktor enzymu methyoninsyntasa

MetCbl je kofaktorem cytosolického enzymu methyoninsyntasa, který se přenáší methylovou skupinu a účastní se tak přeměny homocysteinu na methyonin. Kofaktory jsou nebičkovinné části enzymu, jejichž účelem je přenos atomů nebo jejich skupin. Dárce methylové skupiny je methyltetrahydrofolát. Volný aktivní folát THF je nezbytný pro aktivitu thymidylátsyntasy a je zodpovědný za přepravu jednouhlíkatých skupin nezbytných pro syntézu dusíkatých bází tvořících DNA a RNA (Z., D., and D. 2021; E. 2017).

Deficit kobalaminu způsobuje nedostatečnou funkci methyoninsyntasy k narušení navazujících procesů. Zhoršení následných reakcí vede k akumulaci uracilu, který začne nahrazovat thymin v syntéze nukleoproteinů. Klinickým projevem je potom vznik megaloblastické anémie (E. 2017).

Vznikající methionin je prekurzorem S-adenosylmethioninu (SAM), což je sloučenina, která je donorem methylové skupiny v procesu methylace DNA, neurotransmiterů a hormonů. Methylací se také inaktivují některé toxické aromatické sloučeniny. Po poskytnutí methylové

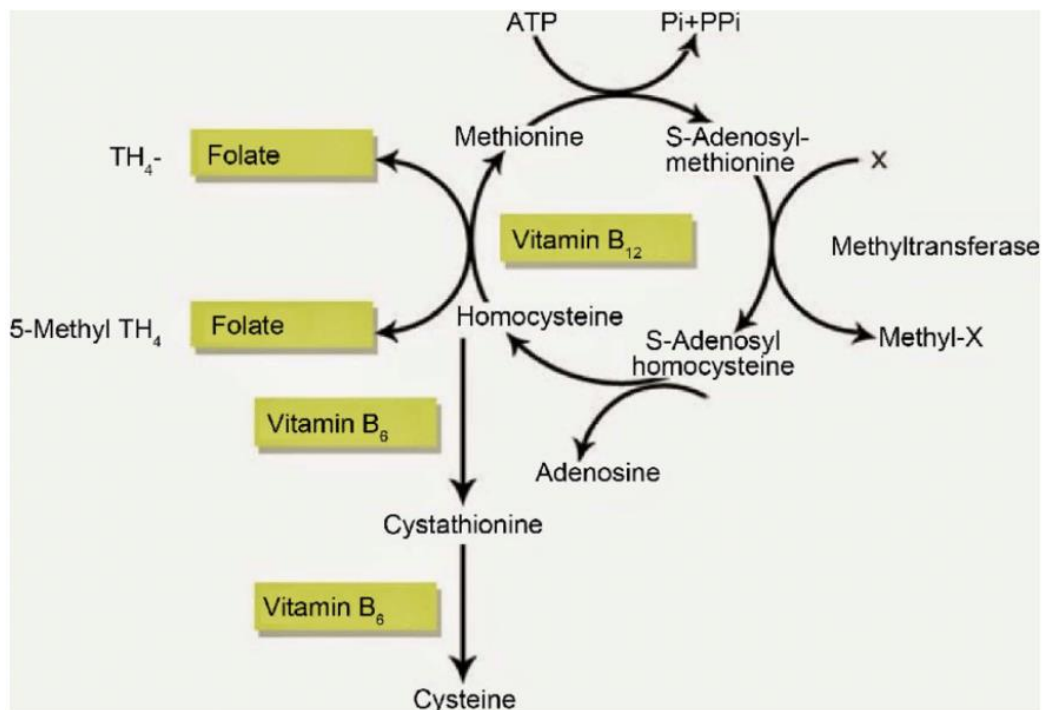
skupiny v reakcích katalyzovaných methyltransferasami je S-adenosylmethionin přeměněn na S-adenosylhomocystein (SAH), který se dále rozkládá na adenosin a homocystein. SAM je nezbytný pro Kennedyho cyklus, což je methylačně závislá dráha syntézy fosfatidylcholinu, nejvíce zastoupeného fosfolipidu v membránách nervových buněk (Lauer et al. 2022; Z., D., and D. 2021).

2.1.2. Kofaktor enzymu L-methylmalonyl-CoA-mutasa

AdoCbl je kofaktorem pro L-methylmalonyl-CoA-mutasu. Tento enzym v mitochondriích katalyzuje konverzi L-methylmalonylCoA na sukcinylCoA, který je součástí citrátového (neboli Krebsova) cyklu, a dále se se účastní syntézy hemu. Dále je tato reakce využívána při katabolismu cholesterolu, mastných kyselin a některých aminokyselin, např. valinu, isoleucinu, threoninu a methioninu. Své uplatnění má i při odbourávání mastných kyselin s lichým počtem atomů uhlíku (D. and A. 2015; Z., D., and D. 2021).

Hromadění methylmalonátu a propionátu může vést ke vzniku abnormálních zdrojů pro syntézu mastných kyselin (E. 2017).

Funkce obou výše zmíněných enzymů je zobrazena na Obr.3. Požitím oxidu dusného dochází k nevratné oxidaci kobaltu z monovalentní formy na dvojmocnou. Tato forma není schopna vykonávat svoji funkci přenašeče methylové skupiny (Sedel et al. 2007).



Obrázek 3: Funkce kobalaminu v organismu (Pirasath, Kumanan, and Thomas 2017)

2.1.3. Antioxidační vlastnosti vitamínu B₁₂ a role v imunitním systému

Antioxidační vlastnosti kobalaminu jsou zmiňovány, ale nejsou dosud plně prozkoumány. Předpokládá se, že se zapojuje do přímého vychytávání reaktivních forem kyslíku (ROS), především superoxidu v cytosolu a mitochondriích a nepřímého vychytávání ROS konverzí glutathionu. Dále může zabraňovat vzniku zánětu vyvolaného oxidačním stresem, a to modulací produkce cytokinů a růstových faktorů, včetně např. tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF- α) a epidermálního růstového faktoru (EGF). Antioxidační účinky má i vůči homocysteinu, který zprostředkovává akumulaci ROS např. pomocí autooxidace homocysteinu za vzniku H₂O₂ a inhibice antioxidačních enzymů glutathion preoxidasy a superoxididismutasy. Vitamin B₁₂ hraje zásadní roli v centrální a periferní nervové soustavě a udržuje její správnou funkci. Kontroluje energetické hospodaření buňky a syntézu myelinu a neurotransmiterů (Lauer et al. 2022; Chan et al. 2018; Kinney et al. 2018)

Adaptivní imunita je spojena s hladinou kobalaminu v organismu. Jeho nedostatek může být příčinou zvýšeného rizika virové infekce a jejího horšího průběhu. Hypokobalminémie ovlivňuje funkci fagocytů, produkci interferonu, zrání T- lymfocytů i samotnou replikaci virů (K.S. et al. 2022).

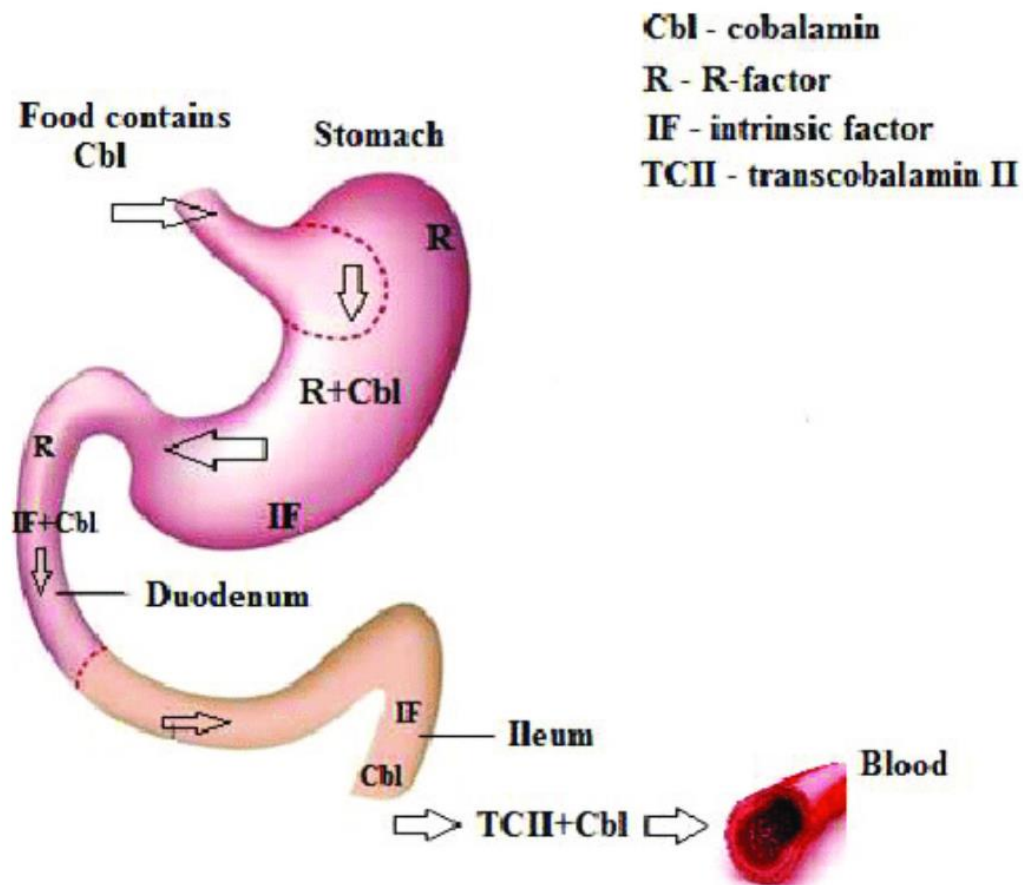
2.2. Vstřebávání vitamínu B₁₂

Kobalamin je nejprve uvolněn z vazby na proteiny enzymatickou degradací pomocí proteolytického enzymu pepsinu, který je uvolňován do žaludku ve formě provitaminu pepsinogenu, který je v místě působení aktivován kyselinou chlorovodíkovou. Pro samotné uvolnění kobalaminu z potravy je nutné nízké pH, při kterém je pepsin aktivní. Kobalamin se do buněk vstřebává dvěma způsoby (D. and A. 2015).

První způsob (viz. Obr.4) vyžaduje zapojení několika transportních proteinů, které se souhrnně označují jako R – proteiny nebo R-vazače, a sekvenčně na sebe navazují (D. and A. 2015; L. M. et al. 2020).

Prvním proteinem vyvazujícím kobalamin z potravy je transkobalamin I (TCI) ve slinách, který váže všechny typy korinoidů včetně antinutričních forem. V duodenu je pomocí degradačního enzymu trypsinu kobalamin vyvázan z bílkovin na vnitřní faktor produkovaný parietálními buňkami, což je mnohem specifičtější přenašeč vitamínu B₁₂. V terminálním ileu dojde k přivázání komplexu vnitřní faktor-kobalamin (IF-Cbl) na membránový protein cubulin (CUBN), který spolu receptorem zprostředkovává endocytózu do erytrocytů při neutrálním pH a za přítomnosti Ca²⁺. V erytrocytech dojde k degradaci komplexu, recyklaci

nosičů a k uvolnění Cbl do krevního řečiště, kde je zachycen nosičem transkobalaminem II pravděpodobně vylučovaným buňkami kardiovaskulárního systému. Vzniklý komplex se nazývá holotranskobalamin (HoloTC) a je považován za biologicky aktivní formu vitamínu B₁₂ v krevním řečišti. Transkobalamin II (TCII) se nachází na povrchu buněk a jeho exprese je podmíněna hladinou TCII a kortizolu v séru. HoloTC vstupuje do buňky zprostředkovanou endocytózou, která je podporována transkobalaminovým receptorem. Zbylá část kobalaminu je připojena na haptokorin, známý též pod názvem transkobalamin III (TCIII). Haptokorin zároveň chrání vitamín B₁₂ před kyselinami. Předpokládanou funkcí tohoto přenašeče je odstranění neaktivního podílu kobalaminu prostřednictvím zpětného transportu zpět do jater a uvolnění ve formě žlučových solí ze střev. Komplex TCIII – Cbl, který nebyl odstraněn z krevního řečiště je filtrován a částečně reabsorbován ledvinami (G. et al. 2016; D. and A. 2015; Z., D., and D. 2021; Fabriciová et al. 2012; T., Y., and F. 2018; L. M. et al. 2020).



Obrázek 4: Vstřebávání kobalaminu v organismu (Todorova, Ermenlieva, and Tcancova 2017)

Absorpce, transport a transformace kobalaminu v organismu je omezena vysokou polaritou molekuly, proto zmíněné procesy vyžadují přítomnost specializovaných hydrofobních proteinů.(Z., D., and D. 2021)

Druhý způsob získávání kobalaminu ze střev spočívá v přímé volné absorpci, která je značně omezena. K ní dochází pouze při vysokém koncentračním gradientu, kterého nelze dosáhnout pouze příjmem z potravy. Existuje i pasivní způsob transportu přes slizniční epitel, který je závislý na koncentraci. Touto cestou se však vstřebává pouze 1% veškerého kobalaminu (Z., D., and D. 2021; G. et al. 2016).

