



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**B 12 VİTAMİNİ VE HOLOTRANSKOBALAMİN DÜZEYLERİNİN  
SERUM LİPİD PEROKSİDASYONU İLE İLİŞKİSİ**

**Dr. Faruk SÖNMEZİŞİK**

**UZMANLIK TEZİ**

**BURSA – 2009**



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**B 12 VİTAMİNİ VE HOLOTRANSKOBALAMİN DÜZEYLERİNİN  
SERUM LİPİD PEROKSİDASYONU İLE İLİŞKİSİ**

**Dr. Faruk SÖNMEZİŞİK**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışman: Prof. Dr. Esmâ GÜR**

**BURSA – 2009**

## İÇİNDEKİLER

<b>Türkçe Özet</b>	<b>ii</b>
<b>İngilizce Özet</b>	<b>iv</b>
<b>Giriş</b>	<b>1</b>
<b>Gereç ve Yöntem</b>	<b>16</b>
<b>Bulgular</b>	<b>24</b>
<b>Tartışma ve Sonuç</b>	<b>34</b>
<b>Kaynaklar</b>	<b>43</b>
<b>Ekler</b>	<b>52</b>
<b>Teşekkür</b>	<b>55</b>
<b>Özgeçmiş</b>	<b>56</b>

## ÖZET

Bu çalışmamızda, vitamin B12 eksikliğinin tanısında holotranskobalamin (HoloTC) düzeyleri ölçümünün erken tanı için bir belirteç olarak değerini incelemeyi, farklı düzeylerde vitamin B12 konsantrasyonuna sahip bireylerde HoloTC düzeylerinin homosistein (Hcy) ve folik asit düzeyleri ile ilişkisini incelemeyi ve kobalamin eksikliğinde hiperhomosisteinemiye bağlı olarak arttığı bildirilen oksidatif hasar ile kobalamin ve HoloTC düzeyleri arasında bir ilişki olup olmadığını incelemeyi amaçladık.

Çalışmaya alınan 400 olgu, biyokimya laboratuvarına B12 vitamini ve folik asit düzeyi ölçümü için başvuran hastalar arasından seçildi. Gönüllüler B12 vitamin düzeylerine göre vitamin B12 eksikliği açısından, kesin olan vakalar (Grup 1, <193 pg/ml), şüpheli olan vakalar (Grup 2, 193–300 pg/ml) ve normal vakalar (Grup 3, >300 pg/ml) olarak 3 gruba ayrıldı. Tüm vaka gruplarının serum vitamin B12, holotranskobalamin, homosistein, folik asit ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçüldü.

Sonuçlarımıza göre, ölçülen tüm parametreler, 3 vaka grubu arasında anlamlı olarak birbirinden farklıydı. Korelasyon analizi sonuçlarına göre vitamin B12 düzeyleri ile HoloTC ve folik asit düzeyleri arasında pozitif ve istatistiksel olarak anlamlı korelasyon, vitamin B12 düzeyleri ile Hcy ve MDA düzeyleri arasında negatif ve istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptandı. HoloTC ile folik asit düzeyleri arasında pozitif ve istatistiksel olarak anlamlı korelasyon, HoloTC ve Hcy düzeyleri arasında negatif ve istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulundu. Hcy düzeyleri folik asit düzeyleri ile negatif ve istatistiksel olarak anlamlı korelasyon gösterirken, MDA düzeyleri ile pozitif ve istatistiksel olarak anlamlı ilişkiliydi.

Sonuçlarımız, HoloTC düzeylerinin, vitamin B12 düzeylerinin 193–300 pg/ml arasında ölçüldüğü vakalarda kobalamin durumunun değerlendirilmesinde yol gösterebileceğine dikkat çekmektedir. Diğer

tarafından, oksidatif hasarla ilişkisi açısından incelendiğinde ise tek başına HoloTC'nin, total vitamin B12 ölçümü kadar değerli olmadığı anlaşılmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Vitamin B12, holotranskobalamin, homosistein, folik asit, malondialdehit.

## **SUMMARY**

### **The Association of Vitamin B12 and Holotranscobalamin Levels with Serum Lipid Peroxidation.**

The aim of this study was to investigate the usefulness of holotranscobalamin (HoloTC) measurement in early diagnosis of vitamin B12 deficiency, to investigate the relationship between HoloTC, homocysteine (Hcy) and folic acid in volunteers with different vitamin B12 concentrations and to examine if there exists a relation between HoloTC, cobalamin and oxidative stress which is known to increase due to hyperhomocysteinemia in cobalamin deficiency.

Four hundred volunteers, who applied to the routine laboratory for vitamin B12 and folic acid measurements were included in the study. Volunteers were divided into 3 groups according to their vitamin B12 levels as: vitamin B12 deficient subjects (Group 1, <193 pg/ml), deficiency suspected subjects (Group 2, 193–300 pg/ml), and normal subjects (Group 3, >300 pg/ml). Vitamin B12, HoloTC, Hcy, folic acid and malondialdehyde (MDA) concentrations were measured in sera of all subjects.

According to the results, each parameter showed significant difference between the 3 groups. Vitamin B12 levels showed significant positive correlations with the HoloTC and folic acid levels and significant negative correlations with Hcy and MDA levels. HoloTC and folic acid levels were positively correlated while HoloTC and Hcy levels were negatively correlated. Also, Hcy levels showed negative correlation with folic acid levels and positive correlation with MDA levels.

Our results indicate that HoloTC measurement could be a good guide in assessment of cobalamin status in subjects with vitamin B12 levels

between 193–300 pg/ml. On the other hand, when evaluated relative to oxidative stress, it can be concluded that HoloTC alone is not as valuable as total vitamin B12 measurement.

**Key words:** Vitamin B12, holotranscobalamin, homocysteine, folic acid, malondialdehyde.

# GİRİŞ

## 1. Çalışmanın Konusu ve Amacı

Kobalamin (B12 vitamini) tek karbon metabolizması ve hücre bölünmesi için gerekli suda çözünen bir vitamindir. Kobalamin eksikliğinin klinik önemi, megaloblastik anemi ve nörolojik tablolara neden olmasıdır. Eksiklik, homosistein (Hcy) konsantrasyonlarında artışa öncülük eder ve kardiyovasküler hastalık, doğumsal kusurlar, gebelik komplikasyonları, osteoporoz, nöropsikiyatrik bozukluklar ve demans gibi ciddi durumlar ile de ilişkilidir (1, 2).

Vitamin B12 eksikliği özellikle yaşlılar arasında genel bir problemdir. Serum kobalamin düzeyi, 150 pmol/L (200 pg/ml) üzerinde ise normal olarak değerlendirilir, buna göre yaşlılarda eksiklik oranı %10–15 civarındadır (3). Normalin altında kobalamin konsantrasyonları olan yaşlılarda B12 eksikliği prevalansı, tanı kriterlerine bağlı olarak %10 ve % 43 arasında değişmektedir (4–10). Diğer yandan homosistein (Hcy) ve metilmalonik asidin (MMA) kan konsantrasyonları ölçümü gibi daha duyarlı belirteçler de tanı için kullanılmaktadır. Bunların kullanımı ile kobalamin eksikliği prevalansı %43'ün de üzerine çıkmaktadır (4, 11). Pek çok çalışmada, kobalamin eksikliğinin folat yetersizliği durumları ile birlikte olduğu gözlenmiştir (7, 12–15). Örneğin Framingham çalışması katılımcılarının %66'sında düşük serum folat düzeyleri ile birlikte yükselmiş homosistein ve artmış MMA konsantrasyonları da görülmüştür (10).

Holotranskobalamin (HoloTC), kobalaminin transport proteini olan transkobalamin (TC) ile bağlanmış şeklidir ve kobalaminin hücre içine alımını artırır (16). Plazmada dolaşan kobalaminin %30'dan daha azı HoloTC şeklindedir. Kalan kısmı haptocorrinlere bağlanır ve bunların görevi tam bilinmemektedir (17, 18). Son yıllarda yapılan çalışmalar, HoloTC'nin kobalamin durumundaki değişiklikler için kobalamin düzeyleri ölçümünden daha iyi, erken bir belirteç olduğunu (17, 19) ve bozulmuş kobalamin



fonksiyonu ile ilişkili durumlar ile daha güçlü bağlantılı olabileceğini ileri sürmektedir (20–23).

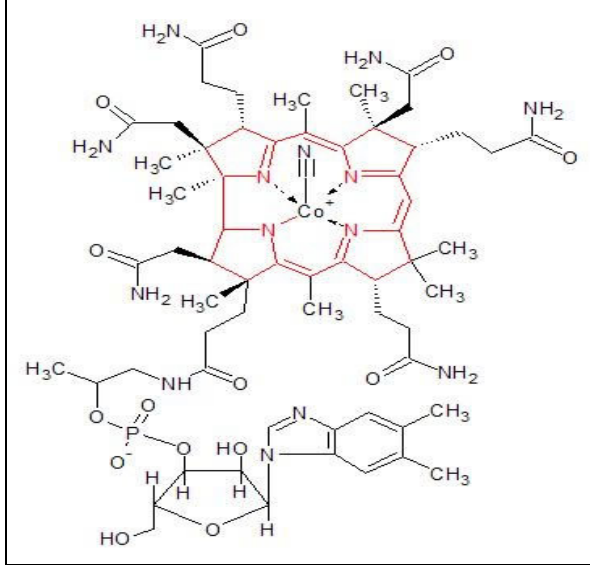
Bu çalışmada farklı düzeylerde vitamin B12 konsantrasyonuna sahip bireylerde HoloTC düzeylerini değerlendirerek vitamin B12 eksikliği tanısında HoloTC ölçümlerinin daha iyi veya yardımcı bir gösterge olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, kobalamin eksikliğinde ortaya çıkan hiperhomosisteinemiye bağlı olarak arttığı bildirilen oksidatif hasar ile kobalamin ve HoloTC düzeyleri arasında bir ilişki olup olmadığının araştırılması da planlanmıştır.

## **2. Vitamin B12**

### **2.1. Yapısı ve Bulunma Biçimleri**

Vitamin B12'nin (kobalamin olarak da bilinir) yapısı karmaşıktır (Şekil-1). Kobalamin, hem'de bulunan porfirin halkasına benzeyen bir Corrin halkası taşır. Öte yandan Corrin halkası, dört pirrol halkasından iki tanesinin bir metilen köprüsü yerine doğrudan doğruya birbirine bağlı olması ile hem'den farklılık gösterir. Bu molekülün en alışılmadık niteliği Corrin halkası ile koordine olmuş kobaltın varlığıdır. Bu kobalt bir karbon atomu ile bağ kurabilir. Vücutta bu, metilkobalamin oluşturmak üzere bir metil grubunun karbonu ile veya 5'-deoksiadenozilkobalamin yapmak üzere 5'-deoksiadenozinin 5' karbonu ile tepkimeye girer (24).

Vitamin preparatlarında bulunan vitamin B12 biçimi siyanokobalamin olup burada kobalta bir CN grubu bağlanmıştır. Hayvan karaciğerinde metilkobalamin, adenoziilkobalamin ve hidroksikobalamin biçimlerinde bulunur. Karaciğer iyi bir vitamin kaynağıdır. Vitamin B12, karaciğerde transkobalamin l'e bağlı halde depolanır.



**Şekil-1:** Vitamin B12'nin yapısı.

## 2.2. Vitamin B12'nin Emilim ve Taşınması

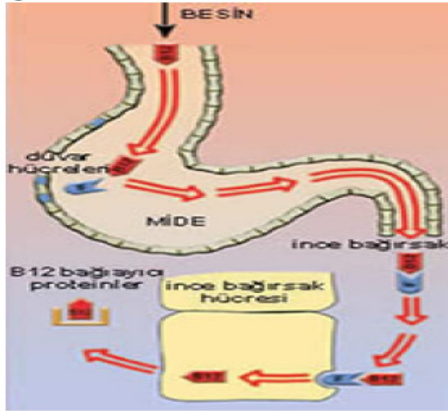
Vitamin B12 bakteriler tarafından üretilmesine karşın yüksek bitki ve hayvanlar tarafından sentez edilemez. Diyetteki vitamin B12'nin ana kaynakları et, yumurta, süt ürünleri, balık, kümes hayvanı etleri ve deniz ürünleridir. Bu besinlere kaynak görevi yapan hayvanlar vitamin B12'yi esas olarak yemlerindeki bakterilerden elde ederler (24).

Vitamin B12 tek karbon metabolizmasında bir koenzimdir ve DNA sentezi için gereklidir. Klinik önemi, vitamin B12 eksikliğinin megaloblastik anemi ve nörolojik bozukluklara yol açmasıdır. Vitamin B12'nin emilimi karmaşıktır (Şekil-2). Mide içinde, gıdalara bağlı olan vitamin B12 diyetel proteinlerden serbestleşir ve ince bağırsağa haptocorrin (HC) ile kompleks yapmış halde transfer olur. İnce bağırsağın alkali ortamı içinde, HC pankreatik enzimler ile parçalanır. Serbest kalan vitamin B12, mide pariyetal hücreleri tarafından üretilen bir protein olan İntrinsik Faktör (IF) ile birleşir ve IF-vitamin B12 kompleksi ileum içinde reseptör aracılı alım ile emilir (25-27). Bazı hastalarda gastrektomiden sonra görüldüğü gibi veya pernisiyöz anemili hastalardaki gibi eğer IF yeterince yoksa, bu durumda sindirimdeki vitamin B12'nin sadece %1 kadarı pasif difüzyonla emilir (28). Eğer IF yeterli ise, 0,5 µg'dan daha az fizyolojik dozun yaklaşık %75'i emilir, 1.0 µg civarındaki

dozun ise % 50'si emilir. Böylece vitamin B12'nin oral konsantrasyonu artsa bile toplam vitamin B12 emilimi daha fazla artmaz (28).

