



Na úvod si můžeme položit dvě otázky: Proč je nabízeno laboratorním stanovení celkového vitamínu B12 i tzv. aktivní formy? Co je tak zajímavého na vitamínu B12, že se dostaly na trh relativně krátce po sobě komerční soupravy stanovující obě formy analytu na automatických analyzátořech?

Aktivity také s aktivním vitamínem B12

RNDr. PAVEL ŠKRABÁLEK,¹ RNDr. JANA HRADISKÁ, Ph.D.²

¹ Oddělení klinické biochemie a hematologie Turnov, Krajská nemocnice Liberec, a.s.

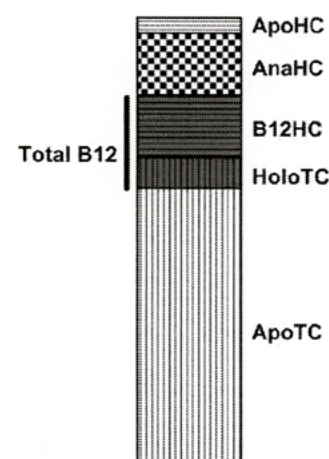
² Oddělení klinické biochemie, Krajská nemocnice Liberec, a.s.

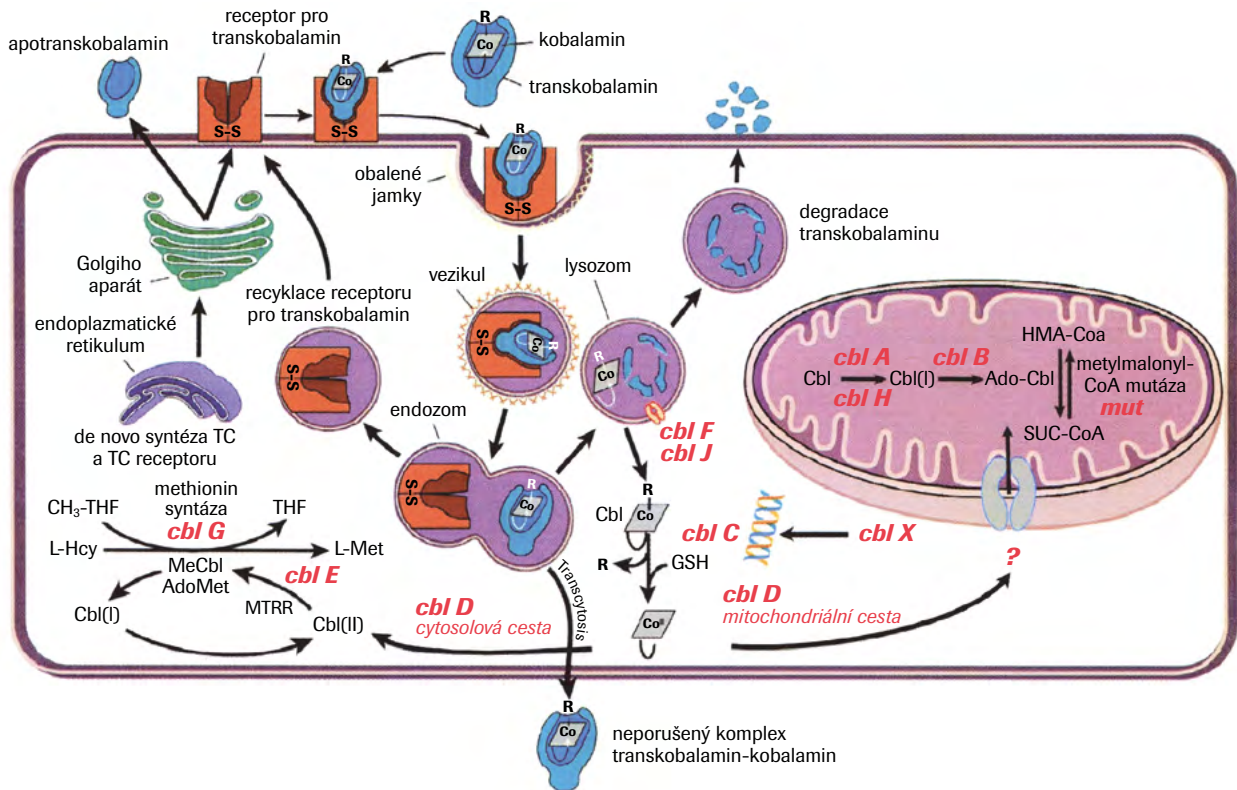
Na tyto otázky víceméně odpovídá P. H. Golding¹, kterého ale spíše zaujal tzv. Herbertův model². Tento model popisuje biochemický a hematologický sled událostí, jejichž následkem je negativní bilance vitamínu B12. Nevědomky tím položil i základ pro komercializaci holotranskobalaminu (aktivní B12).