3. DEFICIT VITAMINU B₁₂

Nedostatek kobalaminu může být způsoben exogenními nebo endogenními vlivy. Mezi exogenní patří především způsob stravování a životní styl. Často se projevuje u alkoholiků, u nichž dochází k poškození jater, anorektiků s nedostatečným příjmem potravy, vegetariánů nepožívajících maso a veganů, kteří striktně odmítají konzumaci čehokoliv živočišného původu. Deficit kobalaminu je často pozorován i u starších osob a pacientů po chirurgickém zákroku v žaludku nebo žaludečních infekcích. Do endogenních vlivů spadají především vrozené poruchy, např. Imerslund-Gräsbeck syndrom (Z., D., and D. 2021; P. A. et al. 2019).

3.1. Vrozená onemocnění

Vrozené poruchy metabolismu vitamínu B₁₂ jsou vzácné. (Hannibal et al. 2016) Řadíme mezi ně Imerslund-Gräsbeck syndrom nebo poruchy vnitřního faktoru a hlavního transportního proteinu (P. A. et al. 2019; Wheeler 2008; Linnell and Ray Bhatt 1995).

3.1.1. Imerslund-Gräsbeck syndrom

Imerslund-Gräsbeck syndrom (IGS) je onemocnění, též známé jako „juvenilní megaloblastická anémie typu 1“ nebo „selektivní malabsorbce vitamínu B₁₂ s proteinurií“. Jedná se o vzácnou autozomálně recesivní poruchu charakterizovanou proteinurií bez známek onemocnění ledvin a selektivní malabsorbce kobalaminu. Malabsorbce znamená, že dochází k poruše trávení a vstřebávání základních živin. IGS zhoršuje vstřebávání vitamínu B₁₂ a v některých případech i resorpci bílkovin v ledvinách (Gurlek Gokcebay, Akpinar Tekgunduz, and Cavdarli 2020; P. A. et al. 2019)

Molekulovou podstatou tohoto onemocnění je mutace kubilinu (CUBN) nebo genů bez amnionu (AMN). Dva proteiny kódované těmito geny jsou součástí komplexu B₁₂-IF v ileu a receptoru, který je zodpovědný za zpětné vychytávání proteinů v primární moči. Byly nalezeny bíalelické patogenní mutace CUBN a AMN ve finských a norských rodinách, jiné varianty mutací byly hlášeny i ve Středomoří (P. A. et al. 2019).

Nemoc je diagnostikována genetickým vyšetřením a léčba spočívá v celoživotním podávání vitamínu B₁₂. Deficit kobalaminu může mít za následek vznik megaloblastické anémie, pancytopenie a „pseudo“ trombotické mikroangiopatii. (Gurlek Gokcebay, Akpinar Tekgunduz, and Cavdarli 2020)

Střevní absorpce kobalaminu vyžaduje glykoproteiny transkobalamin nebo haptokorin a IF ze žaludku a IF-kobalaminové receptory v ileu (Linnell and Ray Bhatt 1995).

3.1.2. Porucha hlavního transportního proteinu

TCH je polypeptid syntetizovaný v játrech a dalších tělních tkáních. Jeho přítomnost byla zjištěna i v plodové vodě. Hlavní funkcí je transport kobalaminu. Následkem poruchy transportu kobalaminu je jeho deficit v buňkách, čímž dojde k omezení následných biochemických procesů, ve kterých má svoji nazastupitelnou roli jako kofaktor enzymů. (Wheeler 2008; Linnell and Ray Bhatt 1995). (L. M. et al. 2020).

3.1.3. Porucha vnitřního faktoru

Vnitřní faktor (IF) je glykoprotein, který je u člověka vylučován žaludečními parietálními buňkami a dalšími buňkami v předžaludku. Má velkou afinitu ke kobalaminům, tj. ke korinům s 5,6-dimethylbenzimidazolem jako dolním axiálním ligandem. Pro horní axiální ligand je specifická nízká, proto nezáleží na substituentu, je-li methyl-, adenosyl-, hydroxy- nebo kyano- (Linnell and Ray Bhatt 1995).

Podstatou tohoto onemocnění je snížená afinita IF ke kobalaminu nebo k receptoru v erytrocytech. Dalším příčinou pak může být zvýšená proteolýza IF. Z nedostatku vnitřního faktoru nebo z jeho nedostatečné afinity dochází k rozvoji megaloblastické anémie (L. M. et al. 2020).

3.2. Získaná onemocnění

3.2.1. Nedostatečné uvolnění kobalaminu z potravy

Nejzávažnějšími endogenními vlivy je malabsorbce vitamínu z potravy neboli syndrom FCBM. FCBM syndrom je neschopnost organismu uvolnit kobalamin z proteinové matrice v potravě a z vazby na transportní proteiny vlivem zvýšeného pH a sníženého množství žaludeční šťávy. Často se vyskytuje u pacientů, kteří dlouhodobě užívají léčiva ze skupiny inhibitorů a antagonistů protonové pumpy a histaminového receptoru. K rozvoji FCBM syndromu může také dojít při poruše produkce IF-faktoru, který napomáhá absorpci vitamínu do erytrocytu, dále při gastritidě (zánět žaludeční sliznice), Addisonově-Biermenově chorobě, dlouhodobé infekci bakterií *Helicobacter pylori* a po parciální gastrektomii. Další onemocnění zodpovědná za vznik hypokobalaminémie jsou Crohnova choroba, Zollinger-Ellisonův syndrom, celiakie a parazitární infekce způsobené zejména tasemnicemi (Z., D., and D. 2021).

3.2.2. Bakteriální a parazitické infekce

K deficitu dochází vlivem kompetice mezi hostitelem a *Helicobacter pylori* o vitamín B₁₂ uvolněný z potravy. Ke klinickým projevům zpravidla dochází až po několika letech, jelikož nedostatek kobalaminu narůstá postupně. Dlouhodobá infekce trávicího traktu bakterií *Helicobacter pylori* způsobuje malabsorpci kobalaminu a zapříčiňuje tak vznik chorob vyvolaných hypokobalaminémií (Combs Jr and McClung 2016; Oh, Cave, and Lu 2021).

Gastritida způsobená infekcí *Helicobacter pylori* může způsobit rozvoj i Alzheimerovy choroby. Primárním pojitkem je vliv nízké hladiny kobalaminu na zvýšení obsahu homocysteinu. Následkem hyperhomocysteinémie dochází k poškození neuronů (Lauer et al. 2022).

Nejčastějším parazitem vyskytujícím se ve střevě člověka je tasemnice, zejména rod *Taenia*. Parazit využívá kobalamin, což snižuje množství tohoto mikronutrientu, které může využít hostitel. Důsledkem je postupné prohlubování deficitu, které se může klinicky projevit až po delším čase. Mezihostitelem tasemnic často bývají ryby. K nákaze dochází konzumací špatně tepelně upraveného nebo zcela syrového rybího masa (Combs Jr and McClung 2016).

3.2.3. Gastrektomie

Chirurgické vynětí části nebo celého žaludku může být rovněž příčinou rozvoje hypokobalaminémie. Gastrektomie ať už částečná nebo úplná zvyšuje riziko snížené hladiny kobalaminu např. nedostatečnou suplementací vitamínu B₁₂ a tím může zapříčinit rozvoj Alzheimerovy choroby podobně jako infekce *Helicobacter pylori* (Lauer et al. 2022).

3.2.4. Diabetes mellitus II. typu

Vznik hypokobalaminémie u pacientů trpících cukrovkou druhého typu je spojen primárně s léčbou metmorfinem, který inhibuje vstřebávání kobalaminu do organismu. Suplementace vitamínem B₁₂ při léčbě tohoto typu cukrovky zlepšuje glykemickou kontrolu, inzulínovou rezistenci a periferní neuropatii (S. Wang et al. 2021).

3.3. Životní styl

3.3.1. Vegetariánství a veganství

Vegetariáni se ve svém stravování vyhýbají pouze masu. Veganství je pak přísný životní styl, kdy lidé nekonzumují maso a oproti vegetariánům ani jiné živočišné produkty jako například mléko a vejce. Proto jsou velmi náchylní k nedostatku vitamínu B₁₂, jehož téměř jediným zdrojem jsou potraviny živočišného původu. Během svého stravování proto musí získávat

vitamíny B-skupiny především z doplňků stravy. Díky svému způsobu stravování jsou jednou z rizikových skupin lidí s následnými onemocněními zapříčiněnými právě deficitem kobalaminu, např. demence nebo Alzheimerova choroba (Lauer et al. 2022).

3.3.2. Alkoholismus

Chronický alkoholismus může způsobit malabsorpci kobalaminu a tím zapříčinit rozvoj závažných onemocnění. K rozvoji malabsorpce dochází jednak díky nedostatečnému nebo nedostatečně rozmanitému příjmu potravy a také kvůli cirhotickým játrům, která dostatečně neplní svoji funkci (Oh, Cave, and Lu 2021).

3.4. Interakce s léčivy

3.4.1. Oxid dusný

Rajský plyn se využívá jako anestetikum při zubních zákrocích, porodech nebo ke zmírnění úzkosti. Jeho toxický účinek spočívá především v redukci trojmocného kobaltu v kobalaminu na dvojmocný, čímž dojde k jeho dysfunkci. Neaktivní forma je pak vyloučena spolu s odpadními látkami. Krátkodobá expozice N₂O není pro lidi běžně riziková, ale může ohrozit pacienty, u nichž nebyl rozpoznán závažný nedostatek vitamínu B₁₂ před operací. Při chronickém podávání N₂O může dojít k poruchám, které způsobí špatnou myelinizaci nervových vláken (Combs Jr and McClung 2016).

V současné době se N₂O zneužívá k rekreačním účelům zejména pro rychlé navození euforie a příležitostné halucinace. V mnoha zemích je legálně dostupný a levný, i proto stoupá jeho popularita. Ve Spojeném království zaujímá druhé místo, na prvním je konopí. Mezi krátkodobé vedlejší účinky patří dezorientace, ztráta rovnováhy, zhoršená kognice a paměť. Dlouhodobé užívání inaktivuje kobalamin výše uvedeným způsobem, čímž způsobuje jeho deficit. To se projeví znecitlivěním prstů a při nedostatečné suplementaci se může rozvinout až do periferní neuropatie nebo megaloblastické anémie. (Fu et al. 2017)

3.4.2. Inhibitory a antagonisté protonové pumpy

Do této skupiny spadají medicíně užívané látky omeprazol, esomeprazol, pantoprazol a méně známé lansoprazol a rabeprazol. Tyto léky jsou indikovány pacientům s gastroezofageálním refluxem, refluxní ezofagitidou, žaludečními a dvanáctníkovými vředy apod (Lauer et al. 2022; Minalyan et al. 2017).

Léčiva ze skupiny inhibitorů a antagonistů protonové pumpy a histaminového receptoru snižují produkci kyseliny chlorovodíkové v žaludku a zvyšují pravděpodobnost vzniku

hypokobalaminémie. Snížená kyselost žaludeční šťávy také vede k nárůstu střevní mikroflóry, což vede i ke zvýšení spotřeby kobalaminu. Dalším důsledkem zvýšeného až alkalického pH v žaludku je špatná aktivace pepsinogenu, prekursoru enzymu pepsin zodpovědného za štěpení bílkovin. Tím dochází k malabsorpci vitamínu B₁₂ a dalších mikronutrientů vázaných na proteiny (Z., D., and D. 2021; Lauer et al. 2022; Park et al. 2021; Porter et al. 2021; Zingel, Bohlken, and Kostev 2021).

Mezi vedlejší účinky užívání inhibitorů a antagonistů protonové pumpy také spadá zhoršení kognitivních vlastností. Vlivem hypokobalaminémie se zvyšuje riziko rozvoje demence a Alzheimerovy choroby. Navíc nedávný výzkum prokázal další mechanismus, kterým PPI mohou zapříčinit rozvoj demence. Studie „*in silico docking*“ podala důkaz o selektivní inhibici cholin-acetyltransferasy léčivy ze skupiny PPI. Tento poznatek by mohl vysvětlit vysoké riziko rozvoje demence při užívání PPI (Lauer et al. 2022; Kumar et al. 2020).

3.4.3. Metmorfin

Nově se zkoumá i spojení mezi sníženou koncentrací kobalaminu v séru a metforminem, což je jeden z primárních léků při diabetes mellitus II. typu. Přesná interakce není zatím známá, ale předpokládá se souvislost s poruchou Ca-dependentní absorpce komplexu Cbl-IF ve střevě. Riziko užívání metmorfinu vyvažuje jeho přínos pro kardiovaskulární soustavu (Z., D., and D. 2021; S. Wang et al. 2021).

4. PROJEVY DEFICITU VITAMINU B₁₂

Nedostatek kobalaminu se projeví až po několika letech nedostatečného příjmu z potravy díky tělní zásobě uložené v játrech. Nejdříve dochází k neurologickým poruchám, abnormální krvetvorbě a může dojít ke zvýšení rizika maligní transformace buněk. Zvláště nebezpečný je stav latentního nedostatku kobalaminu, který je maskován nadměrnou suplementací kyseliny listové (Z., D., and D. 2021).