IF–vitamin B12 kompleksi ileumun terminal kısmındaki özel reseptörlere bağlanır ve IF'den ayrılan vitamin B12 enterosit içine alınır. Enterosit içinde vitamin B12, Transkobalamin (TC) ile kompleks yapar ve sonra dolaşıma salınır (24). Dolaşımda vitamin B12 iki proteine bağlı halde bulunur: TC ve HC. TC–vitamin B12 kompleksi (HoloTC) hücre içine taşınır ve burada TC parçalandıktan sonra vitamin B12 serbestlenir (29). HC'nin fizyolojik rolü henüz saptanamamıştır.

Transkobalamin'den ayrılan ve serbest kalan vitamin B12, hücrelerin sitozolüne hidroksi metil kobalamin olarak salınır. Sitozolda ya metil kobalamine dönüşür veya 5'–deoksiadenozil kobalamine dönüşmek üzere mitokondrilere girer. Karaciğer, vitamin B12'nin yaklaşık yarısını alırken geri kalanı diğer dokulara götürülür. Karaciğerde depo edilen vitamin miktarı, nutrisyonel bir eksikliğin belirmesi için 3–6 yıl geçmesini gerektirecek kadar büyüktür (24).



**Şekil-2:** Vitamin B12'nin emilim ve taşınması.

### 2.3. Holotranskobalamin

Transkobalamin–vitamin B12 kompleksi, holotranskobalamin olarak isimlendirilir. HoloTC, biyolojik olarak kullanılabilen kobalamin içerir çünkü sadece HoloTC spesifik reseptörler yoluyla bütün hücrelerde vitamin B12'nin alımını başlatır. Kobalaminin daha büyük fraksiyonu (%80 kadarı) HC

tarafından taşınır; bu ise metabolik olarak etkisizdir çünkü karaciğer üzerindeki hariç tutulursa hücre reseptörleri yoktur (30). Ölçülen kobalaminin büyük kısmının HC ile bağlı kobalamin olması, dolayısıyla aktif kobalamin olmaması, serum toplam kobalamin düzeylerinin ölçümünde yanıltıcı olabilir.

TC ~18 saatlik bir yarı ömre sahiptir ve vitamin B12 alımındaki değişikliklere duyarlıdır (31). HoloTC, kanda ilk olarak vitamin B12 alımından 3 saat sonra tespit edilebilir ve maksimum plazma konsantrasyonuna 8–12 saatte ulaşır. Dolaşıma geçtikten sonra HoloTC, dakikalar içinde hücrelere alınır (31, 32).

HoloTC'nin, haptocorrin–vitamin B12 kompleksi (HoloHC) ile karşılaştırıldığında dolaşımdaki yarı ömrü daha kısadır. HoloTC'deki bir azalma kobalamin eksikliğinin erken bir belirteci olabilir (33,34).

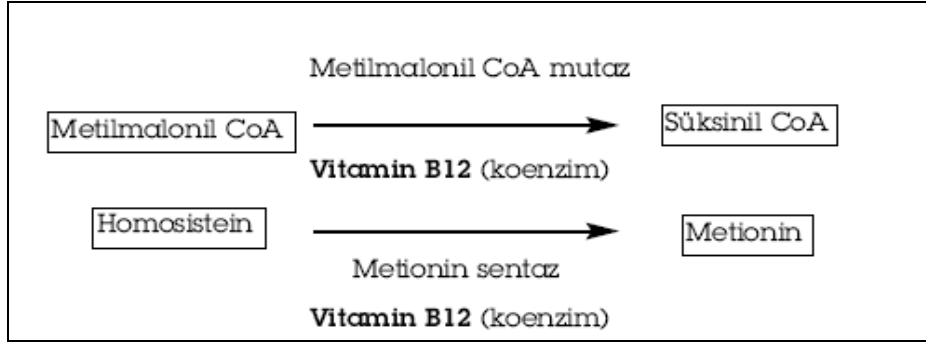
HC' nin genetik yokluğu seyrek ve ciddi bir durum değildir (35). Diğer taraftan TC' nin genetik yokluğu veya anomalileri kobalamin eksikliğinin tipik hematolojik, nörolojik ve metabolik patolojileri ile kendini gösterir (36–38).

HoloTC' nin vitamin B12 durumunu göstermesi açısından toplam serum kobalamininden daha iyi bir gösterge olduğunu destekleyen pek çok çalışma yayınlanmıştır (39–41). Yeni metodlar, spesifik anti–TC antikoru üzerine kuruludur ve HoloTC'nin vitamin B12 eksikliğinin tanısı için yararlı ve kullanılabilir olduğunu düşündürmektedir (42, 43). Vitamin B12 eksikliğinin biyokimyasal işaretleri olan hastalarda düşük HoloTC düzeyleri beklenmektedir (44). Vejeteryanlarda (45, 46), katı vejeteryanlarda (47) ve vitamin B12 alımının düşük olduğu toplumlarda (48, 49) dikkate değer düşük vitamin B12 düzeyleri rapor edilmiştir. İlginç bir şekilde sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Alzheimer hastalığı olan hastalarda düşük serum HoloTC düzeyleri (vitamin B12 düzeyi normal olsa bile) bildirilmiştir (50). HoloTC düzeylerinin vitamin B12 durumunu, yakın döneme ait vitamin emiliminden bağımsız olarak yansıttığı öne sürülmektedir (51).

#### **2.4. Vitamin B12'nin İşlevleri**

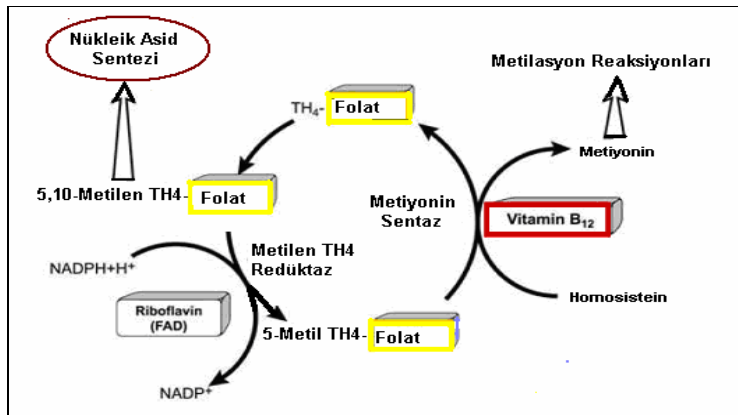
Vitamin B12, vücutta iki tepkimeye koenzim olarak katılır: bir metil grubunun metyonin yapmak üzere N5–metil tetrahidrofolat'dan homosisteine

taşınması (metyonin sentaz reaksiyonu) ve L-metil malonil KoA'nın metil grubunun süksinil KoA yapmak üzere yeniden düzenlenmesi (metil malonil KoA mutaz reaksiyonu) (24) (Şekil-3).



**Şekil-3:** Vitamin B12'nin koenzim olarak görev aldığı reaksiyonlar.

Metyoninin salvaj yolunda, tetrahidrofolat (THF) tarafından, serin amino asidi veya diğer kaynaklardan alınan metil grubu, metilkobalamin yapmak üzere vitamin B12 'ye aktarılır. Metil kobalamin metil grubunu metyonin sentaz enzimi aracılığı ile homosisteine aktarır ve metyonin sentezlenir. Metyonin daha sonra, metil grubunu diğer bileşiklere aktarmak üzere S-Adenozil Metyonin (SAM) haline çevrilir (24) (Şekil-4). Bu tepkimenin metabolik yararları, metyonin depolarının sürdürülmesi ve pürin, pirimidin ve nükleik asit sentezine katılacak tetrahidrofolat formlarının sağlanmasıdır (52).

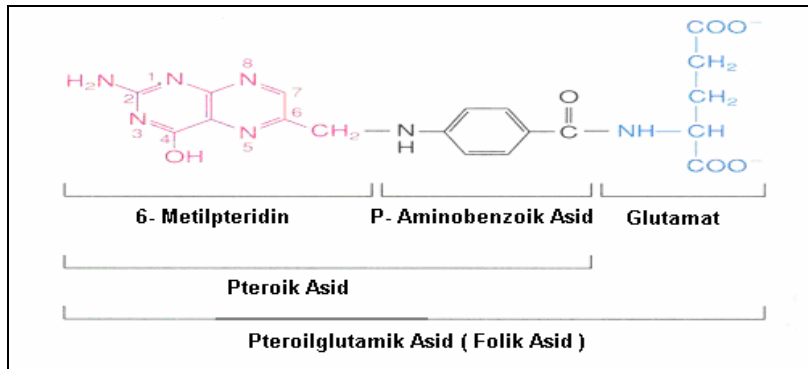


**Şekil-4:** Vitamin B12-Folik Asit metabolizmalarının ilişkisi. TH<sub>4</sub>-Folat: Tetrahidrofolat.

L-metil malonil KoA'nın süksinil KoA'ya izomerizasyonu reaksiyonunda vitamin B12'nin etkin koenzim biçimi 5'-deoksiadenozilkobalamindir. Bu tepkime, valin, izolösin, treonin, timin ve tek sayıda karbon içeren yağ asitlerinin son üç karbonundan gelen propiyonil KoA'yı Tri-Karboksilik Asit döngüsünün ara ürünü olan süksinil KoA'ya çeviren metabolik yolun bir bölümünü oluşturur. Kobalaminin metilmalonil KoA'nın süksinil KoA'ya dönüşümünde koenzim rolü oynaması, propiyonatın bir sitrik asit döngüsü üyesine çevrimi yolunda kilit bir tepkimedir ve dolayısı ile glukoneogenez olayında önem taşır. Bağırsak lümenindeki mikrobik fermantasyonun ana ürünü propiyonat olduğundan bu olay, geniş getirenlerde özellikle önemlidir (24).

## 2.5. Vitamin B12 Metabolizmasında Folatın Yeri

Vitamin B12 metabolizmasında folik asidin yeri çok önemlidir. Folik asit veya folat, birer molekül p-aminobenzoik asit (PABA) ve glutamik aside bağlanmış pteridin bazından oluşur. Hayvanlar PABA sentezleyemediği için glutamata pteroid aside bağlayamaz ve bu yüzden diyetlerinde folat bulunmalıdır. Maya, karaciğer ve yapraklı sebzeler folat için ana kaynaklardır (52).



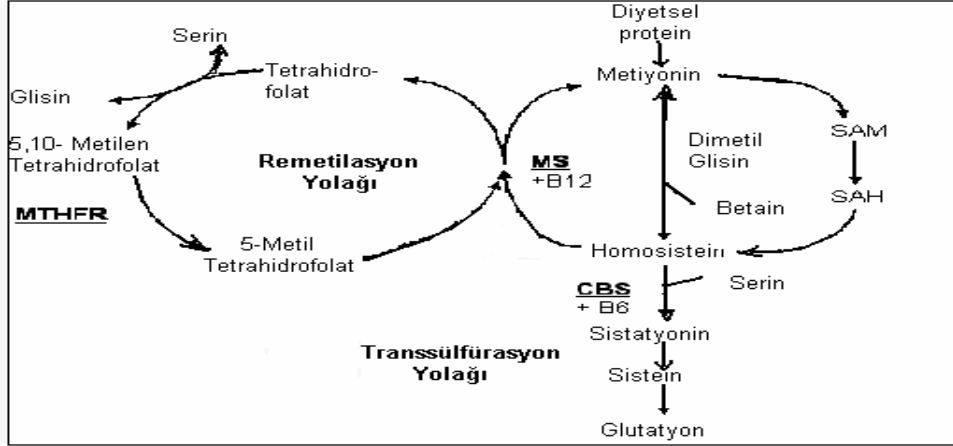
**Şekil-5:** Folik asidin yapısı.

Diyetteki folat türevleri, emilim için bağırsak enzimleri tarafından monoglutamil folata dönüştürülür. Bunun büyük bölümü, bağırsak hücreleri içinde indirgeyici ekvalantların vericisi olarak NADPH kullanan folat redüktaz tarafından tetrahidrofolata indirgenir (52). Bağırsak hücreleri içinde folat, esas

olarak N5–metil tetrahidrofolata çevrilir, bu da portal vene geçip karaciğere gider. Vücut folatının yarısını depolayan karaciğer, portal dolaşımdaki folatın çoğunu kapar, bu aktif transport veya endositoz yoluyla olabilir. Karaciğerde THF tepkimelerde kullanılmadan önce tekrar poliglutamat haline konjuge edilir. THF poliglutamat dokulardaki işlevsel koenzimdir. Folatın kandaki ana biçimi olan N5–metil tetrahidrofolat, plazma proteinlerine ve özellikle serum albumine gevşek şekilde bağlıdır (24).

THF tek karbonlu grupların yükseltgenmesi ve indirgenmesi tepkimelerine katılır (24). THF tarafından taşınan tek karbonlu birimler, çeşitli oksidasyon basamaklarını içeren bir diziyi temsil etmektedir; bunlar, metil, metilen, metenil, formil ve formimino olabilir. THF tarafından aktarılan tek karbon grupları ya beşinci (N5) veya onuncu (N10) pozisyonundaki azotlara bağlanır veya N5 ile N10 arasında bir köprü yapar. THF'a bağlı tek karbon grupları topluca tek karbon havuzu olarak adlandırılır. Bu tek karbonlu birimler THF'a bağlı iken yükseltgenip indirgenebilirler. Tümü metabolik olarak birbirlerine çevrilebilir (52).

THF üzerindeki tek karbon grupları daha sonra diğer bileşiklere aktarılır. Bu tür bir aktarma serinden glisin sentez edilmesine, DNA sentezi için gereken timin bazının sentezine, hem DNA hem RNA sentezi için gereken pürin bazlarının sentezlerine ve metil gruplarının vitamin B12'ye aktarılması olaylarına yarar (24) (Şekil–6). Timin ve pürin bazlarının sentezi, dolayısı ile hücre bölünmesi için THF gereklidir. Bu bazların sentezinin doğrudan besinsel folat eksikliği veya folat metabolizmasını bozan ilaçlarla bloke edilmesi hücre bölünme ve gelişme hızında yavaşlama yapacaktır (24). Vitamin B12 eksikliğinde folik asidin N5 metil THF formu diğer formları oluşturamayacak şekilde birikir. Folat kapanı olarak da ifade edilen bu durumda aslında folik asit eksikliği söz konusu olmadığı halde folik asidin katıldığı reaksiyonlar aksar (24).



