

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU  
FARMACEUTSKOG FAKULTETA UNIVERZITET U BEOGRADU**

Nastavno-naučno veće Farmaceutskog fakulteta, na sednici održanoj 17.10.2019.god., imenovalo je Komisiju za ocenu završene doktorske disertacije pod nazivom „**Značaj biohemijskih markera i morfometrijskih karakteristika leukocita u laboratorijskoj dijagnostici subkliničkog deficita vitamina B12**“, kandidata diplomiranog farmaceuta – medicinskog biohemičara Dragane Totošković, u sastavu:

- Dr Violeta Dopsaj, mentor, redovni profesor Farmaceutskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
- Dr Dragomir Marisavljević, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu
- Dr Duško Mirković, vanredni profesor Farmaceutskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu

Posle izvršene analize priložene doktorske disertacije, članovi Komisije podnose Naučno-nastavnom veću Farmaceutskog fakulteta u Beogradu sledeći:

**I Z V E Š T A J**

**A. Sadržaj doktorske disertacije**

Doktorska disertacija je napisana na 191 strani i sadrži 38 tabela, 38 slika i 335 literaturnih navoda. Sadržaj teze je izložen u sledećim poglavljima: Uvod, Ciljevi rada, Materijali i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Literatura.

U poglavlju **Uvod** prikazane su do sada utvrđene činjenice o strukturi, biosintezi i metabolizmu vitamina B12. Navedeni su faktori koji utiču na njegov status u organizmu, biomarkeri koji ga definišu i hipoteze o načinu njihove promene u deficitu. Takođe, opisani su klinički i subklinički deficit vitamina B12, njihova prevalenca, kao i hematološki i biohemijski testovi koji se koriste u laboratorijskoj dijagnostici deficita. S obzirom na to da ne postoji zlatni standard u laboratorijskom ispitivanju deficita vitamina B12, analiziran je odnos rutinskih i novih biomarkera, metilmalonske kiseline (MMA) i morfometrijskih karakteristika

neutrofila i monocita (engl. Cell Population Data, CPD), kao i dosadašnja istraživanja o njihovom kliničkom značaju.

**Cilj** ove doktorske disertacije bio je evaluacija metilmalonske kiseline i morfometrijskih karakteristika neutrofila i monocita, dobijenih na hematološkom analizatoru Coulter® LH750, kao ranih markera deficita vitamina B12 i njihove poveznosti sa tradicionalnim biomarkerima metabolizma vitamin B12 i folne kiseline, kod pacijenata koji pripadaju rizičnoj grupi za pojavu deficita vitamina B12. Takođe, ispitivana je povezanost parametara statusa gvožđa (koncentracije gvožđa, solubilnih transferinskih receptora, feritina i zasićenje transferina gvožđem u serumu) sa biohemijским markerima statusa vitamina B12 i morfometrijskim karakteristikama leukocita, kao i uticaj smanjene funkcije bubrega.

U poglavlju **Materijali i metode** opisana je selekcija pacijenata, kriterijumi za isključivanje iz ispitivanja, način dobijanja i obrade uzoraka, kao i korišćeni laboratorijski testovi. Istraživanje je obuhvatilo 590 pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12, tj. starijih od 60 godina i/ili pacijenti sa simptomima gastrointestinalnih oboljenja, i 148 zdravih dobrovoljaca. Iz studije su isključeni pacijenti sa malignim i hematološkim bolestima, pacijenti sa postavljenom dijagnozom deficita vitamina B12 i/ili folata i pacijenti koji su koristili imunostimulacionu ili imunosupresivnu terapiju. Pacijenti su upućeni u laboratoriju poliklinike Centra za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Srbije na laboratorijsko testiranje statusa vitamina B12. Na osnovu uputa gastroenterologa pacijentima je određivana krvna slika, koncentracija vitamina B12, folata i C-reaktivnog proteina (CRP), a zatim su uzorci zamrzavani za dalja ispitivanja. Svi ispitanici su popunili upitnik u kojem su naveli podatke o polu, starosti, načinu ishrane, lekovima i suplementima koje koriste, simptomima koje imaju i oboljenjima koja su im dijagnostikovana. Istraživanje je sprovedeno uz saglasnost svih ispitanika i uz odobrenje Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije. Na osnovu podataka iz upitnika i rezultata laboratorijskih testova za krvnu sliku, kobalamin, folat i CRP, naknadno su iz istraživanja isključeni pacijenti koji su koristili suplemente B vitamina i gvožđa, sa mikrocitozom, makrocitozom, inflamacijom, vrednostima kobalamina i folata iznad gornje granice referentnog opsega i sa alarmima na rezultatu krvne slike o prisustvu blasta, nezrelih granulocita i atipičnih limfocita. Na uzorku preostalih pacijenata urađene su dodatne analize: metilmalonska kiselina, morfometrijski parametri leukocita, laktat dehidrogenaza, kreatinin, procenjena brzina glomerularne filtracije (eGFR), feritin, transferin, haptoglobin, serumsko gvožđe, ukupni kapacitet vezivanja gvožđa, saturacija transferina

gvoždem (SAT), solubilni transferinski receptori, antitela na unutrašnji faktor, sadržaj folata u eritrocitima i homocistein (Hcy).

U poglavlju **Rezultati** opisani su rezultati statističke obrade dobijenih podataka. Na početku su predstavljeni rezultati deskriptivne statistike. Zatim je kroz rezultate Hi-kvadrat testa nezavisnosti, korelacione analize, višestruke regresije, binarne logističke regresije, ROC, predstavljena analiza odnosa kobalamina, folata, homocisteina i metilmalonske kiseline, kao i njihov odnos sa polom, starošću, anemijom, deficitom gvožđa i smanjenom funkcijom bubrega. Takođe je analiziran odnos biomarkera statusa vitamina B12 i morfometrijskih karakteristika neutrofila i monocita, kao i uticaj starosti, pola, anemije, deficita gvožđa i smanjene funkcije bubrega.

U poglavlju **Diskusija** prikazano je objašnjenje dobijenih rezultata u svetlu relevantnih podataka iz literature.

Na kraju doktorske disertacije nalaze se najznačajniji **Zaključci** koji proizilaze iz rezultata istraživanja i njihove analize.

Poglavlje **Literatura** sadrži spisak od 335 referenci koje su korišćene u doktorskoj disertaciji.