Symptomy deficitu kobalaminu jsou zjistitelné pomocí plazmatických a močových testů Hcy a MMA a analýzou koenzymů kobalaminu v krevní plazmě a Ery, které mohou odhalit deficit koenzymů, tedy MetCbl a AdoCbl (Linnell and Ray Bhatt 1995).

4.1. Nervová soustava

4.1.1. Subakutní kombinovaná degenerace

Deficit vitamínu B₁₂ má za následek nízkou tvorbu methioninu. Methionin je adenosylován na S-adenosylmethionin. Snížená produkce SAMu vede ke snížení produkce bazického proteinu myelinu a následné demyelinizaci míšních neuronů, periferních nervů a bílé hmoty v mozku. Toto onemocnění se nazývá jako subakutní kombinovaná degenerace (SCD). Nedostatek SAMu v centrálním nervovém systému narušuje proces methylace fosfolipidů, včetně fosfatidylcholinu, který je součástí myelinových obalů nervových vláken. Následně dochází k abnormálnímu neurálnímu vedení, které se projevuje encefalopatií a myelinopatií (Z., D., and D. 2021; E. 2017).

Poškození nervů vede k astroglíóze, což je patologický stav astrocytů, tedy nervových buněk hvězdicovitého tvaru. Počátečním příznakem je přetrvávající parestézie končetiny (brnění, necitlivost), následně se projeví ztráta citlivosti, snížení hloubkové citlivosti a k poruše hybnosti. Konečným stavem je spastická paralýza neboli centrální obrna, dolní končetiny (Z., D., and D. 2021).

4.1.2. Aktivace N-methyl-D-aspartátového receptoru

K neurotoxicitě také může docházet při nadměrném hromadění homocysteinu současně při hypokobalaminemickém stavu, kdy může docházet k aktivaci N-methyl-D-aspartátového receptoru (NMDA), který může poškodit buňku oxidací (Z., D., and D. 2021).

4.1.3. Neuropatie

Nízká hladina Cbl je doprovázena zvýšeným množstvím methylmalonové kyseliny (MMA) a homocysteinu (Hcy). Porucha přeměny methylmalonyl-CoA na sukcinyl-CoA způsobuje další toxický stav pro nervovou soustavu. Dochází ke kumulaci MMA v mitochondriích, což nepříznivě ovlivňuje metabolismus mastných kyselin. Abnormálně rozvětvené mastné kyseliny jsou zabudovávány do myelinových pouzder nervových vláken, čímž dochází k narušení jejich integrity a k defektům přenosu nervových vzruchů (Z., D., and D. 2021; L. M. et al. 2020).

Nízká hladina Cbl u starších osob může způsobit poškození nervového systému, ale zároveň nebylo pozorováno zlepšení po terapii (E. 2017).

Klinický projev zahrnuje degeneraci míchy, spastickou slabost dolních končetin, ztrátu proprioceptivního vnímání a v některých případech depresi nebo ztrátu paměti (D. and A. 2015).

4.1.4. Neuropsychiatrické stavy

Příčina tohoto projevu hypokobalaminémie ještě nebyla zcela objasněna. Předpokládá se, že k němu dochází vlivem nedostatku S-adenosylmethioninu, který se podílí na syntézách neurotransmiterů jako například noradrenalin, serotonin a dopamin. Abnormální hladiny těchto hormonů ovlivňujících náladu mohou způsobovat změnu duševního stavu. K projevům patří depresivní stavy, manické příznaky nebo akutní psychóza (Z., D., and D. 2021).

4.1.5. Demence

Demence je chronická a přetrvávající porucha, která se vyznačuje zhoršením kognitivních vlastností, změnami osobnosti, narušeným uvažováním a zhoršenou schopností vykonávat i jednoduché činnosti. Prevalence demence vzrůstá přímo úměrně věku postižených osob. Postup tohoto onemocnění je progresivní a zpravidla nevratný. Pouze včasná identifikace vyvolávajících a reverzibilních faktorů může vést k pozastavení postupného zhoršování a ke zvrácení úpadku kognitivních funkcí. Hypokobalaminémie patří ke zvrátým příčinám rozvoje demence (Sashindran, Aggarwal, and Khera 2022).

Mezi možné projevy chronického nedostatku vitamínu B₁₂ se řadí i rozvoj demence subkortikální povahy. Mezi první projevy onemocnění se řadí psychomotorické zpomalení,

porucha koncentrace a pozornosti a rozvoj demence. V současnosti se medicína zabývá hledáním spojitosti mezi hypokobalaminémií a Alzheimerovou chorobou (Z., D., and D. 2021).

4.1.6. Neurodegenerativní choroby

Alzheimerova choroba je devastující neurodegenerativní onemocnění a nejčastější forma demence. Vede ke ztrátě paměti a ke zhoršení kognitivních funkcí. Histopatologicky se projevuje vznikem extracelulárních neuritických plaků tvořených peptidy a intracelulárních neurofibrilárních klubek v mozku, zejména v hipokampu a mozkové kůře. K rozvoji tohoto onemocnění přispívá především vyšší věk, hypercholesterolémie, hyperhomocysteinémie, hypertenze, ateroskleróza, diabetes mellitus a obezita. Právě vyšší hladina homocysteinu je pojítkem Alzheimerovy choroby a hypokobalaminémie. Patogenní účinky nadměrného obsahu homocysteinu zahrnují poškození funkce hematoencefalické bariéry, zapříčinění poškození neuronů a produkci peptidů odpovědných za tvorbu neurofibrilárních klubek. Homocystein je také odpovědný za vznik oxidačního stresu (Lauer et al. 2022; Kinney et al. 2018).

Pacienti trpící Alzheimerovou chorobou mají sníženou hladinu vitamínu B₁₂ v plazmě. (Lauer et al. 2022) Bylo prokázáno, že podávání kobalaminu spolu s dalšími vitamíny B skupiny má příznivé účinky na kognitivní funkce nebo mozkovou atrofii u starších pacientů. Terapie zahrnuje podávání kobalaminu, který buňku chrání před oxidačním stresem a zpomaluje syntézu peptidů tvořících neurofibrilární klubka v mozku (Lauer et al. 2022).

Huntingtonova a Parkinsonova choroba se také řadí k neurodegenerativním onemocněním. Jejich patogeneze je spojena s dlouhodobým stresem endoplazmatického retikula nervových buněk, který může být způsoben deficitem vitamínu B₁₂ na buněčné úrovni. Stres endoplazmatického retikula je indukován inhibicí exprese enzymu sirtuin (Z., D., and D. 2021).

4.2. Kardiovaskulární choroby

4.2.1. Megaloblastická (makrocytární) anémie

Tato forma anémie je způsobena nedostatkem vnitřního faktoru. Charakteristickým znakem makrocytární anémie je přítomnost abnormálně velkých erytrocytů v krvi, které označujeme pojmem megaloblasty. Tento jev je způsoben narušenou syntézou nukleotidů, která zabraňuje buňce vstoupit do G2 fáze. Následkem je větší velikost červené krvinky a indukce apoptózy,

která přispívá k celkové pancytopenii, tj. stavu, kdy v krvi je snížený počet všech druhů krevních buněk (L. M. et al. 2020; Z., D., and D. 2021).

Klinický projev megaloblastické anémie zahrnuje několik příznaků, mezi něž patří: bledost, problémy s dýcháním, únava, bolesti hlavy a závratě. Další závažné symptomy jsou hypersegmentované neutrofilní leukocyty a také jejich nízký počet, nižší hladina krevních destiček, neplodnost a bolavý jazyk. Chudokrevnost může být řadu let asymptomatická, což se pojí s rizikem vzniku dalších komplikací spojených s deficitem kobalaminu (Z., D., and D. 2021; D. and A. 2015).

4.2.2. Perniciózní anémie

Perniciózní anémie je charakteristickým symptomem autoimunitní metaplastické atrofické gastritidy. Vyskytuje se v pozdějším stádiu autoimunitní atrofické gastritidy, kdy nedostatek žaludečního IF faktoru následně způsobí deficit kobalaminu (Lauer et al. 2022; Esposito et al. 2022).

Toto onemocnění je hlavní syndrom deficitu vitamínu B₁₂ a má dva primární projevy: megaloblastickou anémií a neuropatií. Mohou se vyskytovat zároveň, ale i každý zvlášť. Spolu s těmito symptomy doprovází perniciózní anémií hematopoézy nebo neurologické, psychiatrické a porodnické abnormality (Esposito et al. 2022; D. and A. 2015).

Přímý patogenní účinek není dosud zcela objasněn, ale pravděpodobně souvisí s autoimunitní destrukcí endokrinních žláz v důsledku autoreaktivních T-lymfocytů u geneticky predisponovaných jedinců. Nelze ani vyloučit možný vliv předchozí infekce *Helicobacter pylori* (Esposito et al. 2022).

Onemocnění perniciózní anémií může zapříčinit vznik dlouhotrvajících komplikací souvisejících s nedostatkem mikronutrientů a jejich důsledky. Jedním z častých následků je rakovina žaludku a výskyt neuroendokrinních nádorů (Esposito et al. 2022).

Jedním z hlavních medikamentů pro léčbu je vitamin B₁₂, který se zároveň používá i k léčbě periferní neuritidy (H. et al. 2016).

4.3. Nádorová onemocnění

Hypokolaminémie má vliv na proces methylace DNA a homocysteinu. Spolu s kyselinou listovou hraje kobalamin důležitou roli při udržování správné úrovně methylace biomolekul,

včetně DNA. Tento proces se řadí mezi epigenetické změny v genomu a je závislý na vnějším prostředí, které reguluje úroveň projevů a funkci genů. Nejedná se o mutaci, ale o enzymatickou posttranslační modifikaci, která spočívá v přenosu methylové skupiny ze SAM pomocí dané methyltransferasy. Tímto způsobem dochází k inaktivaci některých genů. Dojde-li ke změnám methylace v DNA v raném stádiu, může to vést k neoplastickému syndromu. Hypermethylace a hypomethylace bývá pozorována v genech specifických pro daný typ nádoru. Jedná se o geny kódující nejběžnější proteiny účastnících se buněčné apoptózy (Z., D., and D. 2021).

Vlivem snížené hladiny kobalaminu může ve zvýšené míře docházet k expresi onkogenů odpovědných za nekontrolovatelné buněčné bujení, a k následnému rozvoji karcinogeneze. Byla prokázána spojitost mezi nižší hladinou kobalaminu a karcinomem žaludku, tlustého střeva, prsu a štítné žlázy (Z., D., and D. 2021).

Naopak hypermethylace je důležitá pro onkogenní supresory, jejichž produkty zabraňují proliferační procesy poškozených buněk. Byl nalezen supresorový gen P16 u rakoviny močového měchýře, hrdla, plic, melanomu a gliomu. Tento gen produkuje protein P16-inhibitor cyklin-dependentní kinázu, což je protein, který ve správném množství inhibuje vstup buňky do G1 fáze buněčného cyklu. Je-li jeho produkce snížena. Dochází k nekontrolovatelnému dělení buněk a k rozvoji neoplastického syndromu (Z., D., and D. 2021).

4.4. Nedostatek vitamínu B₁₂ u těhotných žen a novorozenců

Je doporučován dostatečný příjem kobalaminu již před početím, ale zejména pak během těhotenství a v poporodním období. V prenatálním období získává plod kobalamin z placenty. Doporučený denní příjem kobalaminu pro gravidní ženu je 2,6 mg/den, což je o 0,2 mg/den více než pro netěhotné a dospívající ženy (Zeuschner et al. 2013; Hannibal et al. 2016).

Zásoba kobalaminu kojence je závislá nejen na zásobě matky během těhotenství, funkci placenty, gestačním věku, ale i na porodní hmotnosti novorozence a zásobě matky během kojení (Zeuschner et al. 2013; Hannibal et al. 2016).

Rizikovým faktorem vzniku hypokobalaminémie během těhotenství a po porodu jsou stravovací návyky matky. Vegetariánství a zejména veganství přináší zvýšené zdravotní

riziko nejen pro matku, ale i dítěte. Byla prokázána přímá souvislost mezi koncentrací kobalaminu v séru matky a v mateřském mléce, je-li nízká hladina vitamínu B₁₂ v séru, bude ho mateřské mléko obsahovat rovněž méně (Zeuschner et al. 2013; Jančková et al. 2019).

Opakované těhotenství vegetariánek ještě zvyšuje riziko deficitu kobalaminu u dítěte, protože jejich zásoby tohoto mikronutrientu byly vyčerpávány předchozí graviditou (Zeuschner et al. 2013).

Během těhotenství dochází ke složitému placentárně-fetálnímu metabolismu kobalaminu, který reguluje přenos kobalaminu na plod. Hladina kobalaminu u dítěte koreluje s hladinou tohoto mikronutrientu u matky, ale je 2x-3x vyšší. Nižší fetální zásoba kobalaminu je spojena s jeho nedostatkem u matky, což může mít za následek nedonošenost a nízkou porodní hmotnost. Celková zásoba B₁₂ u novorozence je asi 25 µg a předpokládá se, že tato zásoba je dostačující na první rok života (McPhee et al. 1988; Hannibal et al. 2016).