Pokusme se s pomocí literárních zdrojů představit analyt, o kterém mluvíme. U zdravého člověka žaludeční kyseliny oddělují B12 od bílkovin, haptokorin (HC) ze slin pak uvolněný B12 váže za vzniku holohaptokorinu (holoHC). Zvýšené pH ve dvanáctníku znovu uvolní B12 z vazby na haptokorin a umožní jeho navázání k vnitřnímu faktoru (IF), produkovanému parietálními buňkami žaludku, za vzniku komplexu IF-B12 ve dvanáctníku. Přesedání během putování je nezbytností. V jednu chvíli je chráněn před hydrolyzou v kyselém prostředí a o kousek dále je jeho

nosič haptokorin degradován enzymy vylučovanými pankreatem, aby přestoupil na vnitřní faktor, který je vůči proteolytickým enzymům odolný.²⁰ V terminálním ileu cesta končí, IF je absorbován endocytózou. Zprostředkována je komplexem cubam. Komplex se skládá ze dvou spolupracujících molekul: cubilinu, vázícího vnitřní faktor, a molekuly označované jako amnionless (AMN), která obstarává ukotvení v membráně a zajišťuje endocytické schopnosti. Uvnitř enterocyty je vnitřní faktor degradován proteázami lyzozomu. Uvolněný B12 uniká pravděpodobně s pomocí proteinu LMBD1 membránou lyzozomu do cytoplazmy. Na opačném konci enterocyty, pravděpodobně s pomocí transportérového proteinu MRP1, proniká volný B12 do portální žíly, kde se následně váže na haptokorin (holoHC) a transkobalamin (holoTC).²⁰ Odkud se berou nosiče B12, není příliš jasné. HoloHC putuje do jater, kde je vitamin oddělen a uskladněn. HoloTC přechází do oběhu a je distribuován k buňkám, které jej potřebují. Nyní je nutné ještě přidat regulační principy. Při vzniku potřeby B12 pravděpodobně synergicky působí dva „dveřníci“ pro vitamin B12. Jednak se zvyšuje produkce IF a současně se zvyšuje uvolňování holoHC do žluči z jater, takže

► Obr. č. 1: **Vitamin B12 a jeho vazebné proteiny v plazmě**⁴. Kobalamin (vitamin B12) a jeho vazebné proteiny v lidské plazmě. Obrázek ukazuje vztah mezi celkovou koncentrací proteinů vázajících vitamin B12 v plazmě a distribuci vitamínu B12 a jeho analogy mezi proteiny. Použité jsou průměrné koncentrace následujícím způsobem – celkový transkobalamin: 1 000 pmol/l [holotranskobalamin (HoloTC): 100 pmol/l; apotranskobalamin (ApoTC): 900 pmol/l]; celkový haptokorin: 450 pmol/l [vitamin B12 vázaný na haptokorin (B12HC): 200 pmol/l; analogy vitamínu B12 vázané na haptokorin (AnaHC): 200 pmol/l; apohaptokorin (ApoHC): 50 pmol/l]; celkový vitamin B12: 300 pmol/l





▲ Obr. č. 2: **Zpracování vitamínu B12 z potravy v buňce.**⁷ Buňky přijímají holoTC pomocí TC endocytózy zprostředkovanou TC-receptorem (TCR). V lysozomu je kobalamin (Cbl) uvolněn a apotranskobalamin je degradován, zatímco TCR je recyklován a vystaven zpět na buněčný povrch. Cbl opouští lysozom prostřednictvím transportéru *cblF/cblJ*. V cytosolu podléhá Cbl zpracování enzymem *cblC*, který katalyzuje odstranění axiálního ligandu (R) a redukci kobaltu. Osud nově zpracovaného B12 je dán interakcemi *cblC-cblD*, které jej nasměrují k cytosolické methioninesyntáze (MS, *cblG*) nebo mitochondriální metylmalonyl-CoA mutáze (MCM, *mut*). Nutriční a funkční nedostatek B12 tak vede k inaktivaci závislých enzymů MS a MCM a zvýšení tHcy a MMA.

se dostává do dvanáctníku a podstupuje znovu proces vstřebávání.^{3,4,5,6}

Nutno ještě podotknout, že holoTC představuje menšinu cirkulujícího B12, a TC je saturován asi jen z 10 %. Haptokorin je nosičem i neaktivních forem vitamínu B12. Hladiny transportních proteinů nemají diurnální výkyvy a nekolísají ani při stravě bohaté na B12. Nejsou výraznější rozdíl mezi pohlavími. V těhotenství je popisován pokles hladiny B12 v posledním trimestru, ale nikoliv k hranici deficitu.

Hladina nosiče transkobalaminu se nemění ani při deficitu vitamínu. Naopak k poklesu může dojít při zvýšeném příjmu B12. Vyplývá to pravděpodobně z faktu, že buněčný receptor, pomocí kterého vstupuje do cílové buňky, má vyšší afinitu k holoTC a s jeho zvýšeným vstupem do buněk dojde k přechodnému

snížení v krvi, než se ustanoví nová rovnováha mezi apoTC a holoTC.

Když víte kudy a kam, je vhodná chvíle říci i proč. Vitamin B12, respektive dvě jeho formy, a to metylkobalamin a adenosylkobalamin, se jako kofaktor zásadním způsobem podílí na dvou metabolických procesech:

1. Metabolismus homocysteinu, metylkobalamin. Homocystein může být metabolizován transsulfurační cestou na cystein (enzymem cystationová β -syntáza – CBS), tato reakce je závislá na vitamínu B6. Druhou cestou je přenos metylové skupiny z homocysteinu (Hcy) na methionin za působení enzymu methioninsyntázy (MS). Kofaktorem methioninsyntázy je právě metylkobalamin. Pro úspěšný průběh této reakce jsou rovněž důležité esenciální foláty a enzym MTHFR. Z výše zmíněného vyplývá, že kromě nutričního

nedostatku vitamínu B12 hladinu Hcy v plazmě významně ovlivňuje snížená funkce CBS a MTHFR, ale hlavně i nedostatečný přísun folátu. Je nutno doplnit, že další enzymy metabolických drah, které mají vliv na hladinu Hcy (cystathioninová β -syntáza a S-adenosylhomocysteinhydroláza – SAHH), jsou nezávislé na hladinách vitamínu B12.