## **B. Opis dobijenih rezultata**

U grupi sa rizikom za deficit vitamina B12 i normalnom srednjom zapreminom eritrocita (MCV) bilo je 56% žena i 44% muškaraca. Njihova prosečna starost je iznosila 58.00 (42.75–68.25) godina. Svi pacijenti su bili negativni na antitela na unutrašnji faktor. Niske koncentracije kobalamina imalo je 33% pacijenata, 28% iscrpljene rezerve vitamina B12, 14% niske koncentracije folata i 46% pacijenata je imalo povećane vrednosti homocisteina. Povećane vrednosti metilmalonske kiseline bile su prisutne kod 68% pacijenata. Anemičnih pacijenata je bilo 55%, a pacijenata sa smanjenom funkcijom bubrega 33%. Muškarci su bili značajno stariji od žena i imali su veću zastupljenost smanjene funkcije bubrega. Ispitanici kontrolne grupe imali su laboratorijske rezultate za krvnu sliku, vitamin B12, folat, homocistein i metilmalonsku kiselinu u referentnom opsegu. Inflamacije nije bila prisutna, svi su bili negativni na antitela na unutrašnji faktor i imali su normalnu funkciju bubrega.

Analiza korelacije pokazala je da nije postojala povezanost kobalamina sa starošću, kreatininom i hemoglobinom. Muški i ženski pol nisu se razlikovali prema zastupljenosti

niskih koncentracija i iscrpljenih rezervi kobalamina. Takođe, razlike nije bilo između pacijenata sa anemijom i bez nje, kao ni između pacijenata sa normalnom i smanjenom funkcijom bubrega. Vrednosti homocisteina bile su u korelaciji sa starošću i kreatininom, a sa kobalaminom i folatom tek nakon uklanjanja uticaja ovih varijabli. Zastupljenost niskih koncentracija i iscrpljenih rezervi kobalamina, kao i niskih koncentracija folata nije se razlikovala između pacijenata sa normalnim i povećanim vrednostima homocisteina. Analizom višestruke regresije utvrđeno je da je na vrednost homocisteina najviše uticao kreatinin, a najmanje kobalamin. Pacijenti sa smanjenom funkcijom bubrega imali su veću zastupljenost povećanih vrednosti homocisteina u odnosu na pacijente sa normalnom bubrežnom funkcijom. Muški pol takođe je imao veću zastupljenost povećanih vrednosti homocisteina, ali su muškarci u odnosu na žene bili značajno stariji i imali su značajno veću zastupljenost smanjene funkcije bubrega. Uticaj kreatinina i starosti pacijenata postojao je i na vrednost metilmalonske kiseline, ali u manjoj meri nego na homocistein, dok pol nije imao uticaj. Muškarci i žene nisu se razlikovali prema zastupljenosti povećanih vrednosti metilmalonske kiseline, dok su pacijenti sa smanjenom funkcijom bubrega imali veću zastupljenost njenih povećanih vrednosti. Metilmalonska kiselina bila je u pozitivnoj korelaciji sa kreatininom, starošću i homocisteinom i negativnoj sa vitaminom B12. Nakon korekcije uticaja kreatinina i starosti, korelacija sa kobalaminom se povećala, a sa homocisteinom smanjila. Pacijenti sa povećanim vrednostima metilmalonske kiseline imali su veću zastupljenost niskih koncentracija kobalamina i povećanih vrednosti homocisteina. Prema rezultatima višestruke regresije, vitamin B12 je bio najznačajniji prediktor njenih vrednosti. Kada je u pitanju anemija, najznačajniji prediktori sniženih vrednosti hemoglobina bili su deficit gvožđa i smanjena funkcija bubrega, dok koncentracije kobalamina i folata nisu bile značajne determinante. Između pacijenata sa anemijom i bez nje nije bilo razlika prema zastupljenosti niskih koncentracija i iscrpljenih rezervi kobalamina, kao i niskih vrednosti folata i povećanih koncentracija homocisteina kada su pacijenti razdvojeni prema funkciji bubrega. Razlika je postojala prema zastupljenosti deficita gvožđa.

Pre analize povezanosti morfolometrijskih parametara neutrofila i monocita sa statusom vitamina B12 i folata, ispitan je uticaj pola i starosti u kontrolnoj grupi. Utvrđeno je da se morfolometrijski parametri neutrofila i monocita nisu razlikovali između muškaraca i žena, kao ni između starijih i mlađih od 60 godina.

Ispitivanjem povezanosti vitamina B12, folata i homocisteina sa morfolometrijskim parametrima neutrofila i monocita utvrđeno je da su pacijenti sa deficitom kobalamina ili folata imali značajno više vrednosti standardne devijacije za provodljivost neutrofila (NeC-

SD) u odnosu na pacijente bez deficita oba vitamina. Deficit folata bio je povezan i sa drugim morfometrijskim parametrima, tj. sa povišenim vrednostima standardnih devijacija za zapreminu neutrofila i monocita (NeV-SD, MoV-SD), standardnih devijacija za rasipanje svetlosti neutrofila (NeS-SD) i za provodljivost monocita (MoC-SD), kao i sa smanjenim srednjim vrednostima za provodljivost monocita (MoC) i rasipanje svetlosti neutrofila (NeS). Najznačajniji morfometrijski parametri za niske koncentracije folata bili su standardna devijacija za provodljivost neutrofila i standardna devijacija za zapreminu monocita. Uticaj deficita folata na standardnu devijaciju za provodljivost neutrofila bio je veći od uticaja deficita kobalamina. Pacijenti sa deficitom kobalamina ili folata nisu se razlikovali prema homocisteinu od pacijenata bez deficita vitamina, samim tim homocistein nije bio povezan ni sa razlikama prema navedenim morfometrijskim parametrima neutrofila i monocita. Takođe, grupe sa deficitom kobalamina, folata i bez deficita vitamina nisu se razlikovale prema zastupljenosti polova, deficita gvožđa, anemije i smanjene funkcije bubrega. Razlika prema starosti, koja je imala mali statistički značaj, postojala je između pacijenata sa deficitom kobalamina i deficitom folata. Analizom ROC krive utvrđeno je da standardna devijacija za provodljivost neutrofila ima dobru dijagnostičku tačnost za razdvajanje pacijenata sa deficitom vitamina B12 ili folata od pacijenata bez deficita oba vitamina. Standardna devijacija za zapreminu monocita takođe je imala dobru dijagnostičku tačnost u klasifikaciji pacijenata prema deficitu folata.

Isključivanjem iz analize pacijenata sa deficitom folata, zbog utvrđenog uticaja na morfometrijske parametre neutrofila i monocita, i poređenjem grupa formiranih prema bubrežnoj funkciji i koncentraciji kobalamina i metilmalonske kiseline uočeno je da su povišene vrednosti standardne devijacije za provodljivost neutrofila povezane i sa povećanim vrednostima metilmalonske kiseline bez obzira na funkciju bubrega. Takođe je utvrđeno da su izolovano niske koncentracije kobalamina povezane sa ovim morfometrijskim parametrom neutrofila. Analizom ROC krive ustanovljena je dobra dijagnostička tačnost za standardnu devijaciju provodljivosti neutrofila za razdvajanje pacijenata i prema koncentraciji kobalamina i prema koncentraciji metilmalonske kiseline. Između dobijenih površina ispod krivih nije bilo razlike. Upoređene grupe se nisu razlikovale prema zastupljenosti polova i deficita gvožđa, ali je postojala razlika prema zastupljenosti anemije, starosti i vrednostima homocisteina. Pacijenti sa smanjenom funkcijom bubrega i povećanim vrednostima metilmalonske kiseline bili su značajno stariji od ostalih pacijenata, imali su niže vrednosti hemoglobina i hematokrita, a više vrednosti homocisteina u poređenju sa ostalim pacijentima.