Deficit kobalaminu současně s vysokou koncentrací homocysteinu ohrožuje během těhotenství zdraví matky i dítěte. Závažným projevem je onemocnění zvané preeklampsie známá také jako EPH gestóza. Projevuje se edémem, proteinurií a hypertenzí. Hypokobalaminémie také může způsobit opakované samovolné potraty nebo předčasný porod. U dítěte nedostatek B₁₂ způsobuje v prvním trimestru poškození neurální trubice, později v závažných případech až růstovou retardaci. V kojeneckém věku mají děti matek s nedostatkem B₁₂ vyšší riziko vzniku hematologických, neurologických a vývojových anomálií, které zapříčiňují celkové neprospívání dítěte. Symptomy tohoto závažného stavu se projevují zejména anorexií, menším obvodem hlavy, křečovými stavy s nebo bez nálezu na přístroji zaznamenávajícím elektrickou aktivitu mozku (EEG), nadměrnou pigmentací, hyperkinézou (nadměrnou motorickou aktivitou) a opožděnými kognitivními a řečovými funkcemi (Jančková et al. 2019) .

4.5. Stáří

Proces stárnutí významně ovlivňuje metabolismus a funkci kobalaminu. Ve vyšším věku se snižuje schopnost střevní sliznice vychytávat a absorbovat kobalamin. Přes metabolismus methylmalonové kyseliny dochází k dysfunkci lysozymové a mitochondriální aktivity, která narušuje intracelulární dostupnost B₁₂. Následně dochází k oxidačnímu stresu a možnému rozvoji diabetes mellitus. (S. Wang et al. 2021; D. and A. 2015)

4.6. Onemocnění COVID 19

Těžký akutní respirační syndrom způsobený virem SARS-CoV-2 se projevuje zejména infekcí dýchacích cest a dále ovlivňuje nervovou a svalovou soustavu, gastrointestinální trakt i kardiovaskulární systém. Uváděné symptomy zasahují osu kosterní sval-střevo-mozek. (K.S. et al. 2022)

Vitamin B₁₂ má prokázanou roli v imunitních mechanismech a pro své antivirové účinky byl zařazen mezi zvažované látky pro podpůrnou léčbu tohoto onemocnění. Dlouhodobá suplementace vitamínem B₁₂ se provádí methylkobalaminem podávaného perorálně nebo lokální injekcí, či kyanokobalaminem užívaného opět perorálně nebo intramuskulární injekcí. (K.S. et al. 2022)

5. BIOSYNTÉZA KOBALAMINU

Kobalamin je syntetizován výhradně mikroorganismy. Hlavní producenti převážně patří mezi anaerobní bakterie, archebakterie v menší míře i řasy. Kmen *Propionibacterium* je nejvíce využívanou kulturou pro syntézu kobalaminu. Konkrétní mikroorganismy používané pro masovou produkci kobalaminu: *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium shermanii* a *Pseudomonas denitrificans* (E. 2017; G. et al. 2016; D. and A. 2015).

Ve vodném prostředí jsou hlavní producentem vitamínu B₁₂ a pseudovitamínu B₁₂ *Thaumarchaeota* a sinice, které jsou součástí planktonu, tedy zdroje potravy pro mořské živočichy. Kobalamin produkovaný *Thaumarchaeota* je zpracováván bakteriemi a eukaryotními organismy, které jej potřebují pro svůj vývoj, např. řasy *Porphyra*. Některé mikrořasy jsou schopné metamorfovat pseudovitamin B₁₂ na skutečný vitamín B₁₂ (T., Y., and F. 2018).

Biosyntéza probíhá například u prokaryotních organismů trávicího traktu přežvýkavců a tlustého střeva lidí, kde vytváří jeho přirozenou mikroflóru. Lidské tělo je schopné syntetizovat si vlastní B₁₂ díky symbiotickým mikroorganismům. Jeho problémem však je neschopnost tento vitamín absorbovat. Kobalamin produkovaný mikroflórou se do těla prakticky nevstřebává, neboť syntéza probíhá pod místem optimální absorpce. Vitamin B₁₂ je mikroflórou produkován v tlustém střevě, zatímco místo nejúčinnějšího vstřebávání je ve střevě tenkém. Proto jej člověk musí přijímat potravou především živočišného původu. Vyšší živočichové a rostliny jej syntetizovat neumí (D. and A. 2015; Z., D., and D. 2021; L. M. et al. 2020).

Biosyntéza kobalaminu zahrnuje více jak 20 po sobě jdoucích reakcí, které probíhají v aerobním a anaerobním prostředí. Přestože je základní molekula syntetizovaná pouze nižšími organismy, všechny savčí buňky jsou schopny jej přeměnit na koenzymy MetCbl a AdoCbl (Linnell and Ray Bhatt 1995; Z., D., and D. 2021).

Různé formy vitamínu B₁₂ jsou odvozeny z tetrapyrrolové biosyntetické dráhy, odchyloující se od metabolismu syntetizujícího hem a chlorofyl v kroku stavby uroporfyrinogenu III. Poté probíhá cca 20 dalších enzymatických přeměn do podoby konečného vitamínu (G. A. 2016).

Mezi bakterie produkující kobalamin aerobním procesem patří *Rhodobacter sphaeroides* a *Pseudomonas denitrificans*, zatímco *Bacillus megaterium*, *Salmonella enterica* a *Propionibacterium freudenreichii* jej produkují za podmínek anaerobních. Nově objevená

bakterie *Sinorhizobium melioli*, která je symbiontem fixujícím dusík při kořenech luštěnin rodu *Medicago*, *Trigonella* a *Melilotus*, je schopná syntetizovat velké množství kobalaminu aerobní cestou během týdenní fermentace při 30 °C. V současné době je potencionálním kandidátem na náhradu *Propionibacterium freudenreichii*, jejíž syntéza vitamínu B₁₂ probíhá ve dvou stupních – za aerobních a anaerobních podmínek a je značně komplikovaná (H. et al. 2016).

6. LÉČBA DEFICITU VITAMINU B₁₂

Doporučená denní dávka Cbl pro dospělé je 2,4 mg/den, přičemž medián denního příjmu z potravy v USA pro ženy je 3,5 mg /den a pro muže 5 mg/den. Nepříznivé účinky z nadbytečného příjmu Cbl nejsou známy. Jiný zdroj uvádí doporučenou denní dávku kobalaminu pro dospělého 1,5 mg/den, při čemž pestrá a vyvážená strava je schopna pokrýt denní potřebu kobalaminu (E. 2017; Z., D., and D. 2021).

Značná část kobalaminu přijatá ve formě doplňků stravy se ukládá ve svalech a játrech s poločasem rozpadu 4 roky. Přesto hlavní zásobárnou vitamínu B₁₂ v těle jsou především játra. Celková zásoba u dospělých je 4–5 mg. Nadbytek vitamínu B₁₂ je vyloučen močí a zároveň každý den je vyloučeno 1,4 – 5,1 µg vitamínu B₁₂ (L. M. et al. 2020; D. and A. 2015).

Perorálně podávaná dávka kobalaminu dodává do těla denně 500–1000 mg/den. Dosud nebyla stanovena žádná horní limitní hranice pro terapeutickou dávku, protože nebyly pozorovány žádné vedlejší účinky při požití větší dávky. V gastrointestinálním traktu se z vysoké dávky B₁₂ podané perorální cestou vstřebá pouze 5 % (Zeuschner et al. 2013).

Užívání multivitaminových doplňků může být k doplnění kobalaminu neefektivní. V přítomnosti vitamínu C a mědi totiž dochází k tvorbě biologicky neaktivních produktů, které navíc mohou inhibovat transportní systém (G. et al. 2016).

6.1. Kyanokobalamin

Kyanokobalamin lze podávat orálně nebo injekčně. Formou injekce se vpichuje pouze intramuskulárně. Využívá se především v doplňcích stravy s denním dávkováním. Dále je lékem první volby při léčbě megaloblastické anémie (L. M. et al. 2020).

6.2. Methylkobalamin a Adenosylkobalamin

Methylkobalamin a adenosylkobalamin se podávají perorálně ve formě tablet nebo kapslí, a také injekčně. Adenosylkobalamin se dodává ve formě intramuskulárních injekcí nebo tablet (L. M. et al. 2020).

Methylkobalamin je schváleným léčivem pro léčbu periferní neuropatie a pro prevenci a léčbu diabetes mellitus II. typu, i když některé vědecké práce jeho účinek rozporují. Dále se využívá ke zlepšení nálady a paměti pacientů s Alzheimerovou chorobou. Má prokazatelný vliv na zlepšení kvality a kvantity spermií u mužů trpících oligospermií. Dále bylo prokázáno, že

MetCbl je účinnější než kyanokobalamin při léčbě subakutní kombinované degenerace (M. et al. 2020).

Adenosylkobalamin má malé klinické uplatnění. Schválený je pouze v Číně, kde se využívá k léčbě megaloblastické, dystrofické a těhotenské anémie, neuralgie trojklaného nervu, ischias a dalších onemocnění. Také se využívá při terapii leukopenie vlivem chemoterapie nebo tablet. V kombinaci s L-karnitinem se používá k léčbě gastrointestinální funkce pacientů s neurofobií (L. M. et al. 2020).

6.3. Hydroxykobalamin

Hydroxykobalamin se podá injekčně buď intravenózně, nebo intramuskulárně, což může být bolestivé. Kromě zmiňované injekční aplikace existuje i metoda orální nebo nazální (L. M. et al. 2020; Z., D., and D. 2021).

Původně se používal jako antidotum při otravě kyanidy a jako lék na některá vzácná onemocnění. V současné době se využívá především při potlačení symptomů methylmalonové acidémie. Obecně se má za to, že HydroxyCbl je účinnější než KyanoCbl. Tato forma se aplikuje v Evropě a USA, v Číně nebyla schválena (L. M. et al. 2020).

7. ZDROJE KOBALAMINU

7.1. Rostlinné zdroje, řasy, sinice a houby

Zelenina obohacená organickými hnojivy

Přidáním organického hnojiva k rostlinám např. špenát, prokazatelně zvýšilo obsah vitamínu B₁₂. Organickým hnojivem se v tomto případě rozumí zejména kravský hnůj. Uměle se rostliny obohacují o kobalamin roztokem s jeho vysokou koncentrací. I zde je prokazatelně zvýšený obsah tohoto mikronutrientu (Watanabe et al. 2014).

Fermentovaná zelenina

Nefermentované sójové boby obsahují minimum kobalaminu, naopak fermentovaný výrobek ze sójových bobů – tempeh, je adekvátní náhradou živočišných zdrojů. Ke zvýšení obsahu vitamínu B₁₂ v tempehu dochází během fermentace díky bakteriální kontaminaci. Dalším poměrně adekvátním zdrojem B₁₂ vyrobeným ze sóji je „sýr“ natto, ostatní výrobky ze sóji už nejsou tak bohatým zdrojem (Watanabe et al. 2014; Z., D., and D. 2021).

V syrové zelenině se vyskytuje nanejvýš stopové množství vitamínu B₁₂ a to zejména v brokolici, chřestu, japonské mateřídoušce a klíčících fazole mungo. Avšak v porovnání s potravinami živočišného původu je jejich obsah tohoto mikronutrientu zanedbatelný (Oh, Cave, and Lu 2021; Mutti 2015).

Ne každá fermentovaná zelenina je dostatečným zdrojem kobalaminu. Korejské kimuchi je zdrojem pouze stopového množství. Rostlinné produkty, obohacené výrazným příspěvkem vitamínu B₁₂, jsou spojeny s fermentací pomocí bakterií mléčného a propionového kvašení. Typickým zástupcem této skupiny je kysané zelí (Watanabe et al. 2014).

Čaj

Stopové množství vitamínu B₁₂ se nachází i v čajových lístcích. Byl proveden pokus na krysách s hypokobalaminémií, kterým byl podáván nápoj z fermentovaného černého čaje zvaný Batabata-cha. Deficit se s délkou trvání pokusu prokazatelně snižoval, avšak pro člověka by konzumace 1 – 2 l nápoje nepokryla ani čtvrtinu denní spotřeby (Watanabe et al. 2014).

Obohacené potraviny

Často jsou o vitaminy B₆, B₉ a B₁₂ obohacovány cereálie. Dalšími komoditami využívanými pro výzkum fortifikace jsou obiloviny, rýžové a pohankové otruby, luštěniny a tempeh. K tomuto procesu se využívají bakterie jako *Propionibacterium freudenreichii*,

Levilactobacillus brevis a spory plísně *Rhizopus oryzae* (Oh, Cave, and Lu 2021; Watanabe et al. 2014; E. 2017).