2. Metabolismus metylmalonové kyseliny (MMA), adenosylkobalamin. MMA je produkován během katabolismu mastných kyselin a aminokyselin s lichým počtem uhlíků v mitochondriích. Propionyl-CoA je prekurzor MMA v reakci katalyzované propionyl-CoA karboxylázou (PCC). Vrozené vady enzymu PCC vedou k propionikacemii. Podobně mutace metylmalonyl-CoA mutázy (MCM) závislé na AdoCbl vedou k hromadění MMA-CoA a inhibici PCC, která



se projevuje jak zvýšením propionyl-CoA, tak i kyseliny propionové v cirkulaci. Výživový či funkční deficit vitamínu B12 má za následek inaktivaci MCM a zvýšení substrátu MM-CoA, který vstupuje do oběhu jako MMA.⁷

Nyní, když jsme si snad dostatečně vysvětlili, jakých metabolických reakcí se vitamin B12 účastní, je nám jasný i význam a důvody jeho stanovení:

- neurologické poruchy (tvorba myelinu);
- hromadění Hcy a MMA;
- megaloblastická anémie (syntéza DNA), hypersegmentace lymfocytů;
- hladina B12 ovlivněná léky obsahujícími inhibitory protonové pumpy, metformin;
- součást diagnostiky poruch vstřebávání;
- prevence Alzheimerova.

Při bližším průzkumu vyšetření nabízených v laboratořích napříč republikou zjistíme, že většina nabízí stanovení celkového B12, tak jeho aktivní formy s dovětkem, že aktivní forma je preferovaná jakožto specifitější a rychlejší ukazatel deficitu vitamínu B12. Najdou se i „progresivní“ laboratoře, které již stanovení celkového B12 nahradily výhradně stanovením holoTC. Avšak ani holoTC není tak dokonalým testem, jak by se mohlo na první pohled zdát. Pojďme si shrnout problematiku aspekty stanovení aktivního vitamínu B12:

1) Poločas trvání

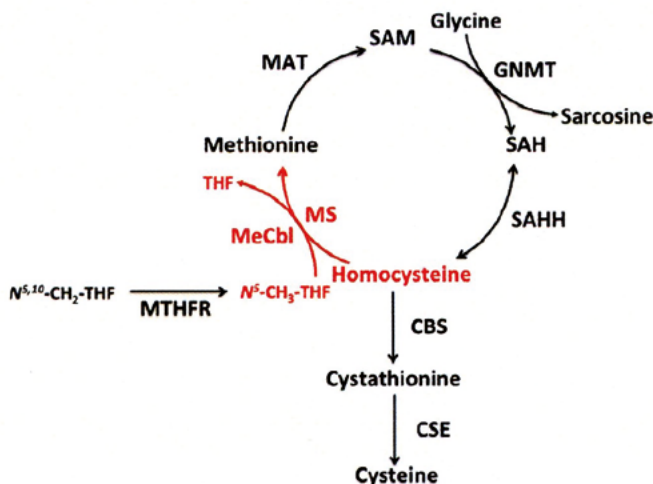
Různé zdroje uvádějí, že holoTC má poločas: 2 dny¹⁵, 18 hodin¹⁶, <2 hodiny¹⁷, 60–90 minut¹⁸, 6 minut¹⁹. Takže tu máme první problém, který vlastně sledujeme, když budeme měřit aktivní

formu. Není to jen kratičký výřez v časové ose, kdy se hladina rychle mění podle potřeby v cílových tkáních? Nebo jde o dlouhodobě stabilní hladinu s rychlou obrátkou?

2) Citlivost k absorpci

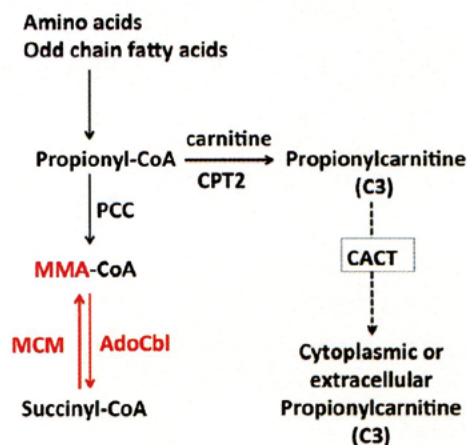
S prvním bodem je úzce spjata také často diskutovaná citlivost holoTC k absorpci vitamínu B12. Názory autorů na tento problém se různí, jak výstižně shrnul ve své práci Golding¹. A opět zde vyvstává otázka, jestliže se hladina holoTC po podání vitamínu B12 zvedne, ukazuje nám jeho koncentrace opravdu dlouhodobý status, anebo jen hladinu po nedávné absorpci? Jak může být holotranskobalamin považován současně za marker časné deficiencie vitamínu B12 a zároveň za marker jeho absorpce?