Kada su upoređene grupe, koje su se razlikovale prema koncentraciji kobalamina i statusu gvožđa, uočeno je da je deficit vitamina B12 povezan sa povećanim vrednostim standardne devijacije za provodljivost neutrofila i u prisustvu i u odsustvu deficita gvožđa. Analiza ROC krive pokazala je da status gvožđa nije uticao na dijagnostičku tačnost ovog morfometrijskog parametra u razdvajanju pacijenata prema koncentraciji vitamina B12. Drugi morfometrijski parametar koji se izdvojio bila je standardna devijacija za rasipanje svetlosti neutrofila (NeS-SD). Pacijenti sa izolovanim deficitom gvožđa imali su značajno niže vrednosti ovog parametra u odnosu na ostale pacijente. Za standardnu devijaciju rasipanja svetlosti neutrofila dobijena je zadovoljavajuća dijagnostička tačnost u klasifikaciji pacijenata sa izolovanim deficitom gvožđa. Pacijenti sa deficitom gvožđa, bez obzira na koncentraciju kobalamina, imali su značajno veće koncentracije solubilnih transferinskih receptora i veću zastupljenost anemije u odnosu na pacijente bez deficita gvožđa. Grupe se nisu razlikovale prema zastupljenosti smanjene funkcije bubrega. Razlika prema starosti, kao i prema homocisteinu, postojala je između grupa sa izolovanim deficitom gvožđa i izolovanim deficitom kobalamina.

### **C. Uporedna analiza dobijenih rezultata sa podacima iz literature**

Subklinički deficit vitamina B12 (engl. Subclinical Cobalmin Deficiency, SCCD) predstavlja promene u koncentraciji biohemijskih markera statusa vitamina B12 u vidu povećanih nivoa metilmalonske kiseline i homocisteina, odnosno smanjenja koncentracija holotranskobalamina II i ukupnog kobalamina u krvi bez kliničkih manifestacija (1–5). Subklinički deficit vitamin B12 otkriven je 80-ih godina prošlog veka u seriji studija kod pacijenata bez anemije, makrocitoze ili drugih simptoma deficita pomoću deoksirudin supresivnog testa (6–10). Time je pokazano da niske koncentracije kobalamina u serumu u odsustvu kliničke slike nisu bili lažno niski rezultati (11, 12). Klinički i subklinički deficit se razlikuju ne samo prema prisustvu, tj. odsustvu kliničkih manifestacija, već i prema uzroku i mehanizmu nastanka (12, 13). Ukoliko je uzrok deficita vitamina B12 stalan i progresivan, poput perniciozne anemije, nastaće klinički oblik deficita (12). Uzrok subkliničkog deficita obično je nepoznat (13). U 30%–50% slučajeva nastaje kao posledica smanjenog oslobađanja kobalamina iz hrane (12, 14). Sam tok subkliničkog deficita može da varira i kreće se od brzog ili postepenog prelaska u klinički oblik preko oscilacija između normalnog stanja i subkliničkog deficita do potpune remisije (12).

Kada se razmatra prevalenca deficita vitamina B12 potrebno je uzeti u obzir u kojoj populaciji je ispitivana i koji kriterijum za deficit je korišćen, s obzirom na to da se prikazani podaci u literaturi dosta razlikuju (1, 15). Prevalenca subkliničkog deficita je značajno viša u odnosu na klinički deficit, npr. u SAD oko 2% stanovništva ima klinički oblik, dok 20% starijih osoba ima subklinički oblik deficita (16). Ako se kao kriterijum za deficit koristi samo serumska koncentracija kobalamina, bez razmatranja karakteristika populacije, dobijena prevalenca niskih koncentracija i iscrpljenih rezervi vitamina B12 u doktorskoj disertaciji je veća u poređenju sa studijama u Evropi i Severnoj Americi (1). Svakako da opterećenost rizikom za deficit vitamina B12 doprinosi dobijenom rezultatu.

Kada je u pitanju uticaj starosti i pola na koncentraciju vitamina B12 u literaturi se mogu naći različiti rezultati. Prema jednoj grupi istraživača muškarci imaju niži nivo kobalamina od žena i podložniji su deficitu (17–19), dok prema drugim istraživačima nema razlike između polova (20, 21). Takođe, određene studije navode da su kod starijih osoba češće prisutne niske koncentracije kobalamina (3, 22, 23), dok druga velika studija ne navodi razliku u godinama između ispitanika sa različitim opsegom koncentracija kobalamina (21). U doktorskoj disertaciji nije uočena razlika između polova u pogledu zastupljenosti niskih koncentracija i iscrpljenih rezervi kobalamina. Upoređene grupe pacijenata, koje su se razlikovale prema koncentraciji kobalamina, nisu se razlikovale prema zastupljenosti muškog i ženskog pola. Iako je starost jedan od faktora rizika za deficit vitamina B12 zbog povećane predispozicije za gastrointestinalne poremećaje i oboljenja (3), vitamin B12 nije bio u korelaciji sa starošću, a muškarci koji su bili značajno stariji od žena nisu se od njih razlikovali prema zastupljenosti različitih nivoa vitamina B12. Takođe, razlika prema starosti je izostala i kada su upoređene grupe pacijenata koje su se razlikovale prema koncentraciji kobalamina. Tome je doprinela i sama ispitivana grupa u kojoj su svi pacijenti imali jedan ili više faktora rizika za deficit vitamina B12.

Smanjena funkcija bubrega povezuje se abnormalno povećanim koncentracijama kobalamina (24). Za normalne i niske nivoe kobalamina nije uočena povezanost sa funkcijom bubrega. Takođe, pacijenti sa niskim koncentracijama vitamina B12 nisu se razlikovali prema koncentraciji kreatinina niti prema zastupljenosti smanjene bubrežne funkcije od pacijenata bez niskih vrednosti vitamina B12.