**Şekil-6:** Folat, Vitamin B12 ve SAM arasındaki ilişkiler. MS: Metiyonin Sentaz, CBS: Sistasyonin  $\beta$  Sentaz, MTHFR: Metilen Tetrahidro Folat Redüktaz

## 2.6. Vitamin B12 Eksikliği

Vitamin B12 eksikliği özellikle yaşlı kişiler arasında önemli bir halk sağlığı sorunudur. Vitamin B12 eksikliği olan yaşlılarda, gastrik İntrinsik Faktör üretiminin bozulması ve vitamin B12 malabsorbsiyonunun sonucu olarak pernisiyöz anemi gelişebileceği gösterilmiştir (53, 54). Bazı araştırmacılar, yaşlılar arasında vitamin B12 eksikliği prevalansının %30'dan daha yüksek olabileceğini öne sürmektedir.

Kobalamin durumundaki yetersizlik için çeşitli nedenler sayılabilir. (45, 75, 76) (Tablo-1). Başlıca problemler bozulmuş emilim, vitamin B12 gereksiniminin artması ve diyetel yetersizliktir (3). Yaşlı kişilerde kronik atrofik gastritten dolayı mide salgıları azalmıştır; bu ise vitamin B12 eksikliğini en büyük sebebidir (4, 55-57). Çalışmalar, yaşlı kişilerde, kullanılan belirleme kriterine bağlı olmak üzere kronik atrofik gastritin vitaimn B12 eksikliği nedenlerinin %20-50'sini oluşturduğunu göstermektedir (58). Kronik atrofik gastritin başlıca özelliği, HCl ve pepsinojen gibi mide salgılarının ve intrinsik faktör salınımının azalmasıdır (4, 58). Bu değişiklikler diyetel vitamin B12'nin bağırsakta serbestleşmesini önlemektedir. Diyetel kobalaminin atrofik gastritteki biyoyararlanımının bu şekilde düşüşü Doscherholmen ve Swaim (59) ile Bradford ve Taylor (60) tarafından da gösterilmiştir. Bundan başka, azalmış asit salınımı ince bağırsakta pH'ı



yükseltir. Bu durum mikroorganizmalara karşı koruyucu olan bariyeri zayıflatır ve ince bağırsağın geçirgenliğini artırır. Bakteriler kolondan buraya geçerler ve sonuçta ince bağırsakta, sıklıkla Camfilobakter, Yersinia ve Clostridium olmak üzere bakteriler aşırı çoğalır. Bu durum vitamin B12 alımı için bir yarışa neden olur, böylece kobalamin yetersizliği daha da artar (61).

**Tablo-1:** Kobalamin eksikliğinin nedenleri (45, 75, 76).

<b>Diyetsel eksiklik</b> Sıkı vejeteryan diyet Yetersiz beslenme Düşük alım
<b>Malabsorbsiyon</b> Pernisiyöz anemi (Tip A kronik atrofik gastrit) Gastrektomi Tip B kronik atrofik gastrit Zollinger–Ellison Sendromu Özellikle ileumu tutan bağırsak hastalıkları (Çölyak hastalığı, Crohn hastalığı) İleumun rezeksiyonu Pankreatik yetersizlik Parazit hastalıkları (Difilobotrium latum solucanı) Bakteriyel aşırı çoğalma Antiepileptik ilaçlar (karbamazepin, fenitoin, primidon) Proton pompası inhibitörleri (omeprazol) Histamin H2 reseptör antagonistleri Antidiyabetik ilaç metformin Antibiyotikler (kloramfenikol, neomisin) Kolestiramin
<b>Gereksinim artışı</b> Metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) mutasyonu Hipertiroidizm Diyabet Böbrek yetmezliği Sigara kullanımı Düzenli alkol alımı

Gastrik atrofinin yaşlanmayla ilişkili olmayan başka bir sebebi ise kronik Helicobakter pylori enfeksiyonudur (4, 57). Bu durum Amerikan halkında oranlanmış ve 30 yaşın üstündekilerin % 10'u, yaşlıların (60 yaş

üstü) ise %60'ı enfekte bulunmuştur (62). Helicobakter enfeksiyonu düşük sosyoekonomik bölgelerde daha yüksek prevalans gösterir (63).

Vitamin B12 eksikliğine zemin oluşturan pernisiyöz aneminin nedenlerinden olan Tip A atrofik gastrit yaşlılarda sıkça tanı konulan bir hastalıktır ancak genellikle kobalamin eksikliğinin yaşla ilgili bir nedeni değildir (55). Carmel (64) tarafından pernisiyöz anemi yaşlılıkla ilişkisiz bulunmuştur. Pernisiyöz anemi genellikle seyrek olup tipik hastalık belirtileri, makrositik anemi, glossit ve vibrasyon duyusu ve propriyosepsiyon duyusu bozukluğundan dolayı anormal yürüyüş ve pareteziler gibi nörolojik durumlardır (65, 66). Bu hastaların büyük bölümü kolayca tanınır ve eğer zamanında tanınır ve tedavi edilirse tam olarak iyileşebilirler.

Vitamin B12'nin nutrisyonel eksikliği kobalamin düzeylerinin azalmasında yukarıda anlatılanların tersine küçük bir rol oynar. Howard ve arkadaşları (67) düşük kobalamin düzeyi olan yaşlı kişilerde diyetel kobalamin alımını araştırmışlar ve yaşlılardaki hafif-düşük kobalamin düzeylerinin vitaminden fakir beslenmeye bağlı olmadığı sonucuna varmışlardır. Bununla birlikte vitamin B12 alımının et, yumurta ve süt ürünlerinden kaçınan katı vejeteryanların bir problemi olduğunu belirtmişlerdir.

Hayvansal gıdaları tam olarak diyetinden çıkaran vejeteryanlarda vitamin B12'yi de içeren bazı gerekli besinlerin alımı azalır. Vitamin B12 tipik olarak sadece hayvansal gıdalarda bulunur. Böylece hayvansal gıdalardan kaçınmayla ilişkili katı vejeteryan diyet, vitamin B12 eksikliğine öncülük edebilmektedir (68, 69). Uzamış vitamin B12 eksikliği klinik bir hastalık durumudur ve genellikle nörolojik bozukluklar, mide bağırsak bozuklukları ve anemi ile kendini gösterir (70, 71).

Vitamin B12 durumunu saptamada duyarlı ve spesifik deneylere ihtiyaç vardır çünkü vitamin B12 eksikliğinin prevalansı yüksektir ve ciddi komplikasyonlara yol açabilir. Bir kişide, tipik olarak vitamin B12 eksikliğinden sadece megaloblastik aneminin hematolojik göstergeleri görüldüğünde şüphelenilir ve sadece şiddetli vitamin B12 düşüşü olan bireylerde belirtiler ortaya çıkar (72). Toplam plazma vitamin B12 konsantrasyonu ölçümü,

vitamin B12 eksikliği için klinik tarama testi olarak halen geçerli standarttır. Toplam plazma vitamin B12 konsantrasyonunun <148 pmol /L (<200 pg/ml) olması genellikle eksiklik olarak kabul edilir. Bu değer, vitamin B12 eksikliği durumlarının çoğu için tanısal olarak kullanışlıdır. Bununla beraber, vitamin B12 eksikliği olduğu düşünülen bireylerin bir kısmında klinik ya da biyokimyasal olarak eksikliği gösteren başka hiçbir delil yoktur (73). Diğer yandan zıt bir şekilde, plazma vitamin B12 konsantrasyonları referans aralıkları içindeyken bile nöropsikiyatrik (66) ve metabolik anomaliler (66, 74) olabilir. Vitamin B12 eksikliğinde metil malonik asit ve homosistein konsantrasyonları artar ve bunların vitamin B12 durumunun değerlendirilmesi açısından toplam plazma vitamin B12 düzeylerinden daha duyarlı olduğu düşünülmektedir (66,74). Fakat bunların kullanımı sınırlıdır. Bu nedenle vitamin B12 eksikliğinin saptanması için daha güvenilir, daha duyarlı ve daha özgül tarama testlerine ihtiyaç vardır.

## **2.7. Hiperhomosisteinemi**

Homosistein, hem folik asit hem vitamin B12 metabolizması ile ilgili çeşitli yollardan birikime uğrayabilir. Homosistein, metyonin yıkımı sırasında ortaya çıkan S-adenozilhomosisteinden türetilir. Bu tepkime sürekli olduğundan, homosistein sabit hızda sürekli üretilmektedir. Üretilmiş olan homosistein ya metyonin vermek üzere tekrar metillenmekte veya sistatyonin vermek için serinle kondanse olmaktadır. Metyonin üretimi için iki yol bulunmaktadır. Ana yol, vitamin B12 gerektiren ve N5-metil tetrahidrofolat tarafından metillenen yoldur. Karaciğerde ikinci bir yol daha bulunmakta olup önemsizdir (24).

Vitamin B12 eksikliği bulunan bir kişide homosisteinin ana yol üzerinden metyone çevrilmesi inhibe olur. Bu da homosisteini sistatyonin üretmeye doğru yönlendirir ve sonunda sistein üretimi hızlanır. Sistein birikimi, sistatyonin üreten enzimi (sistatyonin  $\beta$  sentaz) geri bildirimle inhibe eder. Bu ise tümüyle homosistein birikmesine yol açar ve biriken homosistein kana salınır. Buna ek olarak, N5, N10-metilen THF'ı, N5-metil THF'a çeviren enzimdeki (MTHFR=Metilen tetrahidrofolat redüktaz) bir mutasyon, sistatyonin- $\beta$ -sentazdaki bir mutasyon veya bu enzimin kofaktör olarak

kullandığı vitamin B6'nın eksik oluşu da serumda homosistein düzeylerini yükselten nedenler arasındadır (24) (Şekil-6).

Hiperhomosisteinemi yapan nedenler Tablo-2'de sıralanmıştır (77). Vitamin B12 eksikliği nedeniyle laboratuvara yansıyan değişiklikler arasında serum Hcy düzeyleri değerlidir. Epidemiyolojik bulgular, homosisteinin atheroskleroz, tromboz ve hipertansiyon için bağımsız bir risk faktörü olabileceğini göstermektedir (77).

**Tablo-2:** Hiperhomosisteinemi nedenleri (77).

<b>Genetik</b> Sistasyonin $\beta$ sentaz yetersizliği MTHFR mutasyonu Metiyonin sentaz yetersizliği (seyrek) Metilentetrahidrofolat homosist(e)in metiltransferaz yetersizliği (seyrek)
<b>Çevresel</b> Fizyolojik (erkek cinsiyet, yaş, menopoz) Yaşam şekli faktörleri (kahve, sigara) Vitamin eksikliği Folik Asit Kobalamin (vitamin B12) Piridoksin (vitamin B6) Sistemik bozukluklar Karaciğer ve böbrek bozukluğu Sistemik lupus eritematozis Psoriyazis Hipotiroidizm Maliniteler: meme, over, pankreas, akut lenfoblastik lösemi Solid organ nakilleri
<b>İlaçlar</b> Metotreksat, fenitoin, azotiyoprin, teofilin, metformin, tiyazid diüretikleri, kolestipol, nikotinik asid, oral kontraseptifler

## **2.8. Vitamin B12 Eksikliği, Hiperhomosisteinemi ve Oksidatif Hasar**

Oksidatif stres, genel olarak prooksidan ve antioksidanlar arasındaki dengenin prooksidanlar lehine bozulduğu patolojik bir tablodur. Normal koşullar altında süperoksit radikallerinin (SOR) fizyolojik seviyesi/reaktivitesi

detoksifikasyon mekanizmaları ile hassas bir şekilde dengededir ve bu dengede özellikle antioksidan savunma mekanizmaları önemli rol oynar.

Vitamin B12 eksikliği ile oksidatif stres tablolarının ilişkilendirildiği çalışmalar mevcuttur (77, 78). Burada kobalamin eksikliğine bağlı artan Hcy düzeyleri sorumlu tutulmaktadır. Hcy'nin, ortamda bakır veya seruloplazmin bulunduğu hidrojen peroksit oluşturup oksidasyon yapabileceği (79) ve Hcy'nin düşük yoğunluklu lipoproteini (LDL) okside ettiği ve değişikliğe uğrayan LDL'nin hücre içine alınmasına yol açabileceği öne sürülmektedir (80). Hcy'nin, aynı zamanda süperoksit radikallerinin oluşumuna neden olduğu da öne sürülmüştür. Ek olarak, peroksid ve SOR'nin artması durumunda Hcy'nin, glutatyon peroksidazı da içeren hücre içi antioksidan enzimleri inhibe ettiği de gösterilmiştir. Bir endojen antioksidan olan hücre içi glutatyon da Hcy tarafından belirgin olarak azaltılmaktadır. Antioksidan savunmadaki bu gerileme, hücrenin oksidan radikalleri nötralize etme yeteneğini azaltmaktadır (81,82). Sonuç olarak, vitamin B12 eksikliği sonucunda gelişen hiperhomosisteineminin oksidatif hasar riskini arttıracakları öngörülmektedir.