A Homocysteine metabolism



MAT = methionine adenosyltransferase
GNMT = glycine N-methyltransferase
SAHH = S-adenosylhomocysteine hydrolase
CBS = cystathionine β-synthase
MTHFR = methylenetetrahydrofolate reductase
PCC = propionyl-CoA carboxylase
CPT2 = carnitine palmitoyl transferase II
CACT = carnitine-acylcarnitine translocase

B Methylmalonic acid metabolism



MS = methionine synthase
MCM = methylmalonyl-CoA mutase
MeCbl = methylcobalamin
AdoCbl = adenosylcobalamin

▲ Obr. č. 3: **Metabolismus homocysteinu a kyseliny metylmalonové.**⁷ Homocystein je vedlejším metabolitem na průsečíku remetylce nebo transsulfurační cesty. Homeostáza Hcy se tedy opírá o tři různé biochemické reakce [MS, cystathionin β-syntáza (CBS) a S-adenosylhomocystein hydrolázu (SAHH)], z nichž dvě (CBS a SAHH) jsou nezávislé na vitamínu B12. Kromě nutričního nedostatku vitamínu B12 ke zvýšení hladiny Hcy v plazmě může dojít sníženou funkcí CBS a MTHFR, jakož i nutričním nedostatkem folátů. (B) MMA je produkována během katabolismu mastných kyselin a aminokyselin s lichým počtem uhlíků v řetězci v mitochondriích. Propionyl-CoA je prekurzor MMA v reakci katalyzované propionyl-CoA karboxylázou (PCC). Vrozené vady PCC vedou k propionové acidémii. Podobné mutace v MCM závislé na AdoCbl vedou k hromadění MMA-CoA a inhibici PCC, což se projevuje jako zvýšení koncentrace propionyl-CoA, a k průniku kyseliny propionové do oběhu. Propionylkarnitin může být také transportován z buňky. Propionylkarnitin je první test při novorozeneckém screeningu.

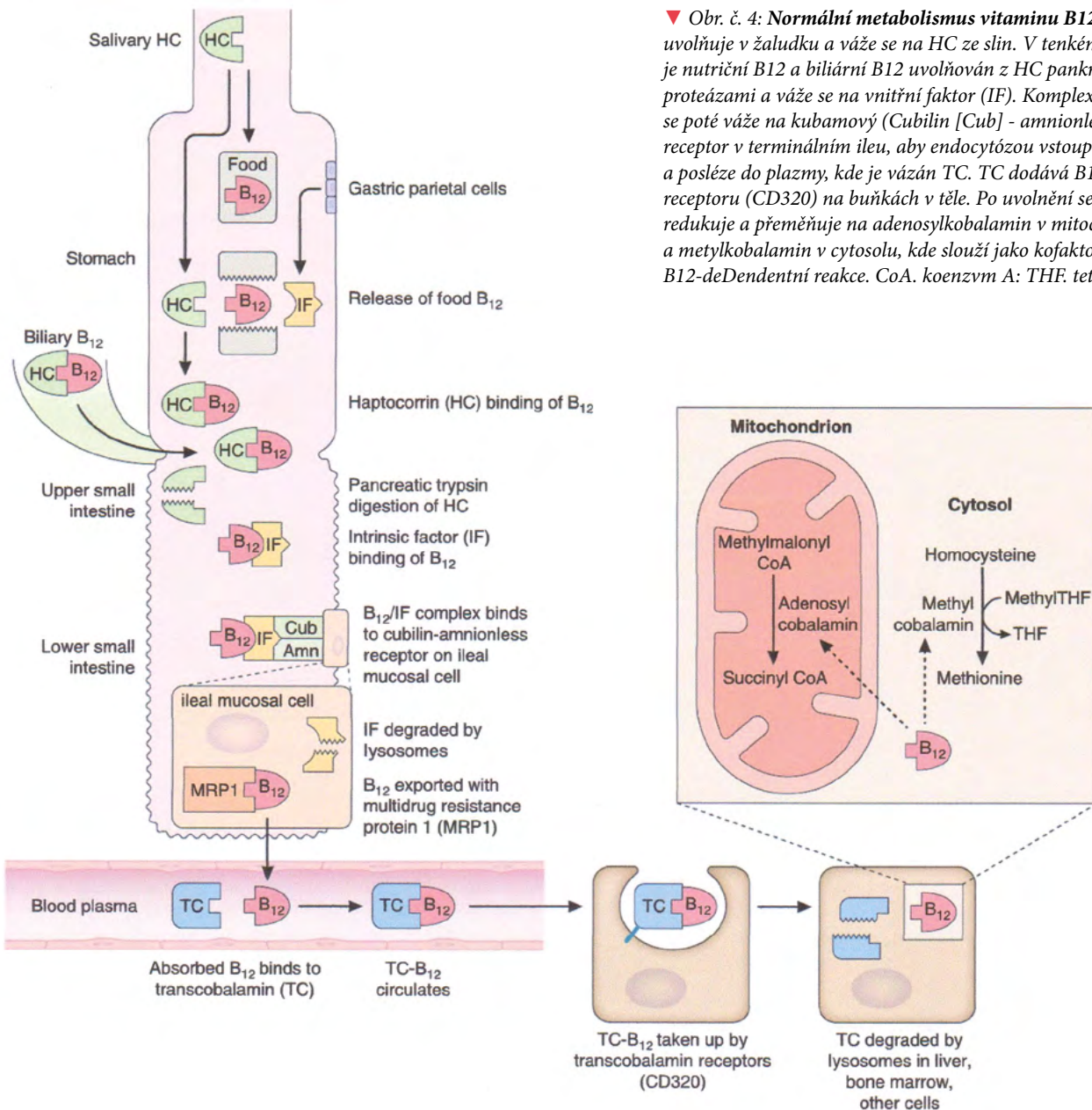


3) Homeostáza holoTC

Většina publikací i výrobců se při propagaci holoTC opírá o výsledky dr. Herberta, který pokládá holoTC za první metabolit reagující na deficienci, nebo chceme-li sníženou absorpci, vitamínu B12.⁸ Tato hypotéza však má opět několik úskalí. U zdravého jedince, který nemá porušenu absorpci vitamínu B12, ale pouze jeho deficit v potravě, trvá několik desítek let, než se vyvine deficit z důvodu existence enterohepatálního oběhu. Každý jedinec má ve svém těle zásobu přibližně 2–3 mg vitamínu B12, přičemž většina je lokalizována v játrech. Odtud je