U doktorskoj disertaciji je uočeno da koncentracije vitamina B12 nisu povezane sa anemijom, tj. razlike prema koncentraciji kobalamina nisu bili praćene razlikama prema hemoglobinu. Takođe, kobalamin nije bio značajan prediktor sniženih vrednosti hemoglobina. Dobijeni rezultati su u skladu sa drugim studijama, koje navode da pacijent sa niskim

koncentracijama kobalamina ili potvrđenim deficitom vitamina B12 ne mora imati anemiju (25, 26). Zapravo, najznačajniji faktori povezani sa anemijom bili su deficit gvožđa i smanjena funkcija bubrega. S obzirom na to da slični gastrointestinalni mehanizmi, kao i veća predispozicija starijih osoba za gastrointestinalne smetnje, mogu dovesti do deficita i gvožđa i vitamina B12 (3, 27), razlika u prediktorskoj značajnosti za anemiju ova dva faktora može se objasniti mehanizmima delovanja, brojem funkcija koje vrše u organizmu, tj. količini zaliha, kao i potrebnom dnevnom unosu (27, 28). Smanjena funkcija bubrega može postojati zajedno sa deficitom gvožđa i/ili kobalamina, ali i sama po sebi može biti povezana sa anemijom usled neadekvatne sinteze eritropoetina (29). Iako eritropoetin u doktorskoj disertaciji nije testiran kod pacijenata sa smanjenom funkcijom bubrega, uočeno je da su pacijenti sa smanjenom funkcijom bubrega i neadekvatnim statusom vitamina B12 imali niže vrednosti hemoglobina i hematokrita, kao i veću zastupljenost anemije od ostalih pacijenata bez obzira na status vitamina B12 i odsustvo razlika prema zastupljenosti deficita gvožđa.

Za homocistein i metilmalonsku kisleinu već postoje studije o uticaju starosti i kreatinina, tj. bubrežne funkcije na njihove vrednosti (1, 30–32). Rezultati doktorske disertacije potvrđuju da uticaj postoji i kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12, s tim što je uticaj ovih faktora na homocistein veći od samog kobalamina, ali ne i na metilmalonsku kisleinu. Veći uticaj bubrežne funkcije na koncentraciju homocisteina u odnosu na metilmalonsku kisleinu utvrđen je i u istraživanju Lewerin i sradnika (31). U prilog većoj povezanosti kobalamina i metilmalonske kiseline, u odnosu na povezanost kobalamina i homocisteina (iako su u pitanju metabolički markeri sa gotovo istom osetljivošću za klinički deficit vitamina B12) (12, 13), dali su rezultati istraživanja u kojem su pacijenti sa povećanim vrednostima metilmalonske kiseline imali veću zastupljenost koncentracija kobalamina koje označavaju deficit i iscrpljene rezerve, dok ta razlika nije uočena između pacijenata sa normalnim i povećanim vrednostima homocisteina. Razlike prema homocisteinu u grupi pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12 i bez kliničkih manifestacija deficita bile povezane sa razlikama prema starosti ili bubrežnoj funkciji.

Kada je u pitanju povezanost morfometrijskih parametara neutrofila i monocita sa statusom vitamina B12 postoje dva objavljena istraživanja (33, 34) i dva naučno-istraživačka rada kandidata u sklopu doktorske disertacije (35, 36). U najvećem broju studija ovi parametri su ispitivani u odnosu na inflamaciju, infekciju i sepsu (37–45). Uticaj inflamacije je potvrđen na morfometrijske karakteristike leukocita, pa su i pacijenti sa  $CRP \geq 10$  mg/L isključeni iz istraživanja. Za standardnu devijaciju zapremine monocita dobijena je dozvola od Američke



agencije za hranu i lekove (engl. Food and Drug Administration, FDA) da se može koristiti kao rani marker sepse kod hitno primljenih odraslih pacijenata (46).

Studije, koje su se bavile odnosom morfometrijskih parametara neutrofila i monocita i statusa vitamina B12, dale su različite rezultate. Prema istraživanju Simon-Lopeza i saradnika (33), srednje zapremine neutrofila i monocita su povezane sa sniženim koncentracijama kobalamina i folata, dok prema istraživanju Risch i saradnika ovi parametri nisu značajni, već su to koeficijenti varijacije zapremine neutrofila i monocita i povezani su sa niskim vrednostima holotranskobalamina (34). Pomenuta istraživanja, kao i doktorska disertacija, se pored kriterijuma za deficit vitamina B12, razlikuju i prema istraživačkoj populaciji. U doktorskoj disertaciji istraživanje je urađeno u grupi pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12, koji je podrazumevao da je starost ispitanika iznad 60 godina i/ili da su prisutni gastrointestinalni simptomi ili poremećaji koji mogu biti uzrok deficita kobalamina. Takođe, pacijenata su imali normocitne eritrocite, bili su bez inflamacije i ispoljene kliničke slike deficita. U istraživanju Simon-Lopez i saradnika (33) istraživačku grupu su činili anemični pacijenti i zdravi ispitanici, i drugi kriterijumi, osim anemije, nisu razmatrani (33). U radu Risch i saradnika (34) studijska grupa je obuhvatila osobe starije od 60 godina, bez inflamacije, bez kliničke slike deficita, i bez prisustva bolesti kompatibilnih sa deficitom vitamina B12. Takođe, ostali morfometrijski parametri nisu ispitani u navedenim istraživanjima, samim tim ostaje nepoznato kakvi bi se rezultati dobili. U doktorskoj disertaciji nije ustanovljena povezanost srednjih zapremina neutrofila i monocita sa sniženim koncentracijama kobalamina i folata prema graničnim vrednostima koje je predložila Svetska zdravstvena organizacija (47). Takođe, nije utvrđena povezanost koeficijenta varijacije zapremine neutrofila sa metilmalonskom kiselinom u objavljenom radu kandidata (35). Razlike su uočene prema standardnoj devijaciji za provodljivost neutrofila, morfometrijskom parametru koji zavisi od odnosa citoplazme i jedra, kao i od segmentacije jedra (48). Navedene razlike u rezultatima između doktorske disertacije i publikovanih radova mogu poticati od uočenih razlika u ispitivanoj populaciji, kao i kriterijuma statusa vitamina B12 po kojem su pacijenti grupisani.

U istraživanju Simon-Lopez i saradnika navodi se da deficit gvožđa i drugi uzroci anemije ne utiču na srednju zapreminu neutrofila i monocita (33). Rezultati prikazane teze to potvrđuju, s tim što je uočeno da anemija i smanjena funkcija bubrega kao uzrok anemije ne utiču ni na ostale morfometrijske parametre, dok je deficit gvožđa pokazao povezanost sa standardnom devijacijom rasipanja svetlosti neutrofila. Iako nema drugih istraživanja o uticaju deficita gvožđa na ove parametre, postoje studije koje opisuju uticaj anemije izazvane deficitom gvožđa na broj, funkciju i morfologiju neutrofila (49–52). Prema istraživanju

Westerman i saradnika (51) kod pacijenata sa anemijom izazvanom deficitom gvožđa mogu se uočiti hipersegmentovani neutrofil. Mehanizam delovanja deficita gvožđa koji do toga dovodi za sada nije poznat. Standardna devijacija rasipanja svetlosti neutrofila zavisi od unutrašnje strukture neutrofila, tj. strukture jedra, samim tim rezultati doktorske teze potvrđuju istraživanje Westerman i saradnika da u prisustvu deficita gvožđa dolazi do promena u morfologiji neutrofila.