Kronik vitamin B12 düşüklüğü (örneğin, uzamış yetersiz alım, bağırsaklarda malabsorbsiyon), negatif bir vitamin dengesi durumu ile sonuçlanır. Bu düşüş durumu eğer yıllarca sürerse klinik belirtiler oluşur. Vitamin B12 eksikliğinin erken tanısı çok önemlidir. Bu bozukluğun gizli kalabilme özelliğinden dolayı, geri dönüşü olmayan nöronal hasarlanmayla sonuçlanma ihtimali vardır (83). Basit tanısal yaklaşımlar, bu gizli kalan vitamin B12 eksikliğinin tanısı için kullanışlı olmayabilir (16, 43, 78, 84). Serum toplam vitamin B12 konsantrasyonlarındaki düşüş sıklıkla tespit edilen ilk değişikliktir ancak gizli kalmış bir fonksiyonel kobalamin eksikliği tanısı için güvenilir değildir (8, 78, 85). Diğer yandan, yükselmiş metil malonik asit (MMA) ve toplam homosistein konsantrasyonları ise vitamin B12 eksikliğinin tanısı için daha duyarlı metabolik belirteçlerdir (86, 87). Bununla birlikte, MMA ve Hcy konsantrasyonları renal yetmezlikte de artabilmektedir (8, 84, 87), ayrıca yükselmiş Hcy düzeyleri, folat ve vitamin B6 eksikliklerinin bir yansıması da olabilir (8, 87). Plazma kobalaminlerinin aktif kısmı bölüm 1.2.3.'de anlatıldığı gibi holotranskobalamindir. Son zamanlarda bu

fraksiyondaki değişikliklerin aktif kobalamin fraksiyonunu daha iyi yansıtacağı bildirilmektedir (16–23, 88–90).

Literatürde kobalamin durumunun değerlendirilmesinde HoloTC ölçümünün değerini vurgulayan ve bu vitaminin metabolizmasında önemli yere sahip olan Hcy ve Folik asit ile B12 vitamini ve HoloTC ölçümlerinin ilişkisini bir arada değerlendiren çalışmalar olduğu halde, bu parametreler arasındaki ilişkiyi oksidatif hasar belirteçleri ile birlikte değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile farklı düzeylerde vitamin B12 konsantrasyonuna sahip bireylerde HoloTC düzeylerinin Hcy ve folik asit düzeyleri ile ilişkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, kobalamin eksikliğinde hiperhomosisteinemiye bağlı olarak arttığı bildirilen oksidatif hasar ile kobalamin ve HoloTC düzeyleri arasında bir ilişki olup olmadığının araştırılması da planlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### 1. Gereç

#### 1.1. Olgular

Bu çalışmaya Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi poliklinikleri tarafından takip ve tedavisi yapılan 400 olgu alındı. Olgular, Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama Merkezi Merkez Biyokimya Laboratuvarı'na B12 vitamini ve folik asit düzeyi ölçümü için başvuran hastalar arasından seçildi. Bu çalışma için Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alındı (Ek 1). Tüm hastalara, çalışma ile ilgili bilgi verilerek, çalışmanın içerik, amacı ve katılımı gibi konuları açıklayan hasta onam formları dolduruldu ve olurları alındı.

#### 1.2. Vaka Gruplarının Oluşturulması

Dört yüz kişilik vaka grubu çalışmanın yapıldığı dönemde Uludağ Üniversitesi Biyokimya Merkez Laboratuvarı'nda B12 vitamini için kullanılan referans aralıklarına göre sınıflandırıldı. Gönüllüler B12 vitamin düzeylerine göre vitamin B12 eksikliği kesin olan vakalar (Grup 1), vitamin B12 eksikliği şüpheli olan vakalar (Grup 2) ve vitamin B12 eksikliği bulunmayan–normal vakalar (Grup 3) olarak 3 gruba ayrıldı.

Birinci vaka grubu vitamin B12 düzeyi 193 pg/ml altında olan hastalar olup 168 kişi (tüm vakaların %42'si), ikinci vaka grubu (Grup 2) vitamin B12 düzeyi 193–300 pg/ml olan hastalar olup 100 kişi (tüm vakaların %25'i) ve üçüncü vaka grubu (Grup 3) vitamin B12 düzeyi 300 pg/ml üstünde olan hastalar olup 132 kişiden (tüm vakaların %33'ü) oluştu.

#### 1.3. Örnek Toplanması

Kan örnekleri, normal poliklinik muayenesi için başvuran hastaların muayeneleri sonrası bir gecelik açlığı takiben alındı. Kan örnekleri, bir kuru tüpe, 0.18 x 40 mm'lik iğne yardımı ile (Vacutainer, İngiltere) ön kol antekübital bölgedeki venlerden alındı. 1500 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Aynı gün ilgili poliklinikler tarafından istenilen

biyokimyasal parametreler çalışıldıktan sonra artan serum örnekleri, holotranskobalamin ölçümü için 500 µl, MDA ölçümü için 250 µl, homosistein ölçümü için 500 µl ve kalanı yedek serum olarak ayrılarak –80°C’de derin dondurucuda depolandı. Ertesi gün sonuç almak için gelen hastalara çalışmanın konusu anlatıldı ve atılacak olan artmış serum örneklerinde çalışma yapılabilmesi için Uludağ Üniversitesi Sağlık Kuruluşları Aydınlatılmış Hasta Onam Formu dolduruldu ve olurları alındı. Oluru alınamayan hastaların serum örnekleri çalışma için kullanılmayarak, tıbbi atık olarak değerlendirildi.

#### **1.4. Araç ve Gereçler**

- a. Yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) cihazı, “Shimadzu LC–10AT” (Japonya)
- b. Otoanalizör, “AxSYM, Abbott ” (A.B.D)
- c. Otoanalizör, “İmmulite 2500, Siemens” (A.B.D)
- d. Santrifüj, "Sanyo Mistral 2000 R" (İngiltere)
- e. Santrifüj, "Janetzki T 32" (Almanya)
- f. Karıştırıcı (vorteks), "Heidolph" (Almanya)
- g. Otomatik pipet (20 –200 µL), "Eppendorf" (Almanya)
- h. Otomatik pipet (200–1000µL), "Eppendorf" (Almanya)
- i. Derin dondurucu (–80° C), "Sanyo" (Japonya)
- j. Buzdolabı, “Arçelik” (Türkiye)
- k. Hassas tartı, “OHAUS analytical plus“ (İsviçre)
- l. Tartı, “Mettler PJ 3000“ (İsviçre)

#### **1.5.Ticari Kitler**

- a. Vitamin B12, Siemens, (A.B.D)
- b. Holotranskobalamin, Abbott, (A.B.D)
- c. Folik Asit, Siemens, (A.B.D)
- d. Homosistein, Siemens, (A.B.D)

#### **1.6. Kimyasal Malzemeler**

- a. Fosforik asit, “Aldrich” (Almanya) Kat no: 215104
- b. 2–Tiyobarbitürik asit (>% 98), "Sigma" (A.B.D.) Kat.no : T 5500
- c. Sodyum hidroksit, "Merck" (Almanya) Kat.no : 6462



- d. Metanol (HPLC grade), "BDH" (Almanya) Kat.no :15250
- e. di-Sodyum hidrojen fosfat, "Merck" (Almanya) Kat.no: 6576
- f. Potasyum dihidrojen fosfat, "Merck" (Almanya) Kat.no : 4871
- g. 1,1',3,3' Tetrametoksipropan, "Fluka" (İsviçre) Kat.no : 87670
- h. 8. CC 250/4 Nucleosil 100–10 C 18 HPLC kolonu "Macherel–Nagel" (Almanya) Kat no: 721689.40

## 2. Yöntemler

### 2.1. Serumda Vitamin B12 Düzeyi Ölçümü

Hastalardan alınan serum örneklerinde Vitamin B12 miktarının değerlendirilmesi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Merkez Laboratuvarı'nda otoanalizör ile (Immulate 2500, Siemens, A.B.D.) yapıldı. Eksi 80°C'de saklanan hasta serumları oda ısısında çözüldükten sonra çalışıldı.

#### Prensip:

Vitamin B12, Immulate 2500 otoanalizör ile alkali denatürasyon işlemini de içeren, yarışmalı kemilüminesans enzim immünassay ile ölçüldü.

#### Deneyin yapılışı:

Deney, her biri 15 dakika olan 3 inkübasyon periyodu içerir. Birinci inkübasyon endojen bağlı proteinlerin alkali denatürasyonu, ikinci ve üçüncü inkübasyonlar ise immün reaksiyon aşamalarını içerir.

Birinci inkübasyonda, hasta serum örneği dithiothreitol (DTT) ve sodyum hidroksit/potasyum siyanür (NaOH/KCN) solüsyonları ile boncuk içermeyen bir reaksiyon tüpü içinde işleme sokulur. 15 dakikalık bir inkübasyondan sonra işlenmiş örnek, vitamin B12 ile kaplanmış polistren boncuk ve domuz (hog) intrinsek faktörü (HIF) içeren ikinci bir reaksiyon tüpüne aktarılır. İlk 15 dakikalık inkübasyon süresince, bağlı olduğu endojen proteinlerden serbestleşen vitamin B12'ler, bu ikinci inkübasyon süresi boyunca, boncuk üzerindeki hareketsiz olan vitamin B12'ler ile HIF'e bağlanabilmek için yarışır. Son 15 dakikalık inkübasyonda ise Alkalen Fosfataz ile işaretlenmiş anti-hog intrinsek faktör antikoları, boncuk üzerini

kaplayan ve bağlı durumdaki vitamin B12'lerin bağlandığı HIF'e bağlanırlar. Santrifüjlü yıkama ile bağlanmamış enzim konjugatı ortamdan uzaklaştırılır. Daha sonra ortama Alkalen Fosfataz'ın reaksiyona girdiğı kemilüminesan substrat eklenir. Reaksiyon sonrası ışımaya meydana gelir ve ışımaya otoanalizör içindeki dedektör ile tespit edilir. Birim zamandaki ışımaya miktarından yola çıkılarak vitamin B12 konsantrasyonu pg/ml cinsinden hesaplanır.

## **2.2. Serum Holotranskobalamin Düzeyi Ölçümü**

Hastalardan alınan serum örneklerinde Holotranskobalamin miktarının değerlendirilmesi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Merkez Laboratuvarı'nda otoanalizör ile (AxSYM Systems, Abbott, A.B.D.) yapıldı.

Eksi 80 °C'de saklanan hasta serumları oda ısısında çözüldükten sonra çalışıldı.

### Prensip:

Holotranskobalamin, AxSYM otoanalizör cihazı ile Mikropartikül Enzim İmmünassay (MEIA) yöntemi kullanılan bir deney ile ölçüldü.

### Deneyin Yapılışı :

AxSYM otoanalizöründe HoloTC ayıraçları ve hasta serum örnekleri yöntemde tarif edildiğı gibi birbirini izleyen aşamalar ile sırayla pipetlenir. Sulandırılmış serum ve Anti-HoloTC monoklonal antikoları ile kaplanmış mikropartiküller bir araya getirilerek bir reaksiyon karışımı elde edilir. Hasta serumu içindeki insan HoloTC antijenleri, mikropartiküller üzerinde bağlı bulunan antikolarla birleşir ve mikropartiküller üzerinde antijen-antikor kompleksleri oluşur. Anti-TC antikor-Alkalen Fosfataz konjugatı reaksiyon kabında ikinci bir kuyucukta bu karışım üzerine pipetlenir. Reaksiyon kabı üzerinde üçüncü bir kuyucuğa HoloTC yıkama tamponu, dördüncü bir kuyucuğa ise Matrix Cell yıkama solüsyonu pipetlenir. İşlenmiş örnek daha sonra hızlı bir şekilde işlem merkezine aktarılır. Mikropartiküller ve bağlı antijen-antikor kompleksleri içeren reaksiyon karışımının bir kısmı Matrix Cell kuyucuğuna aktarılır. Mikropartiküller cam fiber matrikse geri dönüşümsüz olarak bağlanırlar. Anti-TC antikoları- Alkalen Fosfataz konjugatı Matrix Cell üzerine eklenir ve bu konjugat antijen-antikor kompleksleri ile bağlanır. Matrix Cell yıkanır ve mikropartiküller ile bağlanmamış konjugatlar ortamdan

uzaklaştırılır. 4–Metilumbelliferil Fosfat içeren substrat Matrix Cell'e eklenir. Alkalen Fosfataz işaretli konjugat, substrattan fosfat gruplarının ayrılışını sağlar ve floresan bir ürün verir. Floresan ürün MEIA optik okuyucusu tarafından ölçülür. Serum HoloTC düzeyi pmol/L cinsinden hesaplanır.

### **2.3. Serum Homosistein Düzeyi Ölçümü**

Hastalardan alınan serum örneklerinde Homosistein (Hcy) miktarının değerlendirilmesi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Merkez Laboratuvarı'nda otoanalizör ile (İmmulite 2500, Siemens, A.B.D.) yapıldı. Eksi 80 °C'de saklanan hasta serumları oda ısısında çözüldükten sonra çalışıldı.

#### Prensip:

Homosistein, İmmulite 2500 otoanalizör cihazı ile Mikropartikül Enzim İmmünassay (MEIA) yöntemi kullanılan bir deney ile ölçüldü.

#### Deneyin yapılışı:

Deney iki adet 30'ar dakikalık inkübasyon dönemi içerir. Birinci inkübasyonda, bağlı homosisteinin serbestleşmesi ve S–adenozil–L–homosisteine (SAH) dönüşümü gerçekleşir. İkinci inkübasyonda immunoreaksiyon oluşur.

İmmulite otoanalizörü, hasta serumunu önce, S–adenozil–L–homosistein hidrolaz ve dithiothreitol (DTT) solüsyonu ile boncuk içermeyen bir reaksiyon tüpü içinde ön işlemden geçirir. 30 dakikalık inkübasyondan sonra, işlenmiş örnek SAH–kaplı polistren boncuk ve SAH'ye özel Alkalen Fosfataz işaretli antikolar içeren ikinci bir reaksiyon tüpüne aktarılır. 30 dakikalık inkübasyon süresince, ön işlem sırasında serbestleşmiş SAH ile boncuk üzerine bağlı SAH'ler, Alkalen Fosfataz işaretli anti–SAH antikolarına bağlanmak için yarışır.

Santrifüjlü yıkama ile bağlanmamış enzim konjugatı ortamdan uzaklaştırılır. Daha sonra ortama Alkalen Fosfataz'ın reaksiyona girdiği kemilüminesan substrat eklenir. Reaksiyon sonrası ışımaya meydana gelir ve ışımaya otoanalizör içindeki dedektör ile tespit edilir. Birim zamandaki ışımaya miktarından yola çıkılarak homosistein konsantrasyonu µmol/L cinsinden hesaplanır.