Obohacování potravin mikronutrienty je z velké části předmětem výzkumu a zatím se jeho potenciál plně neuplatňuje v potravinářství. Je nutné zohlednit skutečnou koncentraci a biologickou dostupnost ve fortifikovaných zdrojích, demografické, geografické a socioekonomické rysy cílových skupin, a především také vliv častého nebo nadměrného dávkování kobalaminu v podobě takto upravených potravin. Fortifikací potravin se má zabránit rozvoji hypokobalaminémie u ohrožených skupin jako jsou děti, senioři, těhotné ženy, a především vegetariáni a vegani (Oh, Cave, and Lu 2021; Jedut et al. 2021)

Řasy

Sušený zelená řasa (*Enteromorpha sp.*) a fialová řasa (*Porphyra sp.*) jsou nejrozšířenější jedlé řasy, které obsahují významné množství vitamínu B₁₂. Ostatní zástupci jedlých řas obsahují pouze stopy této mikroživiny. V sušené korejské nachové řase se vyskytuje významné množství vitamínu B₁₂, které kulinární a tepelnou úpravou snižuje. Schopnost člověka získat z této potraviny potřebný vitamín klesá s rostoucím pH v žaludku, které má příčinu v gastritidě. Jedlá řasa obsahuje vitamínu B₁₂ ve formě koenzymů AdoCbl, MetCbl nebo jako HydroxyCbl. Zejména fialová varianta je i adekvátním zdrojem retinolu a železa (Watanabe et al. 2014; Zeuschner et al. 2013).

Nejčastějšími komerčně dostupnými řasami jsou *Porphyra yezoensis* a *Porphyra tenera* známé pod svým japonským názvem Nori. Jejich pravidelná konzumace může zabránit vzniku hypokobalaminémie. Nejčastěji se využívá v japonské kuchyni. Populární formou konzumace této řasy je ve formě plátků, které se využívají při přípravě sushi (Watanabe et al. 2014).

Další oblíbené řasy v gastronomii a jako složky doplňků stravy jsou wakame (*Undaria pinnatifida*), kombu (řasy čeledi *Laminariaceae*) a tengusa (*Gelidium pacificum*), které obsahují minimální množství kobalaminu. V případě wakame je to 0,5 µg na 100 g sušené řasy. Velmi populární jsou v současné době tabletky Chlorelly, které obsahují biologicky aktivní formu vitamínu B₁₂. Jedná se o mikrořasu *Chlorella sp.*, která obsahuje variabilní množství kobalaminu. Z tohoto důvodu by lidé z rizikových skupin měli dbát nutričního označení na výrobku (T., Y., and F. 2018; Watanabe et al. 2014).

Sinice

Vysoký výskyt vitamínu B₁₂ byl pozorován i u některých jedlých sinic jako jsou *Spirulina*, *Aphanizomenon* a *Nostoc*. Mikrobiologickou metodou byla zjištěna vysoká hladina kobalaminu, avšak bylo zjištěno, že se jedná především o tzv. pseudovitamin B₁₂, který je pro lidi biologicky neaktivní. Tento doplněk stravy proto není vhodný pro rizikové skupiny, protože vzniku hypokobalaminémie by nezabránil (Watanabe et al. 2014).

Houby

Běžně dostupné druhy hub jako například hříby (*Boletus sp.*), hlíva slunečník (*Macrolepiota procera*), hlíva ústříčná (*Pleurotus ostreatus*) a černý smrž (*Morchella conica*) obsahují maximálně stopové množství vitamínu B₁₂. Více kobalaminu obsahovaly plodnice trubače černého (*Craterellus cornucopioides*) a lišky zlaté (*Cantharellus cibarius*). Značné množství obsahuje plodnice houby lví hřívá (*Hericium erinaceus*). Komerčně dostupná houba shitake (*Lentinula edodes*) obsahovala v sušených plodnicích až 5,61 µg kobalaminu / 100 sušiny. V přepočtu na množství komodity, která by pokryla denní spotřebu vitamínu B₁₂, se jedná o 50 g sušených plodnic. Denní konzumace takového množství houby shitake však není dlouhodobě udržitelná. Plodnice houby shitake jsou také bohatým zdrojem železa a ergokalciferol. (Watanabe et al. 2014; Mutti 2015).

7.2. Živočišné zdroje

Nejbohatší zdroje tohoto vitamínu najdeme mezi korýši, ve vnitřnostech, zejména játra, dále potom některá zvířina a ryby (E. 2017).

Ryby a mořské plody

V moři je většina bakteriálně produkovaného kobalaminu koncentrována v rybách a měkkýších, kteří se živí planktonem. Nejedná se pouze o biologicky aktivní formu vitamínu B₁₂ pro člověka, ale i o pseudokobalamin a neaktivní korinoidy. K jejich rozlišení se využívá tenkovrstvá chromatografie (TLC). Přesto se však řadí k významným zdrojům vitamínu B₁₂ zejména pro gastronomii v Asii (T., Y., and F. 2018; Mutti 2015).

Bohaté na zdroj vitamínu B₁₂ jsou extrakty a vývary z mušlí a bonita, které se používají jako základy polévek nebo dochucovadla. Extrakt ze surové svaloviny bonita obsahuje cca. 41 µg vitamínu B₁₂/100 g vlhké svaloviny. Ještě na kobalamin bohatější surovina je výluh ze škeblí (asi 132 µg / 100 g vlhké suroviny). Vývar z konzervovaných škeblí pak obsahuje 14,1 µg volného kobalaminu /100 g. Rybí omáčka je dobrým zdrojem biologicky aktivního

kobalaminu. Obsahuje asi 16 µg B12/100 g. Jejím problémem však je, že není konzumována ve velké míře (T., Y., and F. 2018).

V Japonsku je také oblíbenou pochoutkou tzv. „Mefun“ což jsou solené a fermentované ledviny z lososa jemné chuti. Nejsou však jen lahůdkou, ale také vydatným zdrojem vitamínu B₁₂ v biologicky aktivní formě pro člověka. Obsahují 328 µg/100 g vlhké potraviny (T., Y., and F. 2018).

Hladina kobalaminu u větších rybožravých ryb je vyšší než u ryb živících se planktonem nebo všežravých ryb. Také je pozorována schopnost vstřebávání kobalaminu produkovaného střevními bakteriemi do těla ryb. Tmavé rybí maso obsahuje více jak polovinu celkového množství vitamínu B₁₂ než maso světlé, které zastupuje ¾ rybí svaloviny (T., Y., and F. 2018).

Značné množství kobalaminu v biologicky aktivní formě obsahují jedlí mlži, zejména škeble a ústřice. Další výhodou je, že obsah pseudovitaminu je maximálně stopový. Mořští plži obsahují kobalaminu méně než mlži a byl u nich pozorován poměr pro člověka biologicky aktivní a neaktivní formy vitamínu B₁₂ v závislosti na jejich způsobu stravování. Býložraví mořští plži obsahovali spíše pseudoB₁₂, zatímco jejich masožraví příbuzní naopak pro člověka dostupnou formu kobalaminu. Stručný obsah kobalaminu v některých mořských plodech a rybách je uveden v Tab.1 (T., Y., and F. 2018; Mutti 2015).

Tabulka 1: Srovnání obsahu vitamínu B12 v mořských živočiších s fialovou řasou a kravskými játry (T., Y., and F. 2018)

ryba / mořský plod	obsah B ₁₂ v µg/100 g vlhké hmotnosti
Sleď kulatý	maso:12,2 ; vnitřnosti:37,5
Tuňák pruhovaný	tmavý sval: 63,9 ; světlý sval: 2,2
Extrakt z tuňáka pruhovaného	40,9
Mefun	556,3
Sladkovodní škeble (<i>Corbicula japonica</i>)	53,3
Venuška filipínská (<i>Tapes philippinarum</i>)	37
Ústřice velká (<i>Crossostrea gigas</i>)	43,3
Babylonka japonská (<i>Babylonia japonica</i>)	sval:27,2 ; vnitřnosti:92,8
SROVNÁNÍ	
Sušená fialová řasa	133,8 na 100 g sušiny
Kravská játra	52,8

Maso

Potravininy pocházející z přežvýkavých zvířat jsou bohatým zdrojem kobalaminu. Symbiotické bakterie přežvýkavců, produkující tento mikronutrient, osidlují většinu gastrointestinálního traktu. Po biosyntéze je potom uložen ve svalech a játrech nebo vyloučen v mateřském mléce. Konzumací těchto surovin mohou lidé snadno splnit požadovaný denní příjem. Nejbohatším známým zdrojem vitamínu B₁₂ jsou hovězí játra a potom červené maso (T., Y., and F. 2018; D. and A. 2015; Mulvihill 2014)

Platí, že čím starší jedinec, tím více obsahuje vitamínu B₁₂, proto je hovězí maso lepším zdrojem než telecí, popřípadě skopové než jehněčí. Libová svalovina rovněž obsahuje více kobalaminu než maso s větším podílem lipidů. Je to dáno tím, že svalovina vykonávající oxidační práci obsahuje více mitochondrií a tím pádem také více AdoCbl. Dalším důvodem je, že vitamín B₁₂ se vyskytuje vázaný na proteiny. Proto čím více bílkovin maso obsahuje (je libovější), tím bohatějším zdrojem je (D. and A. 2015; Obeid et al. 2019).

Naměřené hodnoty množství kobalaminu v mase jsou závislé na několika vnějších faktorech, mezi které patří vlastní metoda analýzy, způsob krmení a chovatelských postupů, způsob úpravy masa a také na druhu svaloviny v rámci jednoho zvířete (D. and A. 2015).

Tepelné zpracování má na koncentraci vitamínu B₁₂ dva opačné účinky. Dochází ke zvýšení koncentrace kobalaminu vlivem úbytku lipidů a vlhkosti, ale zároveň se při použití metody „vlhkého tepla“ může spolu s vodou ztratit díky své rozpustnosti v ní. Délka vystavení tepelného působení také ovlivňuje jeho koncentraci. Může dojít k jeho „zahuštění“ a současně i k částečnému tepelnému a světelnému rozkladu. Uváděný úbytek vitamínu B₁₂ ve vařeném mase oproti syrovému je 100–40 %. Záleží na délce vaření a teplotě. Dnes oblíbená metoda „sousvide“ dokonce obsah vitamínu B₁₂ v mase lehce zvýší, naopak vysoká teplota jeho koncentraci snižuje (D. and A. 2015).

Doba zrání je čas mezi porážkou a konzumací masa. Využívá se ke zvýšení kvality masa, zejména jeho větší křehkosti a výraznější chuti. Vliv doby zrání na obsah vitamínu B₁₂ však nebyl prokázán (D. and A. 2015).

Další vliv na obsah kobalaminu v mase má složení krmiva pro chovná zvířata. U skotu se běžně do krmiva vitamín B₁₂ nepřidává, protože jejich organismus je díky bakteriím

v bacheru (část žaludku) soběstačný. Tento kobalamin se ukládá zejména do svaloviny. Vitamin B₁₂ přijatý z běžné stravy ovlivňuje jeho hladinu v játrech, množství v kosterní svalovině neovlivňuje. Předpokládá se, že sníženému stavu obsahu kobalaminu ve svalech přechází jeho úbytek v játrech (D. and A. 2015; Mulvihill 2014) Porovnání množství kobalaminu v různých typech masa je uvedeno v Tab.2.

Tabulka 2: Obsah vitamínu B₁₂ v mase z různých zvířat v závislosti na úpravě (D. and A. 2015)

typ masa	obsah B ₁₂ v µg/100 g	typ masa	obsah B ₁₂ v µg/100 g
JEHNĚČÍ		HOVĚZÍ	
libové syrové	3,00-4,02	syrové	2,83
libové vařené	0,2-1,1	vařené	2,71-2,77
mleté syrové	1,7	játra syrová	54,1-78,2
mleté vařené	2,1	TELECÍ	
SKOPOVÉ		libové syrové	1,6
syrové	2,8	libové vařené	3,0
vařené	1,9	KRŮTÍ	
VEPŘOVÉ		syrové	0,47
syrové	0,45-0,61	vařené	0,44-0,70
vařené	0,32-0,47	KURECÍ	
KOZÍ		syrové	1,73
tepelně upravené	1,09-1,17	vařené	0,19-1-30

Mléko a mléčné výrobky

Stejně jako v mase je vitamin B₁₂ i v mléce vázán na bílkoviny. Nejvíce zastoupenými deriváty kobalaminu v kravském mléce a výrobcích z něj jsou AdoCbl, MetCbl a HydroxyCbl. Koncentrace vitamínu B₁₂ v mléce je závislá na krmivu, sezóně, plemenu skotu a na fázi laktace. Kolostrum, tedy první mléko, obsahuje více kobalaminu než běžné mléko. K velkým ztrátám dochází především během zpracování surového mléka, závisí však na zvolené metodě úpravy. Obsah vitamínu B₁₂ v mléce závisí také na jeho druhu, většinou je však jeho obsah nízký. Nejvíce kobalaminu z mléka přejde při úpravě do tvarohu nebo sýrů, v syrovátce je obsah mikronutrientu snížen mléčnou fermentací (Watanabe et al. 2014; D. and A. 2015).

Ke snížení hladiny kobalaminu během úprav mléka a zejména při výrobě jiných produktů, přispívají startovací kultury, které pro svůj růst využívají právě vitamin B₁₂. Patří sem *Lactobacillus bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*. Jejich přítomnost způsobuje i pokles množství B₁₂ během skladování, protože teplota 4 °C v chladničce není dostatečně nízká pro

inhibici metabolických aktivit bakterií mléčného kvašení. Naopak existují i kmeny bakterií, např. *Propionibacterium*, které vitamin B₁₂ produkují. Bakterie *Propionibacterium shermanii* se přidává do startovací kultury u mléčných nápojů, aby zvýšila obsah kobalaminu. Tento kmen bakterií není samostatně vhodný pro fermentaci mléka (D. and A. 2015).