#### **D. Provera originalnosti doktorske disertacije**

Provera originalnosti ove disertacije izvršena je na način koji je propisan Pravilnikom o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu. Program iThenticate je registrovao ukupno 5% poklapanja sa 117 izvora. Preklapanje teksta sa svim izvorima je manja od 1%. Detaljnim uvidom u materijal utvrđeno je da je podudarnost teksta posledica korišćenja istih referenci ili objavljenih radova kandidata, opštih mesta u vezi sa temom disertacije, naziva određivanih analita i njihovih graničnih vrednosti, laboratorijskih testova, korišćenih aparata, mernih jedinica i skraćenica.

Na osnovu rezultata provere smatramo da je doktorska disertacija Dragane Totošković u potpunosti originalna, kao i da su poštovana akademska pravila citiranja.

#### **E. Zaključak**

Subklinički deficit kobalamina podrazumeva da je koncentracija jednog ili više biomarkera statusa vitamina B12 izvan referentnog opsega u odsustvu kliničkih manifestacija deficita. S obzirom na to da ne postoji zlatni standard u laboratorijskom ispitivanju statusa vitamina B12, teško je reći koji biomarker najbolje ukazuje na subklinički deficit. Jedino je moguće analizirati povezanost biomarkera, tj. odnos njihovih graničnih koncentracija za deficit i analizirati uticaje drugih faktora na njihove vrednosti. Povezanost povećanih vrednosti standardne devijacije provodljivosti neutrofila i niskih koncentracija kobalamina i/ili povećanih koncentracija metilmalonske kiseline ukazuje da kod pacijenata sa subkliničkim deficitom B12 postoji izmenjena morfologija neutrofila, iako se mikroskopski još uvek ne detektuje.

Kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12 i normalnim MCV, korelacija između koncentracija kobalamina i metilmalonske kiseline u serumu veća je u poređenju sa

korelacijom koncentracija kobalamina i homocisteina, tj. metilmalonske kiseline i homocisteina. Kobalamin je najznačajniji prediktor vrednosti metilmalonske kiseline, ali ne i homocisteina. U subkliničkom, kao i u klinički manifestnom deficitu vitamina B12, postoji određen broj pacijenata koji ima sniženu koncentraciju kobalamina ( $< 221$  pmol/L) u prisustvu normalnih vrednosti metilmalonske kiseline ( $\leq 210$  nmol/L) i obrnuto. Jedno od objašnjenja je da su faze u razvoju deficita u zavisnosti od uzroka praćene neslaganjem promena u koncentracijama biomarkera. Drugi mogući razlog je da svim pacijentima ne odgovaraju preporučene granične vrednosti za deficit, odnosno da može postojati individualna promena u koncentraciji biomarkera koja odstupa od utvrđenih graničnih koncentracija.

Kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12 i normalnim MCV koncentracije kobalamina nisu pod uticajem pola, starosti i funkcije bubrega. Uticaj starosti i kreatinina postoji na koncentraciju metilmalonske kiseline, ali je značajno manji od uticaja kobalamina. Na vrednosti homocisteina u odsustvu kliničkih manifestacija deficita vitamina B12 veći uticaj imaju kreatinin i starost pacijenta od kobalamina. Zbog toga homocistein ne može pomoći u ispitivanju subkliničkog deficita vitamina B12, već kobalamin i/ili metilmalonska kiselina.

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

Nije utvrđen uticaj pola, starosti i bubrežne funkcije na morfometrijske parametre neutrofila. Nađena je povezanost povećanih vrednosti standardne devijacije provodljivosti neutrofila (NeC-SD) sa koncentracijama kobalamina  $< 221$  pmol/L, folata  $< 10$  nmol/L i metilmalonske kiseline  $> 210$  nmol/L. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da kod pacijenata sa rizikom za deficitom vitamina B12 a sa još uvek normalnim MCV, niskim koncentracijama kobalamina i/ili folata, NeC-SD potvrđuje prisustvo ranih morfoloških promena na neutrofilima. Koncentracija folata  $< 10$  nmol/L ima uticaj na veći broj CPD parametara neutrofila i monocita u poređenju sa niskom koncentracijom kobalamina i povećanom koncentracijom MMA: NeV-SD, NeC-SD, NeS-SD, MoV-SD, MoC-SD, MoC i NeS. Najznačajniji među njima su NeC-SD i MoV-SD, tj. standardne devijacije provodljivosti neutrofila i zapremine monocita.

Povećane vrednosti homocisteina nisu povezane sa morfometrijskim parametrima neutrofila i monocita kod pacijenata sa rizikom za deficit vitamina B12 i normalnim MCV. Snižene vrednosti hemoglobina same po sebi nisu povezane sa promenama u CPD parametrima neutrofila i monocita. Izolovani deficit gvožđa, kao najznačajniji uzročnik anemije, jeste povezan sa smanjenim vrednostima NeS-SD.

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

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

## **F. Obrazloženje naučnog doprinosa doktorske disertacije**

Vitamin B12 je neophodan za pravilan rast, razvoj i funkcionisanje ljudskog organizma (28). Njegov nedostatak ima negativne posledice po zdravlje u vidu hematoloških, gastroenteroloških i neuroloških simptoma. Činjenica da su neurološki simptomi ireverzibilni ukazuje na značaj ranog otkrivanja deficita i pravovremenog započinjanja terapije. Međutim, dijagnozu deficita vitamina B12 nije uvek lako postaviti. Dugo se deficit kobalamina posmatrao isključivo kroz prisustvo makrocitne anemije (54), ali hematološke manifestacije ne moraju uvek biti prisutne, tj. 25% pacijenata sa deficitom ima samo neurološke simptome (54), koji su raznovrsni i slični simptomima drugih bolesti. U okviru laboratorijskog ispitivanja deficita kobalamina problem predstavljaju nepostojanje zlatnog standarda (55), nedostatak referentnih metoda za određivanje biomarkera (16, 30), različite granične vrednosti za deficit (12), lažno normalni rezultati (12), uticaj drugih faktora na koncentraciju biomarkera (12). Sama klinička slika pruža određeni vid zlatnog standarda u odnosu na koji se interpretiraju laboratorijski rezultati. U slučajevima jasnih simptoma deficita uticaj nedostataka u laboratorijskoj dijagnostici nije veliki, jer će pacijent dobiti terapiju bez obzira na laboratorijske rezultate (55). Problem nastaje kada je klinička slika nejasna, što nije retkost