## 2.4. Serum Folik Asit Ölçümü

Hastalardan alınan serum örneklerinde Folik Asit miktarının değerlendirilmesi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Merkez Laboratuvarı'nda otoanalizör ile (İmmulite 2500, Siemens, A.B.D.) yapıldı. Eksi 80°C'de saklanan hasta serumları oda ısısında çözüldükten sonra çalışıldı.

### Prensip:

Folik Asit, İmmulite 2500 otoanalizör ile alkali denatürasyon işlemini de içeren, yarışmalı kemilüminesans enzim immünassay ile ölçüldü.

### Deneyin yapılışı:

Deney, 4 inkübasyon dönemi içerir. Birinci ve ikinci inkübasyon dönemleri 15'er dakika olup endojen proteinlerin alkali denatürasyonunu içerir. Üçüncü inkübasyon 30 dakika ve dördüncü inkübasyon ise 15 dakika olup protein bağlanması ve immünoreaksiyon aşamalarını içerir. Birinci inkübasyon süresince hasta serum örneği, ligand işaretli folik asit ve dithiothreitol (DTT) ile boncuk içermeyen bir reaksiyon tüpü içinde işlemde geçirilir. Sonra, ikinci inkübasyon süresince içerik sodyum hidroksit/potasyum siyanid (NaOH/KCN) ile işlenir. İşlenmiş örnek, mürin (fare) anti-folat bağlayıcı protein antikolları ile kaplı polistren boncuk ve folat bağlayıcı protein (FBP) içeren ikinci bir reaksiyon tüpüne aktarılır. Üçüncü 30 dakikalık inkübasyon süresince hasta örneğindeki bağlı olduğu proteinlerden serbestleşen folik asitler, ligand işaretli folik asitler ile FBP'lere bağlanabilmek için yarışır. Daha sonra boncuk yıkanır ve Alkalen Fosfataz işaretli anti-ligand ortama eklenir. Son 15 dakikalık inkübasyon boyunca Alkalen Fosfataz işaretli anti-ligand, ilk inkübasyonda boncuk üzerine bağlanmış olan ligand işaretli folata bağlanır.

Santrifüjlü yıkama ile bağlanmamış enzim konjugatı ortamdan uzaklaştırılır. Daha sonra ortama Alkalen Fosfataz'ın reaksiyona girdiği kemilüminesans substrat eklenir. Reaksiyon sonrası ışığa meydana gelir ve ışığa otoanalizör içindeki dedektör ile tespit edilir. Birim zamandaki ışığa miktarından yola çıkılarak folik asit konsantrasyonu ng/ml cinsinden hesaplanır.

## 2.5. Serumda Malondialdehit Düzeyi Ölçümü

Serum Malondialdehit (MDA) düzeyi ölçümü Young ve ark.'nın (91) tanımladığı yonteme göre yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı ile yapıldı.

### Yöntem:

Tiyobarbiturik asit ile lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın asidik ortamda yüksek ısının etkisi ile pembe renkli kompleks oluşturması prensibine dayanır.

Serum MDA analizinde aşağıdaki özellikler kullanıldı.

Mobil faz bileşimi: %50 metanol (HPLC grade)

%50 25 mM fosfat tamponu (pH:6.5)

Mobil faz akış hızı: 0.8 mL/dk

Kolon: 10 cm uzunluğunda, 10 mm çapında C18 kolon kullanıldı.

Dalga boyu: 532 nm

### Deneyin yapılışı:

Kör, numune ve standart tüplerinin her birine 500 µL 0.36 M fosforik asit ( $H_3PO_4$ ), 500 µL 0.44 M TBA, 900 µL distile su ve 50 µL sırasıyla, distile su, serum veya standart eklendi. Reaksiyon karışımı 100°C'de 1 saat inkübe edildi. Su banyosundan çıkarıldıktan sonra 10 dk 4°C'de soğutuldu. Bu reaksiyon karışımından 400 µL alınarak üzerine 720 µL metanol (HPLC grade) ve 80 µL 1 M sodyum hidroksit eklendi. 1500 xg'de 10 dk santrifüj edildikten sonra metanol fazından 50 µL alınarak HPLC'ye enjekte edildi.

### Hesaplama:

0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 nmol/mL'lik konsantrasyonlarda hazırlanan 1,1',3,3'-tetrametoksipropan standartları ile çalışılarak standart eğri grafiği çizildi. Yaklaşık 4. dakikada görülen MDA pikinin alanına karşılık gelen değer standart eğri grafiğinden bulunarak konsantrasyon hesaplandı ve serum MDA düzeyi nmol/mL şeklinde ifade edildi.

## 2.6. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Sonuçların istatistiksel değerlendirmesinde "SPSS for Windows 13.0" (Chicago, IL) paket programı kullanılmıştır. Çalışmada sürekli değer alan

değişkenler ortalama, standart sapma, değişim aralığı (range), min–max değerleriyle birlikte verilmiştir.

Sürekli değişkenlerden normal dağılım göstermeyenler değişkenlerin grup karşılaştırmasında Kruskal–Wallis testi kullanılmıştır. Anlamlı farklılık bulunan değişkenler iki grup arası karşılaştırmaları Mann–Whitney U testiyle yapılmıştır.

Sürekli değer alan non–parametrik değişkenlerin aralarındaki korelasyonuna bakarken korelasyon analizinde spearman korelasyon katsayısı kullanılmıştır. Çalışmada %95 ( $p<0.05$ ) anlamlılık seviyesi benimsenmiştir.

## BULGULAR

### 1. Olguların Özellikleri

Çalışmaya katılan 400 hastanın yaş ortalaması  $42 \pm 17.4$  idi. Olguların %75.25'i (n=301, yaş ortalaması  $41.4 \pm 16.1$ ) kadın ve % 24.75'i (n=99, yaş ortalaması  $43.7 \pm 20.9$ ) erkek hastaydı. Olguların minimum yaşı 2, maksimum yaşı 83 idi (Tablo-3).

**Tablo-3:** Olguların cinsiyet ve yaşa göre dağılımı.

Parametreler	Kadın	Erkek	Toplam
Vaka sayısı (n)	301	99	400
Vaka sayısı (%)	75.25	24.75	100
Yaş ort.±SS (yıl)	$41.4 \pm 16.1$	$43.7 \pm 20.9$	$42 \pm 17.4$

Yaş ort.±SS: Yaş ortalaması±Standart Sapma.

### 2. Serum Vitamin B12, Holotranskobalamin, Homosistein, Folik Asit ve Malondialdehit Düzeylerinin Ortalamalarının 3 Vaka Grubunda Karşılaştırılması

Tüm vaka gruplarının serum vitamin B12, holotranskobalamin, homosistein, folik asit ve malondialdehit düzeyleri ölçüldü. Elde edilen verilerin ortalamaları ve standart sapmaları Tablo-4'de verilmiştir.

**Tablo-4:** Gruplar arasında vitamin B12, folik asit, MDA, HoloTC ve Hcy düzeylerinin ortalamalarının karşılaştırılması (Değerler ortalama değer±standart sapmadır).

Parametreler	Grup 1 (n=168)	Grup 2 (n=100)	Grup 3 (n=132)	p*
Vitamin B12 (pg/ml)	166,8±14,5	237,5±34,2	488,0±166,8	<0.001
HoloTC (pmol/L)	18,62±7,54	30,03±15,44	50,07±25,88	<0.001
Hcy (µmol/L)	12,82 ±7,89	11,40±8,10	9,61±4,86	=0.001
Folik Asit (ng/ml)	7,63±3,59	8,10±4,61	9,98±5,84	<0.001
MDA (nmol/ml)	1,09±0,33	1,07±0,37	0,99±0,26	<0.05

\*, Kruskal Wallis testi ile gruplar arasında fark  
n: vaka sayısı  
HoloTC: Holotranskobalamin  
Hcy: Homosistein  
MDA: Malondialdehit

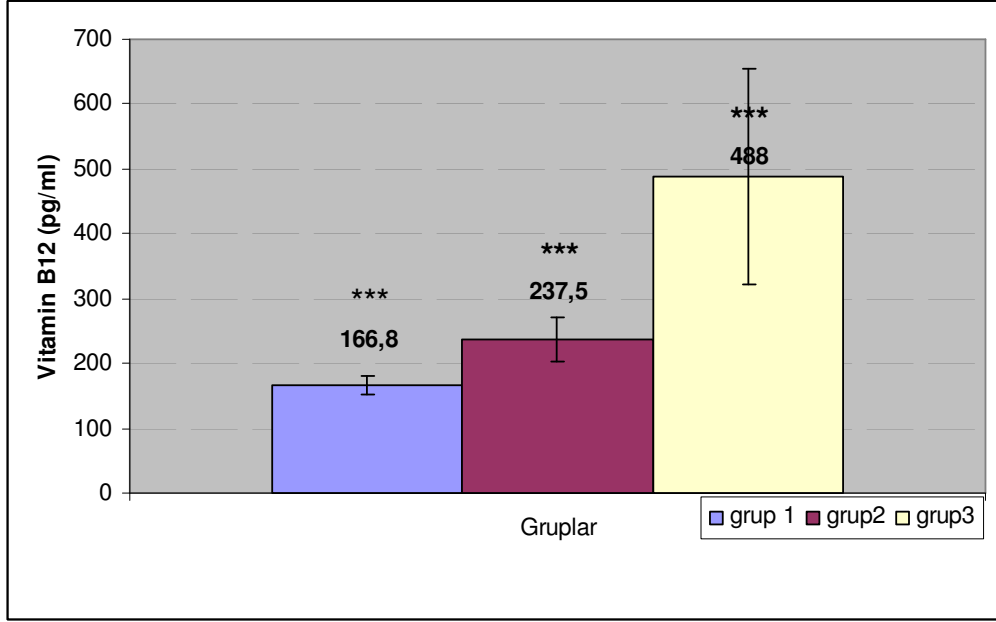
Normal dağılım göstermeyen veriler için gruplar arasındaki farkın karşılaştırmasında Kruskal Wallis testi kullanıldı. Vaka grupları ve ölçülen 5 parametrenin (vitamin B12, HoloTC, Hcy, folik asit ve MDA) değerleri Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldı, buna göre gruplar arasında vitamin B12 düzeyleri (p<0,001), HoloTC düzeyleri (p<0,001), Hcy düzeyleri (p=0,001), folik asit düzeyleri (p<0,001) ve MDA düzeyleri için (p<0.05) anlamlı fark olduğu belirlendi. Her parametrenin 3 gruptaki değerlerinin Mann Witney U testi ile karşılaştırması sonucunda Şekil-7-12'de gösterilen ve aşağıda ayrıntıları açıklanan değişimler saptanmıştır.

### 2.1. Vitamin B12

Vitamin B12 düzeylerinin 3 vaka grubundaki dağılımı aşağıda verilmiştir (Şekil-7). Şekilde görüldüğü gibi vitamin B12 düzeyi düşük olan 1. grubun ortalaması 166,8±14,5 pg/ml iken, 2. grubun ortalaması 237,5±34,2



pg/ml ve vitamin B12 düzeyi normal olan 3. grubun ortalaması  $488,0 \pm 166,8$  pg/ml'dir.

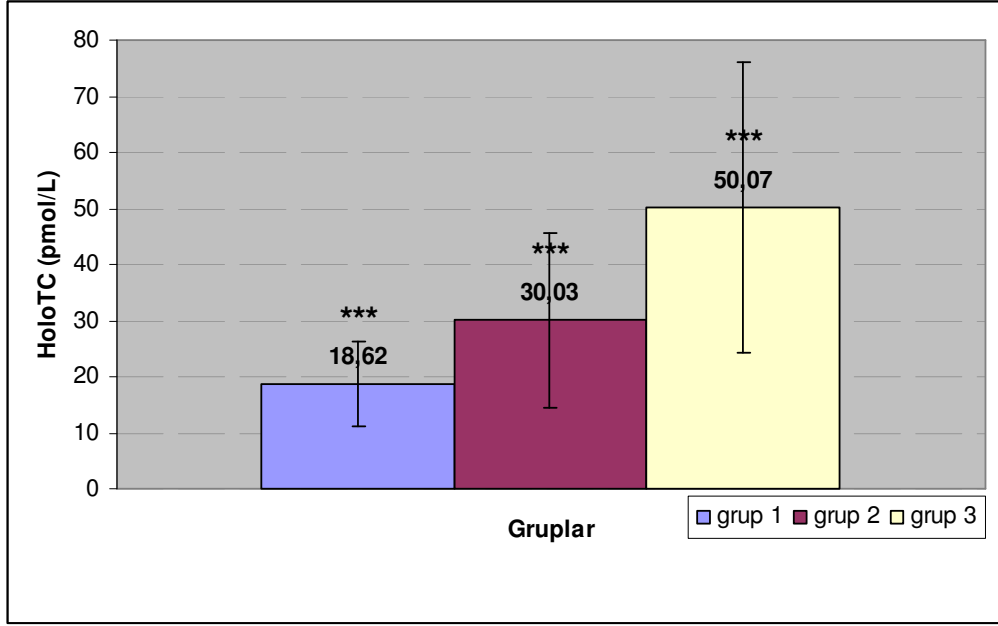


**Şekil-7:** Vitamin B12 düzeylerinin 3 vaka grubu arasındaki karşılaştırması. \*\*\*, Mann-Whitney U testi ile diğer 2 gruptan anlamlı olarak farklı,  $p < 0,001$ .

Gruplar arasındaki farkların anlamlı olup olmadığının araştırılması Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Mann-Whitney U testi ile, vaka grupları ikili gruplar şeklinde karşılaştırıldı. Buna göre tüm gruplar vitamin B12 düzeyleri açısından istatistiksel olarak birbirinden anlamlı farklı bulundu.

## 2.2. Holotranskobalamin

HoloTC düzeylerinin 3 vaka grubu arasındaki dağılımı aşağıda verilmiştir (Şekil-8). Şekilde görüldüğü gibi 1. grubun ortalaması  $18,62 \pm 7,54$  pmol/L, 2. grubun ortalaması  $30,03 \pm 15,44$  pmol/L ve 3. grubun ortalaması  $50,07 \pm 25,88$  pmol/L'dir.