Obsah vitamínu B₁₂ v **mléce** při tepelném zpracování závisí především na teplotě, ale také na době tepelné expozice a zdroji tepla. Například zahřívání mléka na 75 °C po dobu 5 minut nezpůsobilo žádné ztráty vitamínu B₁₂, naopak vaření po dobu 2–3 minut snížilo jeho obsah až o 30 %. Během pasterizace se ztratí přibližně 10 % B₁₂ a k 0 – 20 % ztrátám dochází během ošetřování mléka ultravysokou teplotou (D. and A. 2015).

Ztráty během skladování mléka závisí na teplotě a předešlé metodě úpravy. Mléko skladované po dobu 18 týdnů při 7 °C po úpravě ultravysokou teplotou nesnížilo obsah kobalaminu, zatímco mléko skladované při 25 °C–35 °C přišlo až o 33 %. Retence vitamínu je závislá na množství kyslíku v obalu. Obsah vitamínu B₁₂ v různých druzích mléka je uveden v Tab.3 (D. and A. 2015).

Tabulka 3: Obsah vitamínu B₁₂ v různých druzích mléka (D. and A. 2015)

mléko	obsah B ₁₂ v µg/100 g	mléko	obsah B ₁₂ v µg/100 g
kravské	0,2-0,7	bůvolí	0,3
ovčí	0,3	koňské	0,3
kozí	0,07	lidské	0,05

Pro fermentaci mléka na **jogurt** se využívají startovací kultury bakterií *Lactobacillus bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*, které snižují obsah kobalaminu v původním mléce o 25 %. Při skladování neotevřeného kelímku jogurtu při 4 °C po dobu 14 dnů dochází k úbytku kobalaminu až o 33 %. Celkový obsah kobalaminu v jogurtu je pouze 40 % obsahu tohoto mikronutrientu v původní surovině, tedy mléce (D. and A. 2015).

Během procesu výroby **sýrů** se odděluje syrovátka, což vede k velkým ztrátám kobalaminu z důvodu jeho rozpustnosti ve vodě. Vzniklý tvaroh obsahuje jen cca 16 % vitamínu B₁₂ původního množství ve vstupním mléce. Balením a skladováním po dobu 10 dnů k úbytku vitamínu nedošlo (D. and A. 2015).

Při výrobě tvrdých sýrů je spolu se syrovátkou odstraněno 44-52 % kobalaminu z původního obsahu v mléce. Během procesu zrání sýrů, které trvá 32 týdnů, dochází k úbytku dalších cca. 10 % (D. and A. 2015; Obeid et al. 2019).

Při výrobě plísňových sýrů je spolu se syrovátkou odstraněno 38 % vitamínu B₁₂. Po 5-6 týdnech zrání a dalších 8 týdnech skladování k úbytku vitamínu B₁₂ nedošlo. Vlivem přídavku propionových bakterií do některých druhů sýra, může dojít k lokálnímu zvýšení množství B₁₂ např. v kůře (D. and A. 2015).

Vejce

Ve vejci je nejvíce kobalaminu obsaženo ve žloutku, ale jeho dostupnost pro organismus není zcela vhodná. (Watanabe et al. 2014)

8. STANOVENÍ

8.1. Stanovení v potravinách

Ke stanovení obsahu kobalaminu v potravinách se využívá několika metod, z nichž některé jsou zde rozebrány podrobněji. Substrátem pro tyto testy jsou komodity samotné nebo jejich extrakty, které se ředí podle instrumentálních technik. Obsah kobalaminu lze pak mimo jiné stanovit i např. hmotnostní spektrometrií, chromatografií nebo spektrofotometricky (M. Wang et al. 2021; D. and A. 2015).

8.1.1. Biologické testy

Tento způsob stanovení využívá mikroorganismy, které ke svému životu potřebují kobalamin. Nejčastěji se používá *Lactobacillus leichmanii*, pro kterého je vitamin B₁₂ obligátním mikronutrientem. Tato metoda vyvinutá v 50. letech, se dříve užívala jako metoda referenční, neboť je poměrně citlivá. Hraniční hodnotou citlivosti je 90 pmol/l. Nevýhodami této metody jsou nespecifické interference, dlouhá inkubační doba 24-48 hodin a zachování sterilních podmínek po celou dobu testu (Dubascoux et al. 2021; Sobczyńska-Malefora et al. 2021).

8.1.2. Atomová absorpční spektrometrie

Tato metoda detekuje stopové prvky. Jedná se o nepřímé stanovení kobalaminu, neboť jeho množství se určuje z množství kobaltu. Pro stanovení kovů z organických materiálů byla vyvinuta metoda grafitové AAS (GF-AAS), která využívá příčně vyhřívaný grafitový atomizér. Principem je absorpce světla charakteristického pro daný prvek jednotlivými atomy, které získáme rozkladem vzorku za vysokých teplot. Uváděným výsledkem je koncentrace kobaltu v potravině ať už v mol/l nebo mol/ kg. Přednostmi této metody jsou citlivost, reprodukovatelnost, snadná aplikovatelnost a průměrné finanční náklady. Tuto metodu lze využít i v klinických laboratořích pro stanovení hladiny kobalaminu v krvi nebo moči pacienta (Zamfir et al. 2016).

8.2. Stanovení v organismu

Včasná detekce deficitu vitamínu B₁₂ může zabránit nevratným klinickým projevům. Nedostatek kobalaminu v organismu je však obtížné diagnostikovat zejména proto, že klinické projevy deficitu nejsou vždy spojeny s jeho nízkou koncentrací v séru. Přesnější metodou je nepřímé stanovení množství vitamínu B₁₂, které se provádí pomocí stanovení obsahu hypokobalaminemických markerů. Jako ukazatele slouží koncentrace MMA, Hcy nebo HoloTC (Z., D., and D. 2021).

Homocystein se vlivem snížené hladiny kobalaminu hromadí v těle, ale jeho zvýšenou hladinu může způsobovat i deficit jiných vitamínů, zejména B₆ a B₉. Rovněž zvýšené množství methylmalonové kyseliny nutně neznamená nedostatek vitamínu B₁₂, ale může značit selhání ledvin. Referenční hodnoty se mohou mírně lišit podle metody stanovení a laboratoře, která měření prováděla. Zpravidla se však uvádí, že pokud je volného kobalaminu méně než 148 pmol/l a zároveň vzorek obsahuje více jak 0,15 μmol/ l homocysteinu a 0,35 μmol/l methylmalonové kyseliny, indikujeme hypokobalaminémii (Z., D., and D. 2021).

8.2.1. Stanovení celkové hladiny screenngovými metodami

Přímé metody

Stanovení celkového sérového kobalaminu

Tato metoda stanovení hladiny vitamínu B₁₂ v organismu je i přes své nedostatky často první volbou. Jedním z nejzávažnějších problémů tohoto biomarkeru je, že hodnotí celkový stav cirkulujícího kobalaminu, přičemž více jak 80 % vitamínu B₁₂ je vázáno na haptokorin, čímž je biologicky nedostupný pro buněčnou absorpci. Dále musíme brát v úvahu i to, že hladina sérového kobalaminu většinou neodpovídá jeho hladině v buňce. Pacienti s vrozenými predispozicemi k hypokobalaminémii mají často normální nebo nízkou hladinu sérového kobalaminu, ale skutečný deficit má původ už na buněčné úrovni. Hladina sérového kobalaminu zůstává v normálních hodnotách i u starších osob, trpících buněčným stresem, přičemž hladina funkčního kobalaminu klesá. Stav pacientů se zlepšil po suplementaci kyanokobalaminem, což bylo potvrzeno i snížením hladiny Hcy a MMA. Z těchto příkladů je patrné, že samotná hodnota celkového sérového kobalaminu není dostatečně přesným ukazatelem biologicky využitelného vitamínu B₁₂. Vysoká hladina sérového kobalaminu může být prvotním ukazatelem onemocnění s abnormálně vysokými hladinami vitamínu B₁₂ (> 650 pmol/l), např. rakovina nebo autoimunitní lymfoproliferativní syndrom (ALPS). Hodnoty fyziologické a patologické hladiny vitamínu B₁₂ jsou uvedeny v Tab.4 (Hannibal et al. 2016) .

Tabulka 4: Koncentrace vitamínu B12 ve fyziologickém a patologickém stavu (Hannibal et al. 2016)

stav	koncentrace (pmol/l)
normální	>250
nízký	150-249
akutní nedostatek	<149

ELISA

Enzymatický imunosorpční test je metoda kvantitativního stanovení různých antigenů. Principem tohoto testu je specifická interakce mezi protilátkou a antigenem, přičemž na jednoho z nich se naváže enzym kovalentní vazbou. Enzym katalyzuje přeměnu substrátu na barevný produkt, který je stanoven fluorescenční metodou nebo spektrofotometricky. Koncentrace produktu je úměrná koncentraci antigenu nebo protilátky. Pro stanovení kobalaminu se využívají protilátky vitamínu B₁₂ (Peng et al. 2022; Sobczyńska-Malefora et al. 2021).

Nepřímé metody

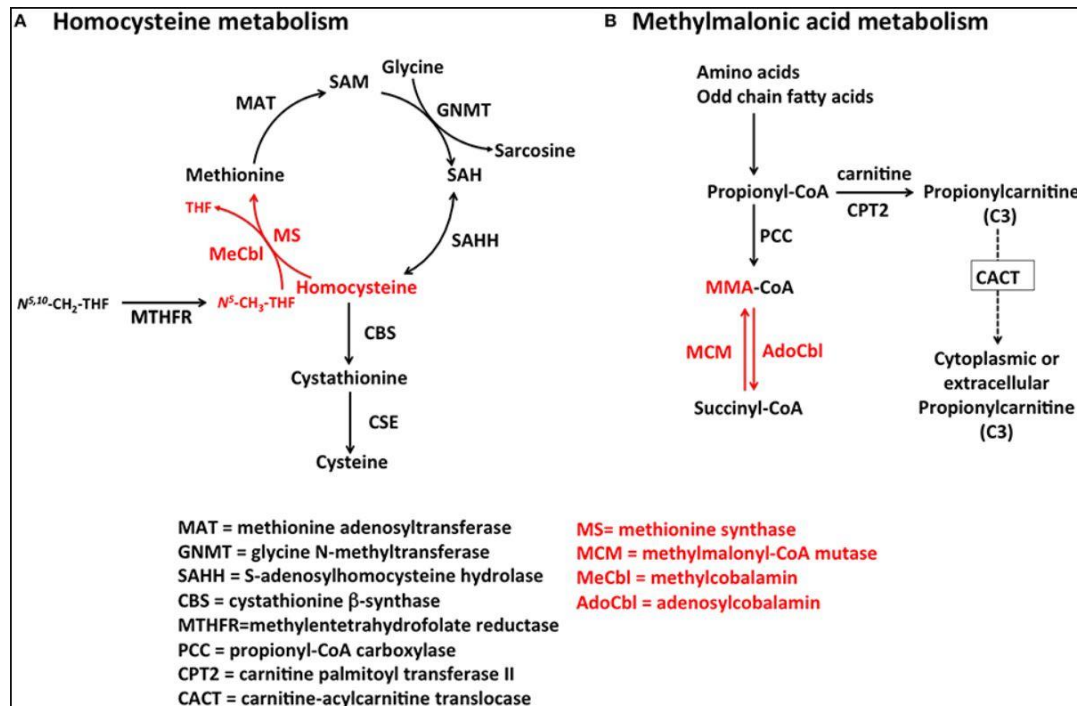
Hladina methylmalonové kyseliny

Ke zvýšení hladiny MMA dochází v důsledku inaktivace AdoCbl-CoA-dependentního enzymu methylmalonyl-CoA-mutasy v mitochondriích. Inaktivace MCM je způsobena nedostatkem vitamínu B₁₂ ať na nutriční nebo funkční úrovni. Následkem toho dochází k hromadění enzymatického substrátu, tj. methylmalonyl-CoA, který se poté dostává do oběhu jako MMA, viz Obr.5. V této reakci také spočívá specifická markeru, neboť reakce katalyzovaná MCM není ovlivňována jiným vitamínem, pouze vitamínem B₁₂. Sérové hodnoty >260 -350 nmol/l MMA, značí již zvýšenou hladinu markeru. Vlastní detekce probíhá metodou plynové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Patologických důvodů pro zvýšení hladiny MMA existuje málo a mezi nejčastější se řadí renální insuficience nebo snížená funkce ledvin. Proto je nutné zjistit hladinu dalšího markeru např. holotranskobalaminu, neboť zvýšená hladina MMA nutně neznačí deficit vitamínu B₁₂ (Hannibal et al. 2016; Valente et al. 2011).