každý den přibližně 1,4 µg secernováno žlučí zpět do střeva, kde je opět B12 zpracován stejným způsobem jako vitamin z potraviny. Reabsorpce tohoto „zásobního“ B12 je přibližně 50%.^{9,10} Tento fakt ve své publikaci připouští i Herbert. Je ovšem jasné, že v tomto případě k poklesu holotranskobalaminu nedojde, i když fakticky již nastal jeho deficit. Herbertova hypotéza holoTC jakožto prvního markeru deficitu B12 je tak platná pouze v případě, že dojde k náhlé změně vstřebávání vitamínu B12. To může být způsobeno např. přerušením tvorby IF, žluči či při odnětí části duodena či ilea,

kdy recyklovaný B12 nedokáže být zpracován stejně jako ten z potraviny. Nicméně při výše zmíněných stavech (např. při resekcii žaludku) si jsou lékaři vědomi nebezpečí nedostatku B12 a pacienta suplementují lékovou formou vitamínu B12. Tyto syntetické formy vitamínu B12 nejsou vázány na bílkoviny, jako je tomu v potravě, a nepotřebují tudíž ke svému úspěšnému vstřebání IF ani ostatní faktory. Navíc velké množství podávaného B12 nepotřebuje ke svému průchodu přes střevní sliznici receptory, ale prochází volně pasivní difuzí.⁹ Takže i v těchto případech, pokud je pacient správně



▼ Obr. č. 4: Normální metabolismus vitamínu B12. B12 se uvolňuje v žaludku a váže se na HC ze slin. V tenkém střevě je nutriční B12 a biliární B12 uvolňován z HC pankreatickými proteázami a váže se na vnitřní faktor (IF). Komplex IF-B12 se poté váže na kubamový (Cubilin [Cub] - amnionless [Amn]) receptor v terminálním ileu, aby endocytózou vstoupil do buňky a posléze do plazmy, kde je vázán TC. TC dodává B12 do TC receptoru (CD320) na buňkách v těle. Po uvolnění se kobalt v B12 redukuje a přeměňuje na adenosylkobalamin v mitochondriích a metylkobalamin v cytosolu, kde slouží jako kofaktor v Dvořákově (Dro) dvě B12-dependentní reakce. CoA. koenzym A: THF. tetrahydrofolát.



suplementován, nedochází k deficitu vitamínu B12 ani jeho aktivní formy.

4) Nejednotný cut-off

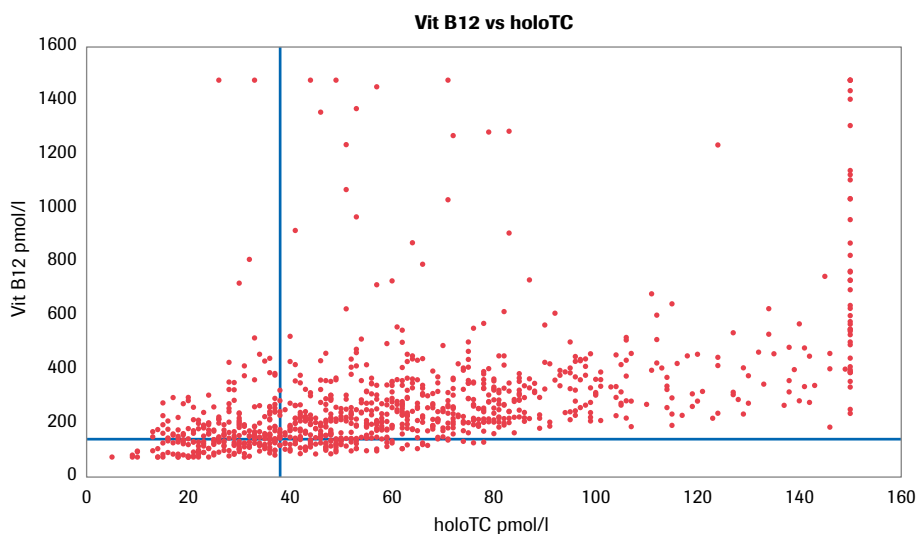
Stanovení holotranskobalaminu je často doporučováno především v tzv. šedé zóně celkového vitamínu B12, která je udávána v rozsahu 150–300 pmol/l, a kdy se předpokládá, že stanovení holoTC je přesnější a diagnosticky cennější.¹¹ Avšak

i u stanovení aktivního B12 je nejednotnost v referenčních mezích a především pak ve spodní hranici, odkdy jsou výsledky stanovení holoTC považovány za patologické. Tato cut-off hodnota se v českých laboratořích pohybuje od 19 do 38 pmol/l, v zahraničních publikacích se často uvádí jako mezní hodnota až 50 pmol/l.¹ Tyto rozdílné meze jsou částečně dány tím,