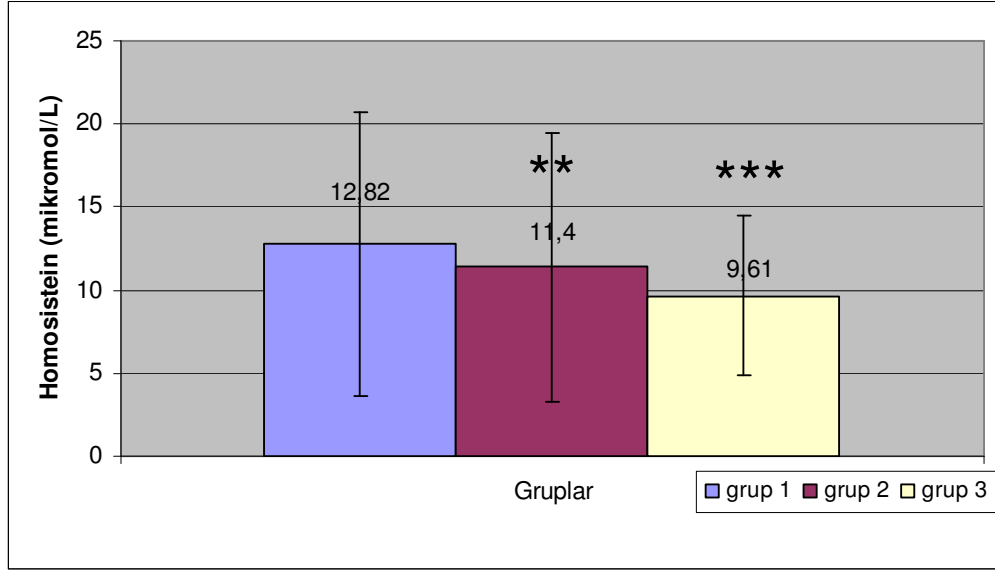
**Şekil-8:** HoloTC düzeylerinin 3 vaka grubu arasındaki karşılaştırması.  
 \*\*\*, Mann-Whitney U testi ile diğer 2 gruptan anlamlı olarak farklı,  $p < 0,001$ .

Mann-Whitney U testi ile HoloTC düzeyleri için tüm gruplar karşılaştırıldı. Buna göre tüm gruplar HoloTC düzeyleri açısından birbirinden istatistiksel olarak anlamlı farklı bulundu.

### 2.3. Homosistein

Hcy düzeylerinin 3 vaka grubundaki dağılımı aşağıda verilmiştir (Şekil-9). Şekilde görüldüğü gibi 1. grubun ortalaması  $12,82 \pm 7,89 \mu\text{mol/L}$  iken, 2. grubun ortalaması  $11,40 \pm 8,10 \mu\text{mol/L}$  ve vitamin B12 düzeyi normal olan 3. grubun ortalaması  $9,61 \pm 4,86 \mu\text{mol/L}$ 'dir.

Mann-Whitney U testi ile homosistein düzeylerinin grup 1'de grup 2 ve grup 3'e göre anlamlı olarak yüksek olduğu, (sırasıyla,  $p < 0,01$  ve  $p < 0,001$ ) saptanmıştır.

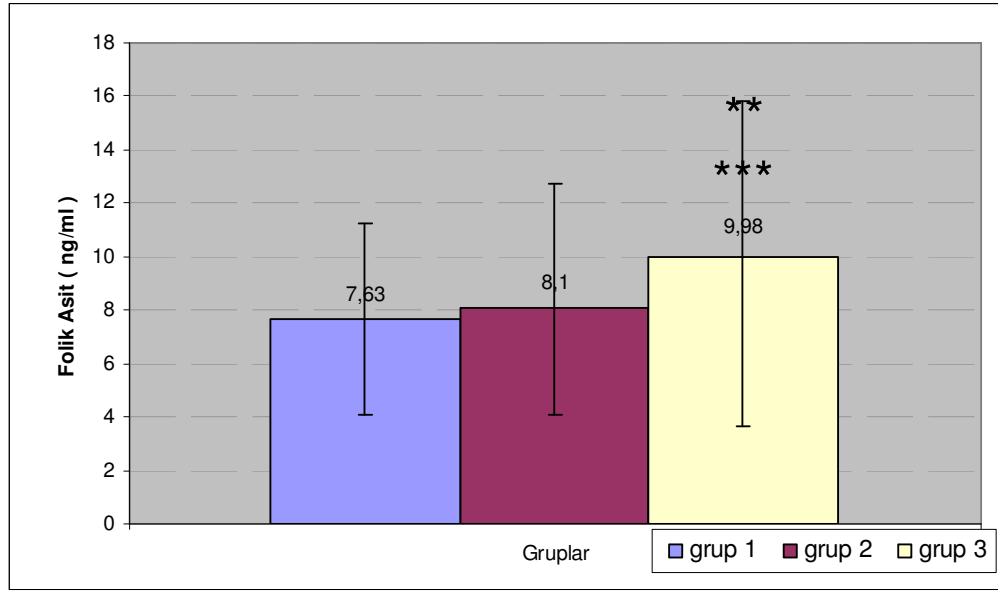


**Şekil-9:** Hcy'nin 3 vaka grubu arasındaki karşılaştırması. Mann-Whitney U testi ile,  
 \*\*, Grup 1'den anlamlı olarak farklı,  $p < 0,01$   
 \*\*\*, Grup 1'den anlamlı olarak farklı,  $p < 0,001$

#### 2.4. Folik Asit

Üç vaka grubundaki folik asit düzeylerinin dağılımı aşağıda verilmiştir (Şekil-10). Şekilde görüldüğü gibi 1. grubun ortalaması  $7,63 \pm 3,59$  ng/ml, 2. grubun ortalaması  $8,10 \pm 4,61$  ng/ml ve 3. grubun ortalaması  $9,98 \pm 5,84$  ng/ml'dir.

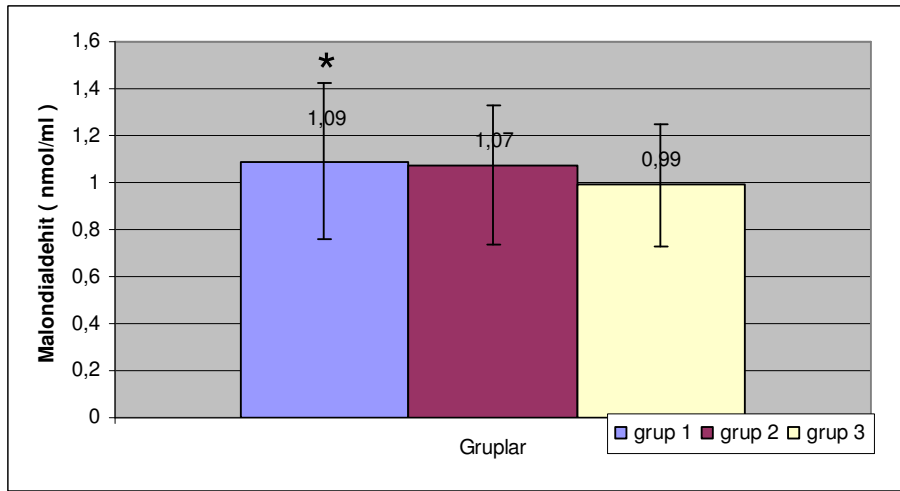
Mann-Whitney U testi ile 1. ve 2. gruptaki hastalar arasında serum folik asit düzeyleri için istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaz iken, 1. ve 2. gruptaki hastaların serum folik asit düzeylerinin, 3. gruptaki hastaların serum folik asit düzeylerine göre anlamlı olarak düşük olduğu bulundu.



**Şekil-10:** Folik asit düzeylerinin 3 vaka grubu arasındaki karşılaştırması. Mann-Whitney U testi ile,  
 \*\*, Grup 2'den anlamlı olarak farklı,  $p < 0,05$   
 \*\*\*, Grup 1'den anlamlı olarak farklı,  $p < 0,001$

## 2.5. Malondialdehit

Malondialdehit düzeylerinin 3 vaka grubu arasındaki dağılımı aşağıda verilmiştir (Şekil-11). Şekilde görüldüğü gibi vitamin B12 düzeyi düşük olan 1.grubun ortalaması  $1,09 \pm 0,33$  nmol/L iken, 2. grubun ortalaması  $1,07 \pm 0,37$  nmol/L ve vitamin B12 düzeyi normal olan 3.grubun ortalaması  $0,99 \pm 0,26$  nmol/L'dir.



**Şekil-11:** MDA düzeylerinin 3 vaka grubu arasındaki karşılaştırması Mann-Whitney U testi ile,  
 \*, Grup 3'ten anlamlı olarak farklı,  $p < 0,05$ .

### 3. Korelasyon İncelemeleri

Tüm vakalar (n=400) için serumda ölçülen tüm parametrelerin birbirleriyle olan korelasyonu nonparametrik Spearman'ın korelasyon katsayıları (r) hesaplanarak incelendi (Tablo-5). Yapılan tüm testlerde  $p<0,05$  düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (Tablo-5).

**Tablo-5:** Tüm vakalar için serumda ölçülen parametrelerin birbirleriyle olan korelasyonu.

n=400	Vitamin B12	HoloTC	Hcy	Folik asit	MDA
Vitamin B12	1	0,711***	-0,253***	0,163***	-0,121*
HoloTC	0,711***	1	-0,254***	0,167***	0,013
Hcy	-0,253***	-0,254***	1	-0,278***	0,107*
Folik asit	0,163***	0,167***	-0,278***	1	0,020
MDA	-0,121*	0,013	0,107*	0,020	1

n= vaka sayısı

\*,  $p<0,05$  düzeyinde anlamlı korelasyon

\*\* ,  $p< 0,01$  düzeyinde anlamlı korelasyon

\*\*\*,  $p<0.001$  düzeyinde anlamlı korelasyon

Tablo içindeki değerler Spearman'ın korelasyon katsayısı (r) dir.

Vitamin B12 düzeyleri ile HoloTC ve folik asit düzeyleri arasında pozitif ve istatistiksel olarak anlamlı korelasyon (sırasıyla,  $r=0,163$ ,  $p<0.001$  ve  $r=0,711$ ,  $p<0.001$ ), vitamin B12 düzeyleri ile Hcy ve MDA düzeyleri arasında negatif ve istatistiksel olarak anlamlı korelasyon (sırasıyla,  $r=-0,253$ ,  $p<0,001$  ve  $r=-0,121$ ,  $p<0,05$ ) bulundu.

HoloTC ile folik asit düzeyleri arasında pozitif ve istatistiksel olarak anlamlı korelasyon ( $r=0,167$ ,  $p<0,001$ ), HoloTC ve Hcy düzeyleri arasında negatif ve istatistiksel olarak anlamlı korelasyon ( $r=-0,254$ ,  $p<0.001$ ) bulundu. HoloTC ile MDA düzeyleri arasında anlamlı korelasyon yoktu.

Hcy düzeyleri folik asit düzeyleri ile negatif ve istatistiksel olarak anlamlı korelasyon ( $r=-0,278$ ,  $p<0.001$ ) gösterirken, MDA düzeyleri ile pozitif ve istatistiksel olarak anlamlı ilişkili ( $r=0,107$ ,  $p<0.05$ ) idi.

Folik asit ile MDA düzeyleri arasında anlamlı korelasyon yoktu.

#### 4. B12 Vitamini ve Holotranskobalamin Düzeylerine Göre Homosistein ve Folik Asit Düzeylerindeki Değişim

Total vitamin B12 ve HoloTC düzeylerini birlikte ölçmenin vitamin B12 durumunun değerlendirilmesindeki yararını incelemek için vaka grupları HoloTC için önerilen cutoff değerlerine dayanarak kendi içinde ikiye gruba ayrılarak 6 grup oluşturuldu. HoloTC için cutoff değeri 35 pmol/L olarak alındı (46,48,92–94). Buna göre:

Grup 1A: vitamin B12  $<193$  pg/ml ve HoloTC $<35$  pmol/L;

Grup1B: vitamin B12  $<193$  pg/ml ve HoloTC $>35$  pmol/L;

Grup 2A: vitamin B12  $=193-300$  pg/ml ve HoloTC $<35$  pmol/L;

Grup 2B: vitamin B12  $=193-300$  pg/ml ve HoloTC $>35$  pmol/L;

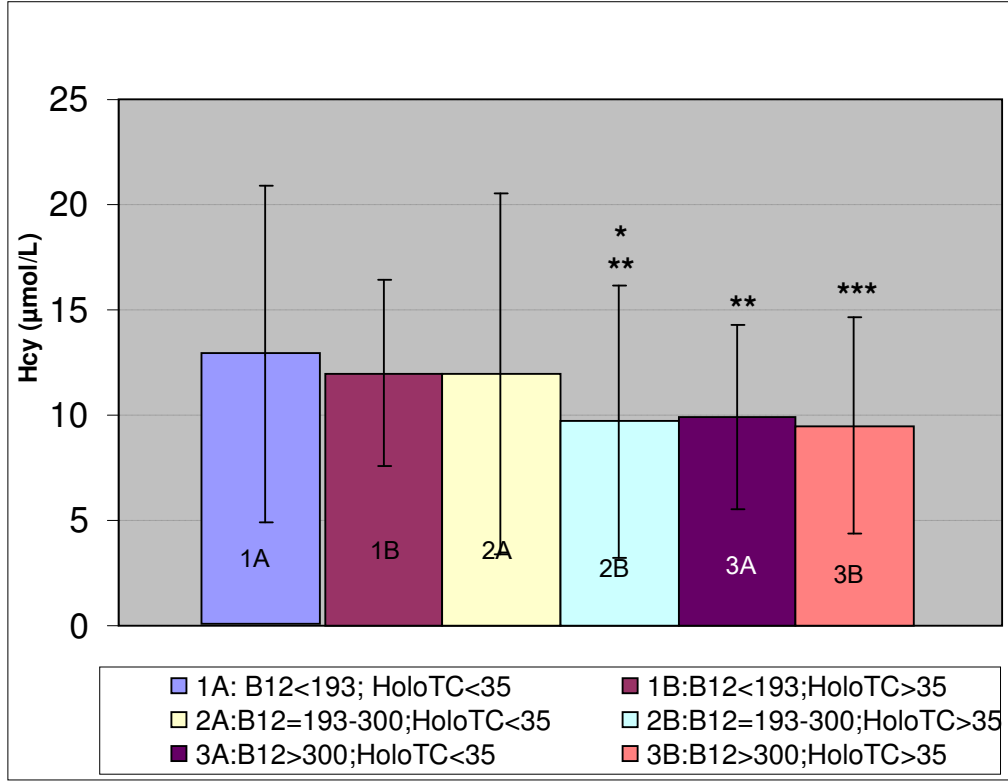
Grup 3A: vitamin B12  $>300$  pg/ml ve HoloTC $<35$  pmol/L;

Grup 3B: vitamin B12  $>300$  pg/ml ve HoloTC $>35$  pmol/L şeklinde tanımlandı (Tablo–6).