(55). Sa otkrićem subkliničkog deficita problemi u vezi sa dijagnostikom deficita vitamina B12 dodatno se produbljuju (12). Njegova prevalenca je značajno viša od prevalencije klinički manifestnog oblika (16). Upravo zbog visoke prevalencije, kao i nedovoljnog saznanja o tome kako nastaje, pod kojim uslovima progredira u klinički oblik i da li je povezan sa neurološkim simptomima, privlači pažnju istraživača (12). Rizičnu grupu čine starije osobe zbog visoke prevalencije malapsorpcije kobalamina iz hrane izazvane atrofičnim gastritisom, kao i zbog rastuće prevalencije perniciozne anemije sa godinama starosti (56). U rizične grupe spadaju i osobe sa gastrointestinalnim bolestima (23, 57). Međutim, ne postoji usaglašen stav oko njihovog skrininga ukoliko nemaju neki od simptoma koji upućuje na deficit kobalamina (56, 57). Upravo se ovom grupom pacijenata, subkliničkim deficitom kobalamina, rutinskim i potencijalno novim markerima deficita bavi prikazana doktorska disertacija.

Pregledom literature nije ustanovljeno da postoje druge studije koje su istraživale status vitamina B12 u populaciji sa rizikom za deficit kobalamina, bez inflamacije i normalnim MCV. Zato rezultati ove doktorske disertacije mogu doprineti boljem razumevanju odnosa biomarkera statusa vitamina B12, kao i njihove povezanosti sa drugim faktorima poput starosti, pola, anemije, deficita gvožđa i funkcije bubrega u populaciji opterećenoj rizikom za deficit. Posebni doprinos doktorskoj disertaciji pružaju ispitivanje metilmalonske kiseline kao i analiza morfolometrijskih karakteristika neutrofila i monocita, koji su nastali sa novim tehnologijama u razvoju hematoloških brojača.

Rezultatima doktorske disertacije je pokazano da pacijenti sa rizikom za deficit kobalamina, iako nemaju kliničku sliku, u značajnom procentu imaju neadekvatan status vitamina B12. Takođe je utvrđeno da je neadekvatan status vitamina B12, izražen kroz niske koncentracije kobalamina ili povećane vrednosti metilmalonske kiseline, povezan sa povećanim vrednostima standardne devijacije za provodljivost neutrofila. Time je pokazano da pacijenti sa subkliničkim deficitom kobalamina imaju promene u morfologiji neutrofila pre pojave makrocitoze ili makrocitne anemije. S obzirom na to da je ovaj morfolometrijski parametar povezan i sa niskim koncentracijama folata, može se smatrati ranim hematološkim markerom deficita oba vitamina. U odsustvu inflamatornih stanja, kao i bolesti i terapije koje utiču na broj i morfologiju leukocita, na osnovu vrednosti za standardnu devijaciju za provodljivost neutrofila mogu se selektovati pacijenti sa rizikom za deficit vitamina.

Morfolometrijske karakteristike neutrofila mogu na velikom broju ćelija i primenom više principa merenja i statističke obrade rezultata, ranije detektovati morfološke promene jedra u odnosu na mikroskopski pregled razmaza periferne krvi. Značaj standardne devijacije za provodljivost neutrofila je u tome što se informacija o promeni u morfologiji neutrofila može

dobiti odmah sa rezultatom krvne slike, bez utroška dodatnog vremena i reagenasa. Sam postupak se može kalibrirati i kontrolirati, tj. standardizovati.

Iako metilmalonska kiselina i homocistein važe za osetljivije markere klinički manifestnog deficita vitamina B12 u odnosu na serumski kobalamin, za subklinički deficit podataka nema, jer ne postoji zlatni standard (13). U novijim istraživanjima se biomarkeri porede sa metilmalonskom kiselinom, iako zbog svoje nedovoljno ispitane specifičnosti ona ne može biti proglašena zlatnim standardom za deficit vitamina B12 (13). U doktorskoj disertaciji je analiziran odnos ovih parametara, tj. odnos njihovih vrednosti koje u odustvu kliničke slike označavaju subklinički deficit. Utvrđeno je da homocistein i metilmalonska kiselina nemaju prednost nad serumskim kobalaminom u ispitivanju subkliničkog deficita vitamina B12. Homocistein zbog uticaja drugih faktora nije pouzdan indikator, dok se povezanost metilmalonske kiseline sa standardnom devijacijom za provodljivost neutrofila nije razlikovala od povezanosti kobalamina sa ovim parametrom. Otkrićem ove povezanosti uspostavljena je veza između hematoloških i biohemijskih promena statusa kobalamina koja omogućava rano otkrivanje subkliničkog deficita B12 u rizičnim grupama pacijenata, a samim tim i blagovremenu primenu terapije.

## Literatura

1. Green R, Allen LH, Bjørke-Monsen AL, Brito A, Guéant JL, Miller JW, Molloy AM, Nexo E, Stabler S, Toh BH, Ueland PM, Yajnik C. Vitamin B12 deficiency. *Nat Rev Dis Primers* 2017;3:17040. Erratum in: *Nat Rev Dis Primers* 2017;3:17054.
2. Carmel R. Subclinical cobalamin deficiency. *Curr Opin Gastroenterol* 2012;28(2):151–158.
3. Carmel R. Cobalamin, the stomach, and aging. *Am J Clin Nutr* 1997;66(4):750–759.
4. Carmel R. Discussion: Causes of vitamin B12 and folate deficiencies. *Food Nutr Bull* 2008;29(2 Suppl):S35–S37.
5. Carmel R, Green R, Rosenblatt DS, Watkins D. Update on cobalamin, folate, and homocysteine. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003:62–81.
6. Carmel R, Karnaze DS. The deoxyuridine suppression test identifies subtle cobalamin deficiency in patients without typical megaloblastic anemia. *JAMA* 1985;253(9):1284–7.
7. Carmel R, Sinow RM, Karnaze DS. Atypical cobalamin deficiency: subtle biochemical evidence of deficiency is commonly demonstrable in patients without