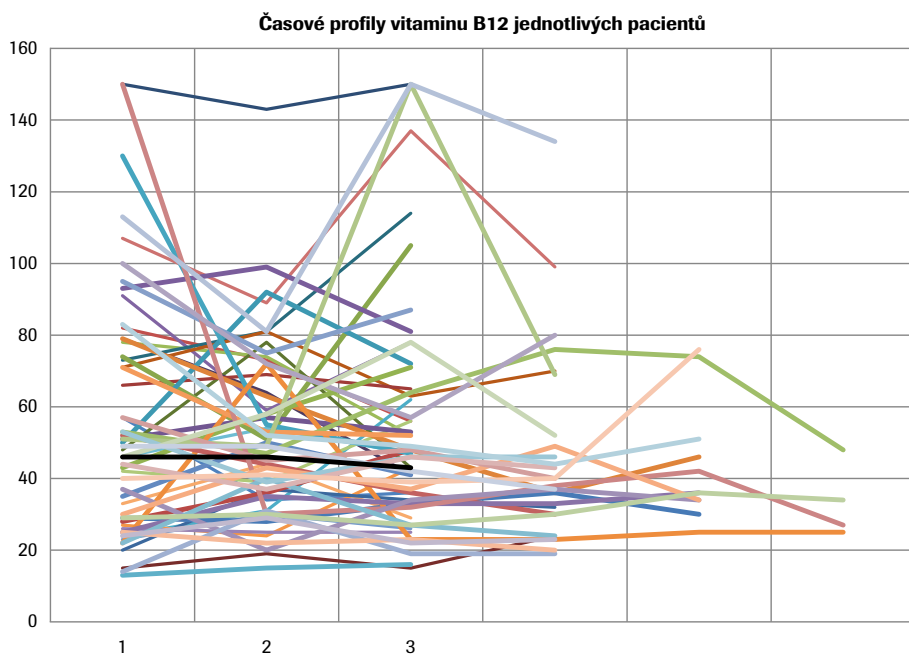
že hodnoty holoTC se liší, stejně jako jiné imunochemické metody, v závislosti na použitém testovacím systému. Avšak jak ukázal Devalia, interpretace získaných výsledků se liší nejen mezi výrobci, ale i v rámci jedné skupiny, kdy je dosaženo stejné hodnoty.¹² Takže se zdá, že i holoTC má stejnou šedou zónu jako celkový vitamin B12, kdy je interpretace získaných výsledků velmi nejednotná. V zahraniční literatuře se v případě výsledků v rozmezí 25–50 pmol/l doporučuje stanovení některého z dalších markerů, jako je celkový B12, homocystein či metilmalonát.¹³ Nevytrácí se však tímto výhody stanovení holoTC?

5) Problematika principu stanovení

Soupravy používají ke stanovení B12 značený vnitřní faktor. Přirozené protilátky proti vnitřnímu faktoru, vyskytující se při perniciózní anémii, mohou způsobit falešně zvýšené hodnoty B12. Je nanejvýš vhodné si ověřit, zda použitá souprava je vůči tomuto efektu odolná.



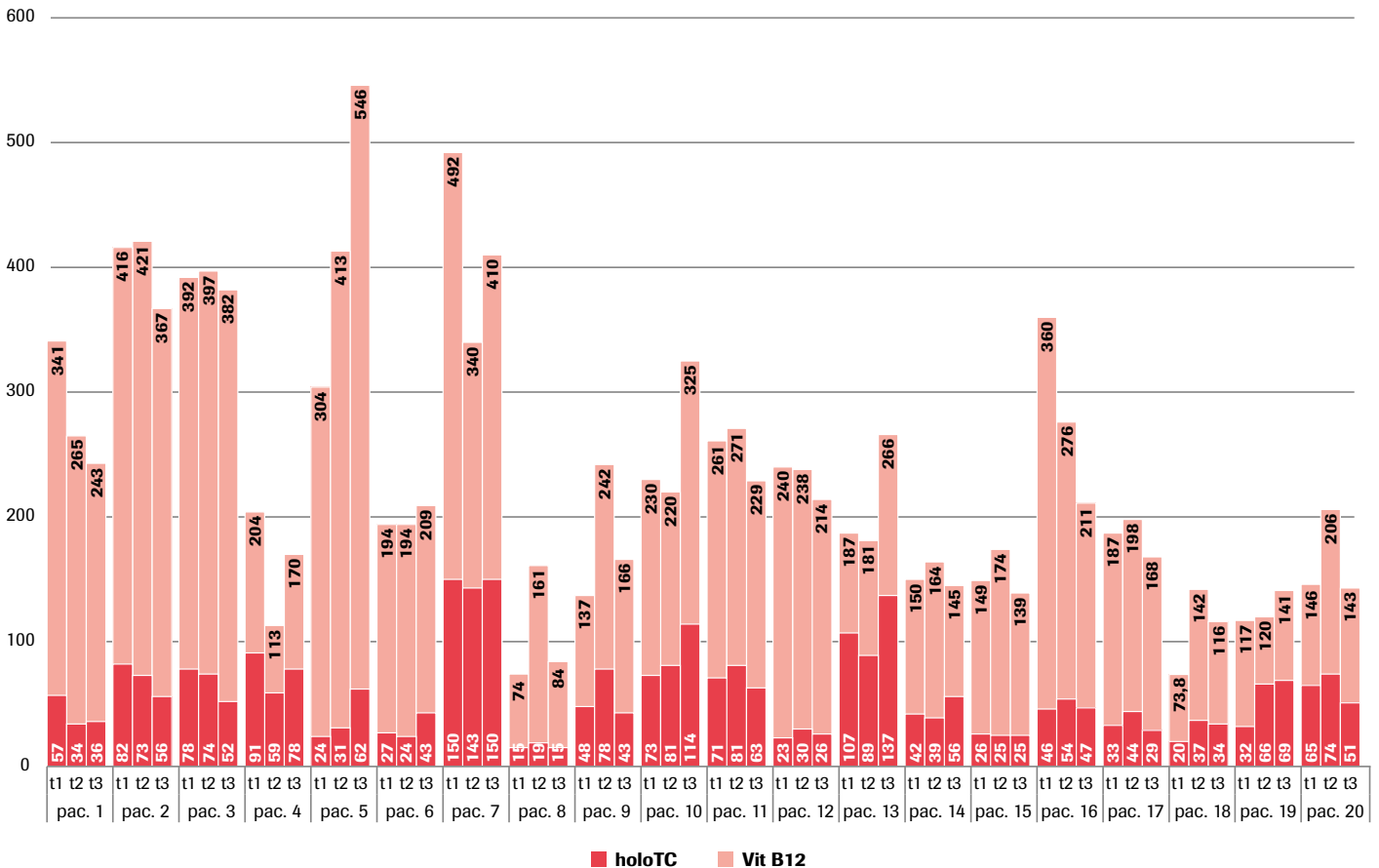
▲ Graf č. 1: Vztah celkového vitamínu B12 a holotranskobalaminu – průsečík znázorňuje cut-off hodnoty holotranskobalaminu (38 pmol/l) a vitamínu B12 (141 pmol/l) používané v naší laboratoři