**Tablo–6:** Vit B12 ve HoloTC konsantrasyonlarına göre düzenlenmiş gruplar.

		B12 (pg/ml)		
		$<193$	193–300	$>300$
HoloTC (pmol/L)	$<35$	Grup 1A	Grup 2A	Grup 3A
	$>35$	Grup 1B	Grup 2B	Grup 3B

Bu 6 grubun Hcy düzeylerinin ortalamaları karşılaştırıldığında B12 vitamini düzeyi düşük olan Grup 1A ve 1B’de Hcy düzeyleri arasında fark yoktu (Şekil–12).

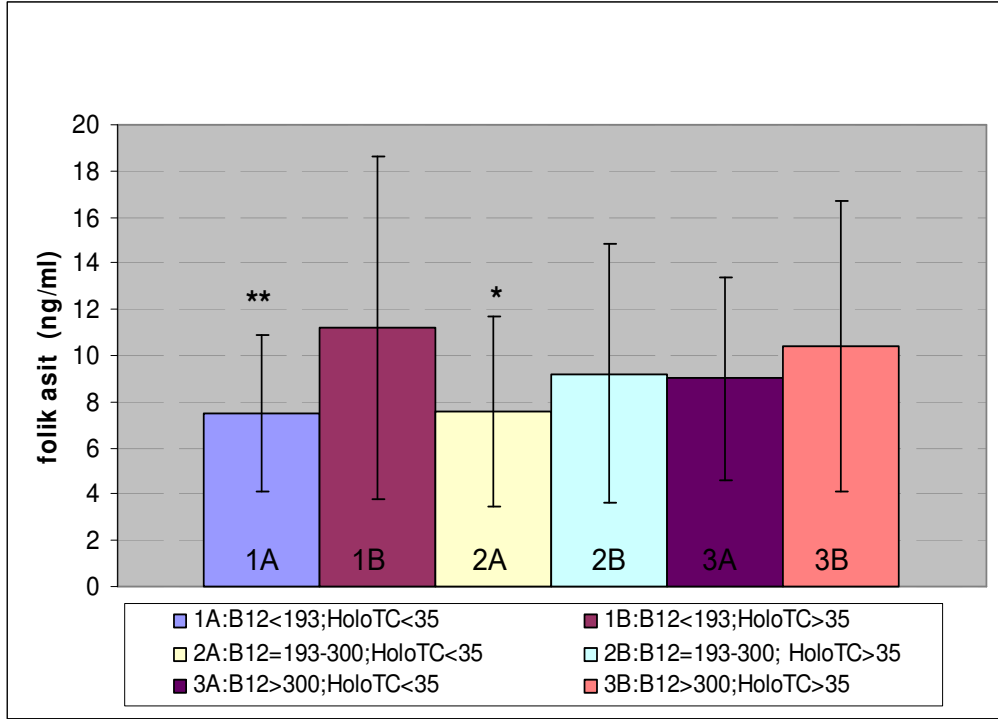


**Şekil-12:** Vitamin B12 ve HoloTC düzeylerine göre Hcy konsantrasyonundaki değişim. Mann-Whitney U testi ile,  
 \*, 2A'dan anlamlı farklı,  $p<0.05$   
 \*\*, 1A'dan anlamlı farklı,  $p<0.01$   
 \*\*\*, 1A'dan anlamlı farklı,  $p<0.001$

B12 vitamini düzeyi gri bölgede (Grup 2) olan vakalarda, HoloTC konsantrasyonu düşük olanları kapsayan Grup 2A'da Hcy düzeyleri, HoloTC düzeyleri yüksek olan Grup 2B 'deki vakalara göre anlamlı olarak yüksekti ( $p<0.05$ ). Vitamin B12 düzeyi gri bölgede olup HoloTC düzeyi yüksek olan Grup 2B'deki vakaların Hcy düzeyleri, Grup 1A'daki vakalarınkine göre anlamlı düşük bulundu ( $p<0.01$ ). B12 vitamini düzeyleri normal olan kişilerde Hcy düzeyleri, HoloTC düzeyi düşük olan Grup 3A'da ve HoloTC düzeyi yüksek olan Grup 3B'de, Grup 1A'ya göre anlamlı olarak düşük bulundu (sırasıyla  $p<0.01$  ve  $p<0.001$ ).

Total B12 vitamini ve HoloTC düzeyleri baz alınarak oluşturulan 6 gruptaki vakaların folik asit düzeylerinin ortalamaları karşılaştırıldığında ise hem vitamin B12 düzeyi hem HoloTC düzeyinin düşük olduğu Grup 1A' da ve

B12 vitamini düzeyinin şüpheli sınırlarda ve HoloTC düzeyinin düşük olduğu Grup 2A' da folik asit düzeyinin, hem B12 vitamini hem HoloTC' nin yüksek olduğu Grup 3B' ye göre istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu görüldü (sırasıyla,  $p < 0.01$  ve  $0.05$ ) (Şekil-13).



**Şekil-13:** Vitamin B12 ve HoloTC düzeylerine göre Folik asit konsantrasyonundaki değişim. Mann-Whitney U testi ile,  
\*, 3B'den anlamlı farklı,  $p < 0.05$   
\*\*, 3B'den anlamlı farklı,  $p < 0.01$



## TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma ile serum vitamin B12 düzeylerine göre oluşturulan vaka gruplarında, serum HoloTC, Hcy, folik asit ve MDA düzeyleri arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır. Kobalamin eksikliğinde hiperhomosisteinemiye bağlı olarak arttığı bildirilen oksidatif hasar, MDA düzeyleri ölçülerek belirlenmeye çalışılmıştır. Bunun yanında, HoloTC düzeyi ölçümünün vitamin B12 eksikliği için klinik tanıya yardımcı ve erken bir belirteç olup olmadığının incelenmesi de amaçlanmıştır.

Düşük serum vitamin B12 konsantrasyonları özellikle yaşlılar arasında yaygındır (95, 96) ve bunların %90'dan fazlası vitamin B12 eksikliğinin klinik belirtilerini göstermemektedir (97). Bununla birlikte bu kişiler ilerleyici nörolojik ve/veya hematolojik hastalık açısından risk altında olabilirler (97). Nörolojik belirtilerin vakaların %28'den daha fazlasında anemi olmasa bile ortaya çıktığı bildirilmiştir (66). Vitamin B12 eksikliğinin bu gizli kalabilme özelliğinden ve nörolojik belirtilerin geri dönüşsüz olmasından dolayı erken tanınması ve tedavi edilmesi önemlidir.

Vitamin B12 eksikliğinin tanısı için literatürde yer alan pek çok çalışma mevcut olup vitamin B12 eksikliği için farklı cutoff değerleri belirlenmiştir. Örneğin 2006 yılında yapılan bir çalışmada Miller ve ark. (98) vitamin B12 eksikliği için cutoff değerini <148 pmol/L olarak bildirmişlerdir. Yine 2006 yılında yayınlanan bir çalışmada Fakhrzadeh ve ark. (99) vitamin B12 eksikliği için cutoff değerini <185 pmol/L olarak almışlardır. Düşük serum B12 vitamini için cutoff değerini Clark ve ark. (100) <199 pmol/L olarak almışlardır. 2006 yılında yayınlanan bir makalede ise Morkbak ve ark. (101) bu değeri <200 pmol/L olarak belirlemişlerdir.

Bazı araştırmacılar ise vitamin B12 eksikliğini tanımlarken vitamin B12 düzeylerine göre hastaları, kesin eksiklik, şüpheli serum düzeyleri ve vitamin B12 eksikliği bulunmayan düzeyler olarak sınıflandırmıştır. Örneğin Snow (102) vitamin B12 ve folat eksikliğinin laboratuvar tanısı adlı makalesinde, ölçümde kullanılan tekniğe bağlı olarak serum kobalaminleri için normalin en

alt sınırının değişken olduğunu ve genellikle 148 pmol/L (200 pg/ml) değerinin kullanıldığını bildirmiştir. Aynı araştırmacı kobalamin eksikliği olan hastalar için 148 pmol/L (200 pg/ml) ve altındaki değerlerin eksikliği belirlemede %90–%95 duyarlı olduğunu, 148–221 pmol/L (200–300 pg/ml) değerlerinin %5–%10 duyarlı olduğunu ve 221 pmol/L (300 pg/ml) üzerindeki değerlerin %1'den daha az duyarlı olduğunu bildirmiştir. Hvas ve ark. (103) 125 pmol/L altındaki değerleri kesin vitamin B12 eksikliği olarak değerlendirmiş, 125–250 pmol/L değerlerini şüpheli bölge olarak belirlemiş ve 250 pmol/L üstündeki değerleri de vitamin B12 eksikliği bulunmayan değerler olarak belirlemişlerdir. Loikas ve ark. (104) yaptıkları bir araştırmada 150 pmol/L altındaki vitamin B12 düzeylerini kesin eksiklik, 150–250 pmol/L arasını şüpheli bölge ve 250 pmol/L üstünü ise normal vitamin B12 düzeyleri olarak belirlemişlerdir.

Yukarıda da anlatıldığı gibi vitamin B12 eksikliğini sınıflandırmada kesin değer aralıkları bulunmamaktadır. Her laboratuvar kendi toplumuna, ölçüm yaptığı cihazların kullandığı yöntem ve ticari kite göre referans aralığı belirlemede, bu ise referans değerlerinin farklı olmasına neden olmaktadır. Örneğin Gimsing ve ark. (105) ve Nexo ve ark. (106) vitamin B12 için referans değer aralığını 200–650 pmol/L olarak belirlemişlerdir. Herbert (85) ise vitamin B12 için referans değer aralığını 148–666 pmol/L (200–900 pg/ml) olarak bildirmiştir.

Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama Merkezi Merkez Biyokimya Laboratuvarı'nda B12 vitamini düzeyi için referans aralığı, 142–725 pmol/L (193–982 pg/ml) dir. Burada vitamin B12 düzeylerinin ölçüldüğü İmmulite 2000 ve 2500 otoanalizörleri için kit üreten firmanın (Siemens, A.B.D) önerdiği referans aralığı temel alınmıştır. Raporlanabilen değer aralığı ise 150–1000 pg/ml'dir. Buna göre hastasında vitamin B12 eksikliği düşünen bir klinisyen, raporlanmış hasta sonucunu gördüğünde 193 pg/ml (142 pmol/L) altında vitamin B12 konsantrasyonu olan olguları kesin vitamin B12 eksikliği olarak, 193 pg/ml (142 pmol/L) üstünde vitamin B12 konsantrasyonu olan olguları ise vitamin B12 eksikliği olmayan–normal vakalar olarak değerlendirmektedir. Ancak 193 pg/ml (142 pmol/L) üzerinde vitamin B12

düzeyi olan vakalar içerisinde de vitamin B12 eksikliği bulunanlar olabilir. Bu durumda gerçekte vitamin B12 eksikliği olan bazı vakalarda tanı konulamaması, atlanması ihtimali vardır. Bizim yaptığımız çalışmada 193 pg/ml (142 pmol/L) altında vitamin B12 konsantrasyonu olan olgular kesin vitamin B12 eksikliği olarak (1. grup), 193–300 pg/ml (142–221 pmol/L) arasında vitamin B12 düzeyi olanlar vitamin B12 eksikliği açısından şüpheli olgular olarak (2. grup) ve 300 pg/ml (221 pmol/L) üstünde vitamin B12 konsantrasyonu olanlar ise normal olgular (3. grup) olarak değerlendirilerek 3 vaka grubu oluşturulmuştur. Vitamin B12 düzeylerine göre vaka grupları oluşturmamızın nedeni ölçülen parametrelerin gruplar arasındaki fark ve anlamlılık ilişkilerini belirlemek ve özellikle 2. grupta ölçülen HoloTC düzeylerinin vitamin B12 eksikliğini belirlemede serum kobalamin düzeyleri ölçümünden daha erken ve güvenilir bir belirteç olup olmadığını incelemektir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre tüm gruplar vitamin B12 düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklı bulundu ( $p<0,001$ ) (Şekil-7). Tüm vakalar ( $n=400$ ) üzerinde yapılan korelasyon çalışmasında, vitamin B12 düzeyleri ile folik asit ve HoloTC düzeyleri arasında pozitif ve istatistiksel olarak anlamlı korelasyon ( $p<0.001$ ), vitamin B12 düzeyleri ile MDA ve Hcy düzeyleri arasında negatif ve istatistiksel olarak anlamlı korelasyon (sırasıyla,  $p<0,05$  ve  $p<0,001$ ) bulundu (Tablo-5). Bu bulgular Loikas ve ark.'nın (104) 2007 yılında yayınlanan 65 yaş ve üzeri 1048 kişi üzerindeki araştırmaları ile uyumludur. Söz konusu çalışmada, vitamin B12 konsantrasyonları HoloTC konsantrasyonları ile pozitif korele ( $r=0.78$ ,  $p<0.001$ ), Hcy konsantrasyonları ile negatif korele ( $r=-0.32$ ,  $p<0.001$ ) bulunmuştur.