Hladina homocysteinu

Homocystein je metabolitem jednovlákatého cyklu, který je remethylován v přítomnosti enzymu MeCbl-dependentní methioninsyntasy nebo betain-homocystein-methyltransferasy, je-li součástí methioninového metabolismu. K jeho degradaci dochází v transsulfurační dráze v přítomnosti enzymu cystathionin-β-synthasy. Přeměna Hcy na methionin závisí na dostupnosti vitamínu B₁₂ a folátu ve formě N⁵-methyltetrahydrofolátu (N⁵-CH₃-THF), viz Obr.5. Právě nedostatek jednoho z těchto mikronutrientů má za následek hromadění Hcy v séru a moči. Jejich deficit může být způsoben nedostatečným příjmem z potravy nebo také vrozenými poruchami jejich metabolismu, obě příčiny však mají za následek rozvoj hyperhomocystémie. Normální hladiny Hcy v lidské plazmě se pohybuje mezi 5-15 μmol/l,

avšak hodnota $> 13 \mu\text{mol/l}$ se u dospělých již považuje za zvýšenou. Hladina Hcy v séru bývá vyšší než v plasmě v důsledku uvolnění Hcy vázaného na buněčné složky, proto by se ke stanovení měla používat především plasma. Samotné stanovení se provádí metodou vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC). Tento marker má jako samotný ukazatel hladiny B_{12} omezené využití, měl by se využívat spolu s ostatními ukazateli. Test na Hcy a jemu podobné markery se využívají u novorozeneckého screeningu vrozených chyb metabolismu kobalaminu (Hannibal et al. 2016; L. et al. 2016)



Obrázek 5: Metabolismus homocysteinu a kyseliny methylmalonové (Hannibal et al. 2016)

Hladina holotranskobalaminu

HoloTC je komplex kobalaminu navázaný na transkobalamin, který je dodáván do buněk. Z tohoto důvodu je podílem biologicky aktivní B_{12} v organismu. Nízké hladiny holoTC vedou k akumulaci Hcy a MMA v séru. HoloTC se dostává do krevního oběhu, který jej rozvádí k buňkám. Buňky jej vychytávají zprostředkovanou endocytózou pomocí transkobalaminového receptoru. Hodnota tohoto markeru je přesnější při analýze B_{12} v oběhu než v séru a zároveň koreluje s obsahem kobalaminu v erytrocytech. Getekčními metodami jsou HPLC a GC-MS. Množství HoloTC je specifitější ukazatelem než hladina Hcy nebo MMA, zvláště u starších osob. Normální rozsah množství HoloTC u zdravých osob je 20-125 pmol/l. Nízká hladina HoloTC nemusí být nutně zapříčiněna deficitem kobalaminu, ale může poukazovat na některé patologické stavy jako např. chemoterapie, makrocytóza nebo transkobalaminový polymorfismus. Proto je nutné při diagnostice hypokobalaminémie využít

i ostatních markerů (Hannibal et al. 2016; Webster et al. 2021; L. et al. 2016; Valente et al. 2011).

Propionylkarnitin a jeho poměry s acetylkarnitinem a palmitoykarnitinem

Stejně jako předchozí markery je akumulace propionylkarnitinu způsobena sníženou hladinou vitamínu B₁₂. Propionylkarnitin je ukazatelem methylmalonové acidurie a propionové acidémie. Hodnoty markerů C₃, C₃/C₂ a C₃/C₁₆ mají vysoký potenciál coby ukazatele deficitu kobalaminu spolu s Hcy, MMA a HoloTC. C₃, C₃/C₂ a C₃/C₁₆ vykazují negativní korelaci s hladinou vitamínu B₁₂ u matky v prvním trimestru, tzn. pokud hodnota ukazatele roste, hladina kobalaminu klesá a naopak. Tyto markery mají velký potenciál, který je předmětem dalšího výzkumu. Spolu s ostatními ukazateli mohou včasné detekovat nedostatek vitamínu B₁₂ nebo poruchu jeho metabolismu již v prvním trimestru (Hannibal et al. 2016).

8.2.2. Stanovení vstřebaného množství

Průkopnické stanovení kobalaminu potravinách bylo provedeno pomocí kobalaminu s radioaktivně značeným atomem kobaltu: ⁵⁷Co, ⁵⁸Co nebo ⁶⁰Co s 1–100 nCi (nanocurie). Test probíhal tak, že pacientovi bylo podáno přesně dané množství značeného vitamínu B₁₂ a následně se vypočetla absorpce na základě výtěžku neabsorbovaného izotopu v moči nebo stolici. Později byl navržen alternativní způsob počítání izotopu Co v séru. (Brito et al. 2018)

Schillingův test a jeho alternativy se v současnosti už nevyužívají kvůli vysokým nákladům, nedostatečné dostupnosti značeného vitamínu B₁₂, nespolehlivosti metody, přesnému dávkování radiace a sbírání pacientovi moči po dobu 24 hodin (Brito et al. 2018).

Schillingův test malabsorpce vázané na potravu

V druhé polovině 20. století byl nejvíce využívanou testovací metodou pro pacienty s deficitem kobalaminu a u starších lidí s již potvrzenou malabsorpcí. Tento test byl vyvinut profesorem Robertem F. Schillingem a jeho průběh zahrnuje více stupňů (Brito et al. 2018).

V první fázi byla pacientovi podána dávka radioaktivně značeného kobalaminu perorální cestou. Asi za hodinu od požití byl podán 1 mg neznačeného vitamínu B₁₂ intramuskulárně, aby saturovala krevní transport a zajistila, aby se během 24 hodin v moči objevilo měřitelné množství značeného vitamínu. Pokud byl obsah kobalaminu v moči méně než 10 % perorálně podaného množství, prokázala se malabsorpce (Brito et al. 2018).

Ve druhé fázi, po prokázání poruchy vstřebávání, byl původní test modifikován přidáním IF smíchaného s vodou a opět podán perorální formou. Obsahoval-li druhý odběr moči více jak

10 % perorální dávky, jednalo se o známku nízké produkce vnitřního faktoru, což je symptomem perniciózní anémie. Později se používala alternativa tzv. technika dvojitého izotopu, kdy byly pacientovi podány oba izotopy zároveň, nejčastěji ^{57}Co a ^{58}Co , a která vyžadovala pouze jeden odběr moči (Brito et al. 2018).

Pro potvrzení perniciozní anémie byl Schillingův test rozšířen. Pacientům nereagujícím na původní množství vitamínu, byl podán osminásobek původní dávky. V průběhu let docházelo k různým úpravám, podle potřeb diagnostikovaných příčin. Nemocným s podezřením na přemnožení bakterií trávicího traktu, se podával značený kobalamin spolu s antibiotiky, pacienti s pankreatitidou byli identifikováni podáním značeného vitamínu B_{12} spolu s pankreatickými enzymy apod (Brito et al. 2018).

Test frakční absorpce

Metoda FAB_{12} zahrnovala dva izotopy s přídavkem karmínového prášku, ^{51}Cr -chromchlorid, test jednoho vzorku stolice a kompletní odběr stolice. Test je založen na vzorku stolice s nejvyšším obsahem ^{51}Cr (odpovídající stolici nejvíce karmínově zbarvené) a úzce koreloval s testem frakční absorpce vitamínu B_{12} založeným na kompletním odběru (Brito et al. 2018).

9. ZÁVĚR

Vitamin B₁₂ je důležitým mikronutrientem, jehož potenciál není stále plně prozkoumán. Hraje podstatnou roli v metabolismu mnoha látek a ovlivňuje celou řadu biochemických procesů v lidském těle. Napomáhá správnému fungování imunity a je jedním z rizikových faktorů během těhotenství a prvních měsíců života dítěte.

Jedná se o esenciální látku. Lidský mikrobiom je schopen produkovat kobalamin, ale až za místem jeho vstřebávání, proto je nutné jej do těla dodávat potravou. Ke vzniku hypokobalaminémie může docházet z mnoha důvodů, od méně závažných jako např. jeho nedostatečného příjmu ze stravy až po závažné poruchy kobalaminového metabolismu.

Novodobé trendy ve stravování také napomáhají k prohloubení nedostatku vitamínu B₁₂. Vegetariánství a veganství významnou měrou přispívá ke zvyšování počtu pacientů s kobalaminovým deficitem a návaznými onemocněními. Rostlinná strava, na rozdíl od potravin živočišného původu, není dostatečně bohatým zdrojem tohoto mikronutrientu. Proto je předmětem mnoha výzkumů obohacování vitamínem B₁₂ jak zpracovaných potravin, tak zemědělských plodin již během pěstování.

Dostatečný přísun vitamínu B₁₂ lze zajistit konzumací pestré a vyvážené stravy. Doplnky stravy nejsou vždy adekvátním zdrojem, a je třeba dbát obsahu uváděného na etiketách. U výrobků z mořských řas a sinic se obsah kobalaminu mění i v závislosti na sklizni.

V současné době dochází ke zvyšování počtu pacientů postižených civilizačními chorobami, např. diabetes mellitus II. typu. K jejich léčbě nebo zmírňování symptomů se používají léky, které mohou ovlivňovat hospodaření organismu s vitamínem B₁₂. Např. užívání metmorfinu, zejména jako léčiva pro již zmíněnou cukrovku, podporuje vznik hypokobalminémie.

Deficit kobalaminu může mít za následek celou řadu více či méně závažných onemocnění, které mohou propuknout až s odstupem času, jelikož vznik nedostatku je pozvolný proces. Předmětem novodobých studií je hledání souvislostí mezi úbytkem kobalaminu a rozvojem demence, Alzheimerovy choroby nebo psychózy. Hypokobalaminémie je také jedním z možných příčin rakovinového bujení.

Stanovení hladiny kobalaminu v organismu je obtížné a často zkreslené. K přesnější detekci množství vitamínu B₁₂ se využívá několika markerů, jejichž zvyšující se nebo naopak snižující se koncentrace upozorňují na hypokobalaminémii.

Kobalaminový deficit zvyšuje pravděpodobnost výskytu závažnějších onemocnění. Proto by se měla šířit osvěta o jeho funkci v organismu, nutnosti přijímat jej potravou a o ekvivalentních zdrojích zejména mezi rizikové skupiny.

POUŽITÁ LITERATURA

- A., Grossman. 2016. "Nutrient Acquisition: The Generation of Bioactive Vitamin B12 by Microalgae." *Current Biology* 26 (8): R319 – R321.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.02.047>.
- A., Pacitto, Prontera P., Stangoni G., Stefanelli M., Ceppi S., Cerri C., Gurdo G., Mencarelli A., and Esposito S. 2019. "Imerslund-Gräsbeck Syndrome in an Infant with a Novel Intronic Variant in the AMN Gene: A Case Report." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030527>.
- A.C., Torres, Vannini V., Bonacina J., Font G., Saavedra L., and Taranto M.P. 2016. "Cobalamin Production by *Lactobacillus Coryniformis*: Biochemical Identification of the Synthetized Corrinoide and Genomic Analysis of the Biosynthetic Cluster." *BMC Microbiology* 16 (1). <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0854-9>.
- Brito, Alex, Edwin Habeych, Irma Silva-Zolezzi, Nicola Galaffu, and Lindsay H Allen. 2018. "Methods to Assess Vitamin B12 Bioavailability and Technologies to Enhance Its Absorption." *Nutrition Reviews* 76 (10): 778–92. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy026>.
- Chan, Wesley, Mohammadali Almasieh, Maria-Magdalena Catrinescu, and Leonard A Levin. 2018. "Cobalamin-Associated Superoxide Scavenging in Neuronal Cells Is a Potential Mechanism for Vitamin B12--Deprivation Optic Neuropathy." *The American Journal of Pathology* 188 (1): 160–72.
- Combs Jr, Gerald F, and James P McClung. 2016. *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health*. Academic press.
- D., Gille, and Schmid A. 2015. "Vitamin B12 in Meat and Dairy Products." *Nutrition Reviews* 73 (2): 106 – 115. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuu011>.
- Dubascoux, Stéphane, Janique Richoz Payot, Paul Sylvain, Marine Nicolas, and Esther Campos Gimenez. 2021. "Vitamin B12 Quantification in Human Milk – Beyond Current Limitations Using Liquid Chromatography and Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry." *Food Chemistry* 362. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130197>.
- E., Greibe. 2017. *Nutritional and Biochemical Aspects of Cobalamin throughout Life. Vitamin B12: Advances and Insights*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315119540>.
- Esposito, Gianluca, Ludovica Dottori, Giulia Pivetta, Irene Ligato, Emanuele Dilaghi, and

- Edith Lahner. 2022. “Pernicious Anemia: The Hematological Presentation of a Multifaceted Disorder Caused by Cobalamin Deficiency.” *Nutrients* 14 (8). <https://doi.org/10.3390/nu14081672>.
- Fabriciová, K, D Behúlová, J Škodová, D Holešová, M Ostrožl'íková, Katar'ína Schmidtová, V Kožich, and V Bzdúch. 2012. “Poruchy Metabolizmu Vitam B12.” *Pediatr Prax* 13 (4): 166–70.
- Fu, Xiaowei, Carla Francisco, Paul Pattengale, Maurice O’Gorman, and Wendy Mitchell. 2017. “An Adolescent with Increased Plasma Methylmalonic Acid and Total Homocysteine.” *Clinical Chemistry* 63: 1069–72. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.260695>.
- G., Rizzo, Laganà A.S., Rapisarda A.M.C., La Ferrera G.M.G., Buscema M., Rossetti P., Nigro A., et al. 2016. “Vitamin B12 among Vegetarians: Status, Assessment and Supplementation.” *Nutrients* 8 (12). <https://doi.org/10.3390/nu8120767>.
- Gurlek Gokcebay, Dilek, Sibel Akpınar Tekgunduz, and Busranur Cavdarli. 2020. “Imerslund-Gräsbeck Syndrome Presenting with Microangiopathic Hemolytic Anemia in a Child.” *European Journal of Medical Genetics* 63 (6): 103880. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2020.103880>.
- H., Dong, Li S., Fang H., Xia M., Zheng P., Zhang D., and Sun J. 2016. “A Newly Isolated and Identified Vitamin B12 Producing Strain: *Sinorhizobium Meliloti* 320.” *Bioprocess and Biosystems Engineering* 39 (10): 1527 – 1537. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1628-3>.
- Hannibal, Luciana, Vegard Lysne, Anne-Lise Bjørke-Monsen, Sidney Behringer, Sarah C Grünert, Ute Spiekerkoetter, Donald W Jacobsen, and Henk J Blom. 2016. “Biomarkers and Algorithms for the Diagnosis of Vitamin B 12 Deficiency.” *Frontiers in Molecular Biosciences* 3 (JUN). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00027>.
- Helliwell, Katherine Emma. 4AD. “Cyanobacteria and Eukaryotic Algae Use Different Chemical Variants of Vitamin B12.” *Current Biology* 26 (8): 999–1008. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.02.041>.
- J.A., Facey, King J.J., Apte S.C., and Mitrovic S.M. 2022. “Assessing the Importance of Cobalt as a Micronutrient for Freshwater Cyanobacteria.” *Journal of Phycology* 58 (1): 71 – 79. <https://doi.org/10.1111/jpy.13216>.