▲ Graf č. 2: Časový profil hladin vitamínu B12 – jednotlivé linie ukazují na vývoj hladin vitamínu B12 u jednotlivých pacientů v časových intervalech 1, 2 a 3; černá tučná linka představuje obecný trend daný mediánem hodnot

Výsledky pozorování:

1. Vyhodnotili jsme soubor 651 pacientů hematologické poradny s mediánem věku 68 let (14–98) indikovaných ke stanovení vitamínu B12 na základě klinického vyšetření. Na základě regrese a grafického znázornění vztahu mezi B12 a holoTC nelze jednoznačně říci, že by stanovení aktivní formy, či spíše biologicky dostupné formy vitamínu B12 přinášelo výrazný profit oproti stanovení celkového B12 (graf č. 1). Jedná se spíše o psychické uspokojení, že stanovují akční metabolit místo analytu, který vypovídá spíše o celkových zásobách vitamínu. Když se to budeme snažit vyjádřit přesněji, musíme konstatovat, že 40 % vzorků mělo holoTC nad kritickou hladinou, kdy by podle VB12 (zásoba) poukazovala na deficit. Při pohledu na druhou stranu grafu najdeme 18 % vzorků,



▲ Graf č. 3: Srovnání hladin celkového vitamínu B12 a holotranskobalamínu u vybraných pacientů – hodnoty vitamínu B12 a holoTC (pmol/l) byly stanoveny ve třech časových intervalech

kdy holoTC signalizuje depleci, i když je celkový VB12 v normě. Naprostým extrémem je poměr 26, resp. 33 mg/l holoTC vůči hodnotě VB12 vyšší, než je horní hranice rozsahu měření.

- Literatura uvádí, že nedostatek vitamínu je provázen klinickými příznaky. Mezi ně patří i střední objem erytrocytů. Porovnáním obou skupin vzorků rozdělených podle hladiny VB12 zjistíme, že nedostatkem trpící skupina má medián 93,3 (62,7–122) a zásob si užívající skupina má medián 92 (58,4–141) fl. Stejný obraz poskytuje i varianta s holoTC, kdy pacienti s deficitem měli medián MCV 92,5 a bez deficitu 92,1 fl. V obou případech statisticky nevýznamný rozdíl.
- Porovnání s hodnotami Hcy nebylo provedeno kvůli nízkému počtu výsledků v rámci vybraného souboru. Stranou také zůstaly hodnoty ferritinu, receptoru, protože víceprvková

analýza zohledňující nedostatek železa a MCV by asi nic nepřinesla.

- Dále lze porovnat individuálnost hodnot v tom smyslu, že ve skupině jsou pacienti, u nichž lze sledovat vývoj v čase, a zde by bylo možno najít nějaké odpovědi (graf č. 2 a 3). Bohužel intervaly mezi jednotlivými odběry nejsou jednotné, ale liší se pacient od pacienta. Dle lékařů hematologické poradny dostávají pacienti indikovaní k odběru pro stanovení B12 intramuskulárně dávku 1 000 mg B12, která je opakována s každou návštěvou ordinace. Lze pozorovat, že pacienti si vytvoří jakousi individuální hladinu vitamínu, která se u většiny z nich časem příliš nemění. Rovněž lze pozorovat jistou korelaci mezi celkovou hodnotou B12 a holoTC. Konkrétně Spearmanův korelační koeficient mezi vitamínem B12 a holoTC dosahuje

hodnoty 0,6234 na hladině významnosti $P < 0,0001$.

Jedna zásadní odpověď je však jasná. Herbertův model, či spíše přístup k problematice, je z praktického hlediska poněkud nelogický.

Běžně se nehledá deficit vitamínu B12 a s ním spojená anémie, pro kterou jsme ani nezjistili její procentuální zastoupení v celkovém počtu anémií. Hledají se především pomocí logického pavouka důvody anémie. V něm je anémie z nedostatku vitamínu B12 jednou z mnoha příčin. Budeme-li se držet tohoto přístupu, pak stanovení obou variant B12 se stane přírodním.

Ne vždy je nedostatek B12 primární příčinou, nýbrž jen průvodním projevem, a společně s údaji z osobní anamnézy mohou současně stanovené hodnoty



celkového a aktivního B12 výrazně přispět k odhalení příčin anémie.