- megaloblastic anemia and is often associated with protein-bound cobalamin malabsorption. *J Lab Clin Med* 1987;109(4):454–63.
8. Karnaze DS, Carmel R. Low serum cobalamin levels in primary degenerative dementia: Do some patients harbor atypical cobalamin deficiency states? *Arch Intern Med* 1987;147(3):429–431.
  9. Carmel R, Sinow RM, Siegel ME, Samloff IM. Food cobalamin malabsorption occurs frequently in patients with unexplained low serum cobalamin levels. *Arch Intern Med* 1988;148(8):1715–1719.
  10. Carmel R. Reversal by cobalamin therapy of minimal defects in the deoxyuridine suppression test in patients without anemia: further evidence for a subtle metabolic cobalamin deficiency. *J Lab Clin Med* 1992;119(3):240–244.
  11. Carmel R. Subtle and atypical cobalamin deficiency states. *Am J Hematol* 1990; 34(2):108–114.
  12. Carmel R. Biomarkers of cobalamin (vitamin B-12) status in the epidemiologic setting: a critical overview of context, applications, and performance characteristics of cobalamin, methylmalonic acid, and holotranscobalamin II. *Am J Clin Nutr* 2011;94(1):348S–358S.
  13. Carmel R. Diagnosis and management of clinical and subclinical cobalamin deficiencies: why controversies persist in the age of sensitive metabolic testing. *Biochimie* 2013;95(5):1047–1055.
  14. Carmel R. Malabsorption of food cobalamin. *Baillieres Clin Haematol* 1995;8(3):639–655.
  15. Andrès E, Vogel T, Federici L, Zimmer J, Ciobanu E, Kaltenbach G. Cobalamin Deficiency in Elderly Patients: A Personal View. *Curr Gerontol Geriatr Res* 2008;2008:848267.
  16. Yetley EA, Pfeiffer CM, Phinney KW, Bailey RL, Blackmore S, Bock JL, Brody LC, Carmel R, Curtin LR, Durazo-Arvizu RA, Eckfeldt JH, Green R, Gregory JF 3rd, Hoofnagle AN, Jacobsen DW, Jacques PF, Lacher DA, Molloy AM, Massaro J, Mills JL, Nexo E, Rader JI, Selhub J, Sempos C, Shane B, Stabler S, Stover P, Tamura T, Tedstone A, Thorpe SJ, Coates PM, Johnson CL, Picciano MF. Biomarkers of vitamin B-12 status in NHANES: a roundtable summary. *Am J Clin Nutr* 2011;94(1):313S–321S.

17. Fernandes-Costa F, van Tonder S, Metz J. A sex difference in serum obalamin and transcobalamin levels. *Am J Clin Nutr* 1985;41(4):784–786.
18. Margalit I, Cohen E, Goldberg E, Krause I. Vitamin B12 Deficiency and the Role of Gender: A Cross-Sectional Study of a Large Cohort. *Ann Nutr Metab* 2018;72(4):265–271.
19. Björkegren K, Svärdsudd K. Serum cobalamin, folate, methylmalonic acid and total Swedes--a population-based study. *J Intern Med* 2001;249(5):423–432.
20. Carmel R, Green R, Jacobsen DW, Rasmussen K, Florea M, Azen C. Serum cobalamin, homocysteine and methylmalonic acid concentrations in a multiethnic elderly population: ethnic and sex differences in cobalamin and metabolite abnormalities. *Am J Clin Nutr* 1999;70(5):904–910.
21. McMahon GM, Hwang SJ, Tanner RM, Jacques PF, Selhub J, Muntner P, Fox CS. The association between vitamin B12, albuminuria and reduced kidney function: an observational cohort study. *BMC Nephrol* 2015;16:7.
22. Clarke R, Grimley Evans J, Schneede J, Nexo E, Bates C, Fletcher A, Prentice A, Johnston C, Ueland PM, Refsum H, Sherliker P, Birks J, Whitlock G, Breeze E, Scott JM. Vitamin B12 and folate deficiency in later life. *Age Ageing* 2004;33(1):34–41.
23. Carmel R. Current concepts in cobalamin deficiency. *Annu Rev Med* 2000;51:357–375.
24. Carmel R, Vasireddy H, Aurangzeb I, George K. High serum cobalamin levels in the clinical setting: clinical associations and holo-transcobalamin changes. *Clin Lab Haematol* 2001;23(6):365–371.
25. Lindenbaum J, Healton EB, Savage DG, Brust JC, Garrett TJ, Podell ER, Marcell PD, Stabler SP, Allen RH. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. *N Engl J Med* 1988;318(26):1720–1728.
26. Carmel R. Pernicious anemia. The expected findings of very low serum cobalamin levels, anemia, and macrocytosis are often lacking. *Arch Intern Med* 1988;148(8):1712–1714.
27. Johnson-Wimbley DT. Diagnosis and management of iron deficiency anemia in the 21st century. *Therap Adv Gastroenterol* 2011;4(3):177–184.
28. Spasojević-Kalimanovska V. Biohemijska osnova eritropoeze. U: Dopsaj V, urednik. *Osnove laboratorijske dijagnostike i lečenja anemije*. Drugo izdanje. Beograd: Farmaceutski fakultet u Beogradu, 2012: 9–39.



29. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Anemia Work Group. KDIGO clinical practice guideline for anemia in chronic kidney disease. *Kidney International Supplements* 2012;2(4):288–291.
30. Hamilton SM, Blackmore S. Investigation of megaloblastic anaemia: cobalamin, folate and metabolic status. In: Bain JB, Bates I, Laffan AM, Lewis SM, editors. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 11th ed. London: Elsevier Churchill Livingstone, 2012:201–228.
31. Lewerin C, Ljungman S, Nilsson-Ehle H. Glomerular filtration rate as measured by serum cystatin C is an important determinant of plasma homocysteine and serum methylmalonic acid in the elderly. *J Intern Med* 2007;261(1):65–73.
32. Vogiatzoglou A, Oulhaj A, Smith AD, Nurk E, Drevon CA, Ueland PM, Vollset SE, Tell GS, Refsum H. Determinants of plasma methylmalonic acid in a large population: implications for assessment of vitamin B12 status. *Clin Chem* 2009;55(12):2198–21206.
33. Simon-Lopez R, Sukhacheva E, Tsvetaeva N, Egorova M, Kolenkin S, Achildieva T. High Sensitivity New Parameters for the Detection of Vitamin B12 and Folate Deficiencies. *Blood* 2008;112(11):5379.
34. Risch C, Medina P, Nydegger UE, Bahador Z, Brinkmann T, Von Landenberg P, Risch M, Risch L. The relationship of leukocyte anisocytosis to holotranscobalamin, a marker of cobalamin deficiency. *Int J Lab Hematol* 2012;34(2):192–200.
35. Totokovic D, Dopsaj V, Martinovic J. Methylmalonic acid and neutrophil morphometric index in laboratory diagnosis of cobalamin deficiency without macrocytosis. *Int J Lab Hematol* 2016;38(3):265–272.
36. Totokovic D, Dopsaj V, Martinovic J. Evaluation of cell population data as potential markers of cobalamin and folate deficiency in populations at risk with regard to renal function. *J Appl Biomed* 2017;15(3):204–209.
37. Chaves F, Tierno B, Xu D. Quantitative determination of neutrophil VCS parameters by the Coulter automated hematology analyzer: new and reliable indicators for acute bacterial infection. *Am J Clin Pathol* 2005;124(3):440–444.
38. Chaves F, Tierno B, Xu D. Neutrophil volume distribution width: a new automated hematologic parameter for acute infection. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130(3):378–380.
39. Bagdasaryan R, Zhou Z, Tierno B, Rosenman D, Xu D. Neutrophil VCS parameters are superior indicators for acute infection. *Lab Hematol* 2007;13(1):12–16.