- Jančeková, Kamila, Zlata Kapounová, Markéta Hašová, and others. 2019. “Vitamin B12 u Těhotných a Kojících Žen s Veganským Způsobem Stravování.”
- Jedut, Paulina, Dominik Sz wajgier, Paweł Glibowski, and Katarzyna Iłowiecka. 2021. “Some Plant Food Products Present on the Polish Market Are a Source of Vitamin B12.” *Applied Sciences (Switzerland)* 11 (8). <https://doi.org/10.3390/app11083601>.
- K.E., Helliwell, Lawrence A.D., Holzer A., Kudahl U.J., Sasso S., Kräutler B., Scanlan D.J., Warren M.J., and Smith A.G. 2016. “Cyanobacteria and Eukaryotic Algae Use Different Chemical Variants of Vitamin B12.” *Current Biology* 26 (8): 999 – 1008. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.02.041>.
- K.R., Heal, Qin W., Ribalet F., Bertagnolli A.D., Coyote-Maestas W., Hmelo L.R., Moffett J.W., et al. 2017. “Two Distinct Pools of B12 Analogs Reveal Community Interdependencies in the Ocean.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (2): 364 – 369. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608462114>.
- K.S., Batista, Cintra V.M., Lucena P.A.F., Manhães-De-Castro R., Toscano A.E., Costa L.P., Queiroz M.E.B.S., De Andrade S.M., Guzman-Quevedo O., and Aquino J.D.S. 2022. “The Role of Vitamin B12 in Viral Infections: A Comprehensive Review of Its Relationship with the Muscle-Gut-Brain Axis and Implications for SARS-CoV-2 Infection.” *Nutrition Reviews* 80 (3): 561 – 578. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuab092>.
- Kinney, Jefferson W, Shane M Bemiller, Andrew S Murtishaw, Amanda M Leisgang, Arnold M Salazar, and Bruce T Lamb. 2018. “Inflammation as a Central Mechanism in Alzheimer’s Disease.” *Alzheimer’s & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* 4: 575–90.
- Kumar, Rajnish, Amit Kumar, Agneta Nordberg, Bengt Långström, and Taher Darreh-Shori. 2020. “Proton Pump Inhibitors Act with Unprecedented Potencies as Inhibitors of the Acetylcholine Biosynthesizing Enzyme—A Plausible Missing Link for Their Association with Incidence of Dementia.” *Alzheimer’s & Dementia* 16 (7): 1031–42. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/alz.12113>.
- L., Hannibal, Lysne V., Bjørke-Monsen A.-L., Behringer S., Grünert S.C., Spiekerkoetter U., Jacobsen D.W., and Blom H.J. 2016. “Biomarkers and Algorithms for the Diagnosis of

- Vitamin B 12 Deficiency.” *Frontiers in Molecular Biosciences* 3 (JUN).
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00027>.
- Lauer, Anna Andrea, Heike Sabine Grimm, Birgit Apel, Nataliya Golobrodska, Lara Kruse, Elina Ratanski, Noemi Schulten, et al. 2022. “Mechanistic Link between Vitamin B12 and Alzheimer’s Disease.” *Biomolecules* 12 (1).
<https://doi.org/10.3390/biom12010129>.
- Linnell, J C, and H Ray Bhatt. 1995. “7 Inherited Errors of Cobalamin Metabolism and Their Management.” *Baillière’s Clinical Haematology* 8 (3): 567–601.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0950-3536\(05\)80221-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0950-3536(05)80221-5).
- M., Li, Chen C., Chen Z., Zhou Y., Yang Y., and Cui Y. 2020. “Cobalamin Metabolism and the Clinical Application in Its Different Forms; [钴胺素代谢及其不同形式的临床应用].” *Chinese Journal of Applied Clinical Pediatrics* 35 (9): 716 – 720. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn101070-20200407-00596>.
- McPhee, A J, G P Davidson, M Leahy, and T Beare. 1988. “Vitamin B12 Deficiency in a Breast Fed Infant.” *Archives of Disease in Childhood* 63 (8): 921–23.
<https://doi.org/10.1136/adc.63.8.921>.
- Minalyan, Artem, Jihane N Benhammou, Aida Artashesyan, Michael S Lewis, and Joseph R Pisegna. 2017. “Autoimmune Atrophic Gastritis: Current Perspectives.” *Clinical and Experimental Gastroenterology* 10: 19.
- Mulvihill, B. 2014. *Micronutrients in Meat. Encyclopedia of Meat Sciences*. Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384731-7.00174-4>.
- Mutti, Elena. 2015. *Food Source of Vitamin B12. : : Chemical Aspects, Transport, Cause and Symptoms of Deficiency, Dietary Sources, and Health Benefits*. Nova Science Publishers, Inc. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84956742605&partnerID=40&md5=78784d020e2263c908d86a07f8eb3e97>.
- Obeid, Rima, Sandra G Heil, Maxime M A Verhoeven, Ellen G H M van den Heuvel, Lisette C P G M de Groot, and Simone J P M Eussen. 2019. “Vitamin B12 Intake from Animal Foods, Biomarkers, and Health Aspects.” *Frontiers in Nutrition* 6.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00093>.
- Oh, Soojin, Gareth Cave, and Chungui Lu. 2021. “Vitamin B12 (Cobalamin) and

- Micronutrient Fortification in Food Crops Using Nanoparticle Technology.” *Frontiers in Plant Science* 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.668819>.
- Park, Yong Eun, Soo Jung Park, Jae Jun Park, Jae Hee Cheon, TaeIl Kim, and Won Ho Kim. 2021. “Incidence and Risk Factors of Micronutrient Deficiency in Patients with IBD and Intestinal Behçet’s Disease: Folate, Vitamin B12, 25-OH-Vitamin D, and Ferritin.” *BMC Gastroenterology* 21 (1): 1–9.
- Peng, Ping, Chang Liu, Zedong Li, Zhenrui Xue, Ping Mao, Jie Hu, Feng Xu, Chunyan Yao, and Minli You. 2022. “Emerging ELISA Derived Technologies for in Vitro Diagnostics.” *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 152. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116605>.
- Porter, Kirsty M, Leane Hoey, Catherine F Hughes, Mary Ward, Michelle Clements, J J Strain, Conal Cunningham, et al. 2021. “Associations of Atrophic Gastritis and Proton-Pump Inhibitor Drug Use with Vitamin B-12 Status, and the Impact of Fortified Foods, in Older Adults.” *The American Journal of Clinical Nutrition* 114 (4): 1286–94.
- Randaccio, Lucio, Silvano Geremia, Nicola Demitri, and Jochen Wuerges. 2010. “Vitamin B12: Unique Metalorganic Compounds and the Most Complex Vitamins.” *Molecules* 15 (5): 3228–59. <https://doi.org/10.3390/molecules15053228>.
- Sashindran, V K, Vivek Aggarwal, and Anurag Khera. 2022. “Prevalence of Vitamin B12 Deficiency in Elderly Population (>60 Years) Presenting with Dementia to Outpatient Department.” *Medical Journal Armed Forces India* 78 (1): 94–98. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2020.11.003>.
- Scott, John M, and Anne M Molloy. 2012. “The Discovery of Vitamin B12.” *Annals of Nutrition and Metabolism* 61 (3): 239 – 245. <https://doi.org/10.1159/000343114>.
- Sedel, F, S Vicart, O Lyon-Caen, B Fontaine, and others. 2007. “Nitric-Oxide Triggered Neurological Disorders in Subjects with Vitamin B12 Deficiency.” *Revue Neurologique* 163 (3): 362–64.
- Sobczyńska-Malefora, Agata, Edgard Delvin, Andrew McCaddon, Kouros R Ahmadi, and Dominic J Harrington. 2021. “Vitamin B12 Status in Health and Disease: A Critical Review. Diagnosis of Deficiency and Insufficiency–Clinical and Laboratory Pitfalls.” *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 58 (6): 399 – 429. <https://doi.org/10.1080/10408363.2021.1885339>.

- T., Bito, Tanioka Y., and Watanabe F. 2018. "Characterization of Vitamin B12 Compounds from Marine Foods." *Fisheries Science* 84 (5): 747 – 755.
<https://doi.org/10.1007/s12562-018-1222-5>.
- Valente, Edward, John M Scott, Per-Magne Ueland, Conal Cunningham, Miriam Casey, and Anne M Molloy. 2011. "Diagnostic Accuracy of Holotranscobalamin, Methylmalonic Acid, Serum Cobalamin, and Other Indicators of Tissue Vitamin B12 Status in the Elderly." *Clinical Chemistry* 57 (6): 856–63.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.158154>.
- Wang, Mengle, Stefan Asam, Jianqi Chen, and Michael Rychlik. 2021. "Development of Stable Isotope Dilution Assays for the Analysis of Natural Forms of Vitamin B12 in Meat." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69 (36): 10722 – 10730.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03803>.
- Wang, Shanjie, Ye Wang, Xin Wan, Junchen Guo, Yiyang Zhang, Maoyi Tian, Shaohong Fang, and Bo Yu. 2021. "Cobalamin Intake and Related Biomarkers: Examining Associations With Mortality Risk Among Adults With Type 2 Diabetes in NHANES." *Diabetes Care* 45 (2): 276–84. <https://doi.org/10.2337/dc21-1674>.
- Watanabe, Fumio, Yukinori Yabuta, Tomohiro Bito, and Fei Teng. 2014. "Vitamin B₁₂-Containing Plant Food Sources for Vegetarians." *Nutrients* 6 (5): 1861–73.
<https://doi.org/10.3390/nu6051861>.
- Webster, Zoe, Maas Mollenhauer, Richard Steele, and Ian Rosemergy. 2021. "Cobalamin (Vitamin B12) Testing in a Tertiary Neurology Service: A Review of Current Practice." *Pathology* 53 (7): 922 – 924. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2021.02.008>.
- Wheeler, Simon. 2008. "Assessment and Interpretation of Micronutrient Status during Pregnancy: Symposium on 'Translation of Research in Nutrition II: The Bed.'" *Proceedings of the Nutrition Society* 67 (4): 437–450.
<https://doi.org/10.1017/S0029665108008732>.
- Wierzba, Aleksandra J, Aleksandra Wincenciuk, Maksymilian Karczewski, Valentine I Vullev, and Dorota Gryko. 2018. "Meso-Modified Cobalamins: Synthesis, Structure, and Properties." *Chemistry – A European Journal* 24 (41): 10344–56.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/chem.201801807>.
- Z., Rzepka, Słaby D., and Wrześniok D. 2021. "Kobalamina - Właściwości Biomedyczne i

Niedobór w Ujęciu Biochemicznym.” *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej* 75 (1): 563 – 572. <https://doi.org/10.2478/AHEM-2021-0004>.

Zamfir, Oana-Liliana, Mihai Ionica, Genica Caragea, Simona Radu, and Marian Vladescu. 2016. “Method for the Determination of Cobalt from Biological Products with Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometer.” In *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, edited by Vladescu M., Cristea I., and Tamas R. Vol. 10010. SPIE. <https://doi.org/10.1117/12.2245311>.

Zeuschner, Carol L, Bevan D Hokin, Kate A Marsh, Angela V Saunders, Michelle A Reid, and Melinda R Ramsay. 2013. “Vitamin B12 and Vegetarian Diets.” *Medical Journal of Australia* 199 (S4): S27–32. <https://doi.org/https://doi.org/10.5694/mja11.11509>.

Zingel, Rebecca, Jens Bohlken, and Karel Kostev. 2021. “Association between Inflammatory Bowel Disease and Dementia: A Retrospective Cohort Study.” *Journal of Alzheimer’s Disease* 80 (4): 1471–78.