Nicméně jsou tu i jiná zajímavá místa, na která by se nemělo zapomínat, mezi ně patří stanovení VB12 u pacientů požívajících

metformin či inhibitory protonové pumpy a celá oblast neurologie. Naléhavost stanovení pak roste s přibývajícím věkem pacientů.

Rádi bychom poděkovali MUDr. Adriane Heindorfer a MUDr. Lence Walterové

z oddělení klinické hematologie za podporu a pomoc s výběrem pacientů a odborné konzultace. Paní Ing. Heleň Švébišové za možnost použití přesně a správně pracujícího analyzátoru COBAS INTEGRA® 800.



RNDr. Pavel Škrabálek

Oddělení klinické biochemie a hematologie Turnov, Krajská nemocnice Liberec, a.s., 28. října 1000, Turnov
Kontakt: pavel.skrabalek@nemlib.cz

Absolvent Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně. V roce 1988 byl přijat do kolektivu příjemných lidí na oddělení klinické biochemie v Liberci, vedené MUDr. Lubomírem Dlouhým, a stal se na dlouhá léta jeho součástí. V současnosti působí v laboratoři Krajské nemocnice v Turnově.

RNDr. Jana Hradiská, Ph.D.

Oddělení klinické biochemie, Krajská nemocnice Liberec, a.s., Husova 357/10, Liberec
Kontakt: jana.hradiska@nemlib.cz

Absolvovala magisterské studium v oboru klinická biologie a následně postgraduální studium infekčního lékařství na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity. Od roku 2018 pracuje na oddělení klinické biochemie Krajské nemocnice Liberec. Aktuálně si užívá mateřské dovolené s dcerkou.



LITERATURA

1. Paul Henry Golding*. Holotranskobalamin (HoloTC, Active-B12) and Herbert's model for the development of vitamin B12 deficiency: a review and alternative hypothesis. *SpringerPlus* (2016) 5: 668.
2. Herbert V (1987). The 1986 Herman award lecture. Nutrition science as a continually unfolding story: the folate and vitamin B-12 paradigm. *Am J Clin Nutr* 46(3): 387–402.
3. Loikas S (2007). Vitamin B12 deficiency in the aged: laboratory diagnosis, prevalence and clinical profile, Thesis. University of Turku. <https://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/29134/D775.pdf?sequence=1>. Accessed 21 March 2016.
4. Seetharam B, Yammani RR (2003). Cobalamin transport proteins and their cell surface receptors. *Expert Rev Mol Med* 5(18): 1–18.
5. Andrés E, Loukili NH, Noel E, Kaltenbach G, Abdelgheni MB, Perrin AE, Noblet-Dick M, Maloïsel F, Schlienger JL, Blicklé JF (2004). Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *CMAJ* 171(3): 251–259.
6. Quadros EV (2010) Advances in the understanding of cobalamin assimilation and metabolism. *Br J Haematol* 148(2): 195–204.
7. Hannibal L, Lysne V, Bjørke-Monsen A-L, Behringer S, Grünert SC, Spiekeroetter U, Jacobsen D, Wand Blom HJ(2016). Biomarkers and algorithms for the diagnosis of vitamin B12 deficiency. *Front. Mol. Biosci.* 3: 27.
8. Herbert V (1994). Staging vitamin B12 (cobalamin) status in vegetarians. *Am J Clin* 59: 1213S–1222S.
9. Shane B (2008). Folate and vit B 12 metabolism: Overview and interaction with riboflavin, vitamin B6, and polymorphism. *Food and NutriBullet* 29: S5–S16.
10. Institute of Medicine. 1998. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington, DC: The National Academies Press.
11. Hyánek J, Hájek Z, Dubská L, Pejznochová H, Vaingátová S, Maťoška V, Hejtmánková J, Křížová M, Vondráčková D, Pehal F, Hoffman R, Matoušková, Hyánek T, Martíníková V, Privarová J (2011). Praktický diagnostický benefit z rutinního stanovení holotranskobalamínu u pacientů metabolické ambulance. *Klinická biochemie a metabolismus*, roč. 19, č. 1, s. 15–22. ISSN: 1210–7921.
12. Devalia V, Mackenzie F (2019). Laboratory performance of serum holotranscobalamin assay in the United Kingdom (UK) as assessed by the UK national external quality assessment scheme for haematinics. *Blood* 134 (supplement 1): 5793.
13. Lloyd-Wright Z, Hvas AM, Møller J, Sanders TA, Nexø E (2003). Holotranscobalamin as an indicator of dietary vitamin B12 deficiency. *ClinChem.*; 49(12): 2076–8.
14. Nexø E, Hoffmann-Lücke E (2011). Holotranscobalamin, a marker of vitamin B-12 status: analytical aspects and clinical utility. *The American journal of clinical nutrition*, 94(1), 359S–365S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.013458>
15. *Bulletin St. Paul's Hospital and Mount St. Joseph's Hospital.*
16. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 1057–61. S odkazem na Hom BL, Olesen HA. Plasma clearance of 57 cobalt-labelled vitamin B12 bound in vitro and in vivo to transcobalamin I and II. *Scand J ClinLabInvest* 1969; 23: 201–11.
17. *Handbook of Vitamins*, Janos Zempleni, John W Suttie, Jesse F Gregory III, Patrick J Stover.
18. *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health*, Gerald F Combs, Jr., James P.
19. *Biochemical, Physiological, and Molecular Aspects of Human Nutrition*, Martha H Stipanuk, Marie A Caudill.
20. Nielsen, MJ et al. Vitamin B12 transport from food to the body's cells – a sophisticated, multistep pathway *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 345–354 (2012).