40. Lee AJ, Kim SG. Mean cell volumes of neutrophils and monocytes are promising markers of sepsis in elderly patients. *Blood Res* 2013;48(3):193–197.
41. Mardi D, Fwity B, Lobmann R, Ambrosch A. Mean cell volume of neutrophils and monocytes compared with C-reactive protein, interleukin-6 and white blood cell count for prediction of sepsis and nonsystemic bacterial infections. *Int J Lab Hematol* 2010;32(4):410–418.
42. Charafeddine KM, Youssef AM, Mahfouz RA, Saredine DS, Daher RT. Comparison of neutrophil volume distribution width to C-reactive protein and procalcitonin as a proposed new marker of acute infection. *Scand J Infect Dis* 2011;43(10):777–784.
43. Zhu Y, Cao X, Chen Y, Zhang K, Wang Y, Yuan K, Xu D. Neutrophil cell population data: useful indicators for postsurgical bacterial infection. *Int J Lab Hematol* 2012;34(3):295–299.
44. Zhu Y, Cao X, Zhang K, Xie W, Xu D, Zhong C. Delta mean neutrophil volume ( $\Delta$ MNV) is comparable to procalcitonin for predicting postsurgical bacterial infection. *J Clin Lab Anal* 2014;28(4):301–305.
45. Crouser EC, Parrillo JE, Seymour C, Angus DC, Bicking K, Tejedor L, Magari R, Careaga D, Williams J, Closser DR, Samoszuk M, Herren L, Robart E, Chaves F. Improved Early Detection of Sepsis in the ED with a Novel Monocyte Distribution Width Biomarker. *Chest* 2017;152(3):518–526.
46. 510(k) Substantial equivalence determination decision summary. Dostupno na: [https://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/reviews/K181599.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K181599.pdf)
47. De Benoist B. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. *Food Nutr Bull* 2008;29(2 Suppl):S238–244
48. COULTER® 3-D VCS Technology. Dostupnona: <http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/cyto2/6/coulter/ss000125.htm>
49. Berrak SG, Angaji M, Turkkan E, Canpolat C, Timur C, Eksioglu-Demiralp E. The effects of iron deficiency on neutrophil/monocyte apoptosis in children. *Cell Prolif* 2007;40(5):741–754.
50. Özcan A, Çakmak M, Toraman AR, Çolak A, Yazgan H, Demirdöven M, Yoku O, Gürel A. Evaluation of leucocyte and its subgroups in iron deficiency anemia. *International Journal of Medicine and Medical Sciences* 2011;3(5):135–138.
51. Westerman DA, Evans D, Metz J. Neutrophil hypersegmentation in iron deficiency anaemia: a case–control study. *Br J Haematol* 1999;107(3):512–515.

52. Lim Y, Lee EY, Choi IS, Kim TY, Yoon SS, Kim KW. Leukopenia in Patients with Iron Deficiency Anemia. *Blood* 2011;118(21):5279.
53. Allen LH. Vitamin B-12. *Adv Nutr* 2012;3(1):54–55.
54. Green R. Cobalamin and folate deficiency: the antecedents and associations of anemia. In: Education Program of the 26th Congress of the International Society of Haematology. Singapore: International Society of Haematology, Asian-Pacific Division; 1996:128–136.
55. Vinod Devalia, Malcolm S. Hamilton, Anne M. Molloy, British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and treatment of cobalamin and folate disorders. *Br J Haematol* 2014;166(4):496–513.
56. Wong CW. Vitamin B12 deficiency in the elderly: is it worth screening? *Hong Kong Med J* 2015;21(2):155–164.
57. Langan RC, Zawistoski KJ. Update on Vitamin B12 Deficiency. *Am Fam Physician* 2011;83(12):1425–1430.

#### **G. Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine sastavni deo doktorske disertacije**

##### **Radovi publikovani u međunarodnim časopisima**

- **Totoskovic D**, Dopsaj V, Martinovic J. Evaluation of cell population data as potential markers of cobalamin and folate deficiency in populations at risk with regard to renal function (Article). *Journal of Applied Biomedicine*. 2017; 15 (3): 204-209. **M23**
- **Totoskovic D**, Dopsaj V, Martinovic J. Methylmalonic acid and neutrophil morphometric index in laboratory diagnosis of cobalamin deficiency without macrocytosis (Article). *Int J Lab Hematol* 2016;38(3):265–272. **M23**

##### **Saopštenje na međunarodnim naučnim skupovima**

- **Totoskovic D**, Dopsaj V, Martinovic J. Methylmalonic Acid and Neutrophil Morphometric Index in Cobalamin Status Assessment. *Int J Lab Hematol* 2016;38(Suppl. 2):107–108. **M23**

##### **Saopštenje na domaćim naučnim skupovima sa međunarodnim učešćem**

- **Totoskovic D**, Dopsaj V, Martinovic J. Vitamin B12 status in patients at increased risk of deficiency – the relationship between serum biomarkers and morphometric parameters of leukocytes. J Med Biochem 2018;37(2):253. **M23**
- **Totoskovic D**, Dopsaj V, Martinovic J. The relationship of morphometric leucocyte parameters with markers of anaemia. Journal of Medical Biochemistry 2015;34(1):P036. **M23**

## H. Mišljenje i predlog

Na osnovu izloženog može se zaključiti da rezultati prikazani u doktorskoj disertaciji kandidata dipl.farm.-med.biohemičara Dragane Totošković predstavljaju originalan i značajan naučni doprinos za oblast medicinska biohemija. Rezultati su publikovani u vidu 2 rada u međunarodnim časopisima, 2 posterske prezentacije na međunarodnom i domaćem naučnom skupu i usmenog izlaganja na domaćem naučnom skupu sa međunarodnim učešćem.

Uzimajući u obzir sve izloženo, Komisija u navedenom sastavu pozitivno ocenjuje doktorsku disertaciju kandidata Dragane Totošković i predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj izveštaj i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom: „**Značaj biohemijskih markera i morfometrijskih karakteristika leukocita u laboratorijskoj dijagnostici subkliničkog deficita vitamina B12**“

Beograd, 5. 12. 2019.

Dr Violeta Dopsaj – mentor, redovni profesor Farmaceutskog fakulteta,  
Univerziteta u Beogradu

---

Dr Dragomir Marisavljević, redovni profesor Medicinskog fakulteta,

Univerziteta u Beogradu

---

Dr Duško Mirković, vanredni profesor Farmaceutskog fakulteta,  
Univerziteta u Beogradu

---