Bilindiği gibi vitamin B12 eksikliği durumunda vitamin B12'ye bağımlı iki enzimatik reaksiyon bozulur ve MMA ve Hcy'in plazma düzeyleri yükselir (107–111). Alışılmış yöntemlerle serum kobalamin düzeylerinin ölçümünün özgüllük ve duyarlılığının az olması göz önünde bulundurularak, vitamin B12 durumunu değerlendirmek amacıyla Hcy ve MMA düzeylerinden yararlanılması önerilmektedir (90). Vitamin B12 metabolitleri için testlerin ortaya çıkışı ile bu vitaminlerin kolay ayırt edilemeyen eksikliklerinin saptanması kolaylaşmış ve daha erken tanı olanağı sağlanmıştır (107).

Duyarlı birer metabolik belirteç olan bu testlerin özgüllüğü tartışılabilir. Çünkü böbrek yetmezliği durumunda MMA ve Hcy' in plazma düzeyleri yükselir; yine yükselmiş Hcy düzeyleri folat veya vitamin B6 eksikliğinin bir yansıması da olabilmektedir (108–110, 112–115).

Biz bu çalışmada vitamin B12 eksikliği tanısı için yol gösterici olduğu bildirilen ve Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama Merkezi Merkez Biyokimya Laboratuvarı rutin parametreleri arasında yer alan Hcy düzeylerinden yararlandık. Vitamin B12 durumunun değerlendirilmesinde Hcy düzeylerinin ölçümünü kullanan ve literatürde yer alan çalışmalar mevcuttur (46, 116). Örneğin, Herrmann ve ark. 2001 yılında yayınlanan bir araştırmalarında içinde vejeteryanların da dahil olduğu 104 sağlıklı gönüllüde serum vitamin B12, folat, Hcy, MMA düzeylerini ve toplam antioksidan kapasiteyi (TAOK) ölçmüşlerdir. Yaptıkları araştırmada vejeteryanlarda ortalama Hcy konsantrasyonunu normal diyetle beslenenlere göre belirgin olarak daha yüksek ( $>15 \mu\text{mol/L}$ ) bulmuşlardır (78).

Çalışmamızın sonuçlarına göre homosistein düzeylerinin grup 1'de grup 2'ye ve grup 3'e göre anlamlı olarak yüksek olduğu (sırasıyla,  $p<0.01$  ve  $p<0.001$ ) saptanmıştır (Şekil–9). Bizim laboratuvarımızda Hcy düzeyleri için değer aralığı  $7\text{--}12 \mu\text{mol/L}$  olarak alınmış ve  $12 \mu\text{mol/L}$  ve üzerindeki Hcy düzeyleri yüksek değerler olarak kabul edilmiştir. Tüm vakalar ( $n=400$ ) üzerinde yapılan korelasyon çalışmasında, Hcy düzeyleri ile vitamin B12, folik asit ve HoloTC düzeyleri arasında negatif ve istatistiksel olarak anlamlı korelasyon ( $p<0,001$ ) bulundu. Hcy düzeyleri ile MDA düzeyleri arasında ise pozitif ve istatistiksel olarak anlamlı korelasyon ( $p<0.05$ ) bulundu (Tablo–5). Sonuçlar, Loikas ve ark.'nın (104) 2007 yılında yayınlanan araştırmaları ile uyumludur. Belirtilen araştırmanın sonucunda, Hcy düzeyleri, vitamin B12 ve HoloTC düzeyleri ile negatif korele (sırasıyla  $r=-0.32$ ,  $p<0.001$  ve  $r=-0.33$ ,  $p<0.001$ ) bulunmuştur. Herrmann ve ark. (78) 2001 yılında yayınlanan bir araştırmalarında, 104 kişilik vaka grubunun tümü için yapılan korelasyon çalışmasında MMA ve Hcy düzeyleri arasında belirgin bir pozitif korelasyon ( $p<0.01$ ) ve vitamin B12 düzeyleri ile araştırılan diğer parametreler arasında MMA ve Hcy düzeyleri ile negatif korelasyon ( $p<0.05$ ), vitamin B12 düzeyleri

ile folat düzeyleri ve TAOK arasında pozitif bir korelasyon ( $p<0.01$ ) saptamışlardır.

Yaptığımız çalışmada vitamin B12 eksikliğinin kesin olduğu 1. grupta diğer iki gruba göre daha yüksek Hcy düzeyleri saptanmıştır ve bu bulgu vitamin B12 eksikliği olanlarda Hcy düzeylerinin yükseldiğini gösteren ve literatürde yer alan pek çok çalışma ile uyumludur (46, 78). Örneğin, Loikas ve ark.'nın (104) 2007 yılında yayınlanan araştırmalarında, önceden vitamin B12 eksikliği tanısı alan 27 kişiyi hariç tutarak, geriye kalan 1021 kişiyi serum vitamin B12 düzeylerine göre sınıflandırmış, 150 pmol/L altındaki vitamin B12 düzeyleri kesin eksiklik, 150–250 pmol/L arasını şüpheli bölge ve 250 pmol/L üstünü ise normal vitamin B12 düzeyleri olarak belirlemişlerdir. Vitamin B12 konsantrasyonları şüpheli bölgede olan 324 kişinin Hcy ve HoloTC düzeylerini ölçerek vitamin B12 eksikliğinin olup olmadığını belirlemeye çalışmışlardır. Bu 324 kişi içinden, Hcy düzeyleri 15  $\mu\text{mol/L}$  üzerinde olan ve HoloTC düzeyleri 37 pmol/L altında olan toplam 35 kişiyi yeni tanı konulan vitamin B12 eksikliği vakaları olarak bildirmişlerdir. Belirtilen çalışma Hcy ve HoloTC düzeyleri ölçümünün gizli kalmış vitamin B12 eksikliği tanısı için yararlı olabileceğini göstermektedir.

Vitamin B12 ve folatın karşılıklı etkileşimi karmaşıktır, bu durum bu vitaminlerin metyoin sentaz tepkimesine ortak katılmalarının bir sonucudur. Bu nedenle vitamin B12 eksikliğinde serum folat konsantrasyonları da etkilenmektedir. Vitamin B12 eksikliğinde serum folat konsantrasyonlarını düşük bulan araştırmalar olduğu gibi değişmemiş veya yüksek bulan araştırmalar da vardır. Cooper ve ark. (117) şiddetli vitamin B12 eksikliğinde serum folat düzeylerinin normal veya yüksek beklenebileceğini belirtmişlerdir.

Bizim çalışmamızda, 1. ve 2. gruptaki hastaların serum folik asit düzeylerinin, 3. gruptaki hastaların serum folik asit düzeylerine göre anlamlı olarak düşük olduğu bulundu (Şekil-10). Folik asit düzeyleri için laboratuvarımızın referans aralığı 3–17 ng/ml idi. Normal vitamin B12 düzeyleri olan 3. gruptaki vakaların folik asit düzeyleri diğer 2 gruptan daha yüksek, vitamin B12 eksikliği kesin ve şüpheli olan gruplarda ise daha düşük saptandı. Tüm vakalar ( $n=400$ ) üzerinde yapılan korelasyon çalışmasında,

folik asit ile HoloTC ve vitamin B12 düzeyleri arasında pozitif ve istatistiksel olarak anlamlı korelasyon ( $p<0,001$ ), folik asit ile Hcy düzeyleri arasında negatif ve istatistiksel olarak anlamlı korelasyon ( $p<0.001$ ) bulundu (Tablo-5). Bu bulgular Herrmann ve ark.'nın (8) 2000 yılında yayınlanan araştırma sonuçları ile uyumludur. Bu araştırma, 90 çok yaşlı (85-102 yaş), 92 yaşlı (65-75 yaş) ve 50 genç (19-50 yaş) kişi üzerinde yapılmış, bu bireylerin Hcy, sistasyonin, MMA, vitamin B12, vitamin B6, folat ve kreatinin düzeylerine bakılmıştır. Serum vitamin B12 konsantrasyonları ile Hcy, sistasyonin ve MMA arasında ters korelasyon, vitamin B6 ve folat arasında ise pozitif korelasyon bulmuşlardır.

HoloTC, vitamin B12'nin transkobalamin ile birleşmesiyle oluşmuştur ve vitamin B12'nin DNA sentezi yapan bütün hücrelere dağıtılmasını sağlayan biyolojik olarak aktif parçasıdır. Herbert ve ark. (85) vitamin B12 eksikliğinin 4 aşamasını tanımlarken 1. ve 2. aşamaları vitamin B12'nin plazma ve hücre depolarının azaldığı ve HoloTC düzeylerinin düşük olduğu aşamalar olarak belirtmişlerdir. Ancak 3. aşamada Hcy ve MMA konsantrasyonları artmakta, 4. aşamada ise klinik işaretler görülmektedir. Bu nedenle serum HoloTC düzeyleri ölçüm testleri, vitamin B12 eksikliğinin tanısı için erken ve güvenilir olmakla birlikte aynı zamanda diğer testlere göre daha duyarlı ve özgüllüğü daha yüksek testler olduğu düşünülmektedir (39, 43, 85). Literatürde vitamin B12 ile HoloTC düzeyleri arasındaki ilişkiyi tanımlayan ve bunlarla ilgili yapılmış pek çok araştırma vardır (46, 88, 118). Hvas ve Nexo (88) 2005 yılında yayınlanan bir çalışmalarında, vitamin B12 eksikliği şüphesi olan 937 kişi üzerinde HoloTC ölçümünün performansını diğer vitamin B12 eksikliği belirteçleri ile karşılaştırarak ölçmüşlerdir. Bu çalışmada vitamin B12 (AUC: 0,85) ile HoloTC (AUC: 0,90) düzeylerini ROC eğrileri ile karşılaştırmışlar ve HoloTC düzeyi ölçümünün vitamin B12 eksikliğini belirlemede daha duyarlı ve özgül olduğunu saptamışlardır. Şerefhanoglu ve ark.'nın (119) 2007 yılında yayınlanan bir çalışmasında ise ilk kez iskemik serebrovasküler hastalık geçiren 45 hastada vitamin B12, HoloTC, Hcy ve folik asit düzeyleri araştırılmıştır. Otuz beş hastada (45 hastanın %78'i) düşük HoloTC düzeyleri ( $<37$  pmol/L), 22 hastada (%49)

hiperhomosisteinemi (Hcy >14 µmol/L), 21 hastada (%46) düşük vitamin B12 düzeyi (<200 pg/ml) ve 3 hastada (%6,6) düşük folik asit düzeyi (<3 ng/ml) saptamışlardır. Serebrovasküler bozukluğu olan hastalarda kobalamin eksikliği bulunabileceğini ve araştırılması gerektiğini belirtmişlerdir. Aynı zamanda bu klinik durumlarda kobalamin eksikliğini gösterilmesi için erken bir tanı testi olarak serum HoloTC düzeyi ölçümü önerilmiştir.

Bizim çalışmamızda tüm gruplar HoloTC düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklı bulundu ( $p<0.001$ ) (Şekil-8). Tüm vakalar ( $n=400$ ) üzerinde yapılan korelasyon çalışmasında, HoloTC düzeyleri ile vitamin B12 ve folik asit düzeyleri arasında pozitif ve istatistiksel olarak anlamlı korelasyon (sırasıyla  $p<0.001$  ve  $p<0.001$ ), HoloTC ve Hcy düzeyleri arasında negatif ve istatistiksel olarak anlamlı korelasyon ( $p<0.001$ ) bulundu (Tablo-5). Bulgularımız Hvas ve Nexo'nun (88) 2005 yılında yayınlanan araştırma sonuçları ile uyumludur. Bu araştırmacılar serum HoloTC düzeyleri ile Hcy düzeyleri arasındaki ilişkiyi "belirgin ancak çok kuvvetli değil" ( $r=-0,24$ ,  $p<0.001$ ) biçiminde belirtmişler, serum HoloTC düzeyleri ile vitamin B12 düzeylerinin ise kuvvetli ilişkili ( $r=0.71$ ,  $p<0.001$ ) olduğunu bildirmişlerdir. Bizim verilerimize göre de, HoloTC'nin vitamin B12 durumunu yansıtan iyi bir gösterge ve erken bir belirteç olabileceği düşünülebilir.

B12 vitamini eksikliği tanısında total vitamin B12 düzeyi ölçümlerine HoloTC ölçümlerinin yardımcı olup olmayacağını değerlendirmek amacıyla B12 vitamini ve HoloTC konsantrasyonlarına göre 6 grup oluşturularak Hcy düzeylerini karşılaştırıldığımızda, B12 vitamini düzeyleri 193-300 pg/ml arasındayken HoloTC konsantrasyonu düşük bulunan kişilerde (Grup 2A), HoloTC konsantrasyonu yüksek olan kişilere göre (Grup 2B), Hcy düzeylerinin anlamlı olarak daha yüksek bulunduğu görülmüştür (Şekil-12). Ayrıca Hcy düzeyleri, B12 vitamini düzeyi şüpheli olan alanda, HoloTC düzeylerinin yüksek olduğu grupta (Grup 2B), vitamin B12 ve HoloTC düzeylerinin düşük bulunduğu gruba göre (Grup 1A) anlamlı olarak düşük bulunmaktadır. Bu sonuçlar ışığında, HoloTC düzeyleri, özellikle total B12 vitamini düzeylerine göre değerlendirildiğinde şüpheli olarak

sınıflandırdığımız kişilerde B12 eksikliğinin tanısında yardımcı bir parametre olarak işe yarar görülmektedir.

Grup 3A ve 3B'de Hcy düzeyleri arasında fark olmaması total B12 düzeylerinin normal sınırlarda olduğu durumda HoloTC düzeylerinin ayrıca yol gösterici olmadığını işaret etmektedir.

Bu değerlendirmede vitamin B12 düzeylerinin  $<193$  pg/ml olduğu ve HoloTC düzeylerinin  $>35$  pmol/L olduğu Grup 1B'de sadece 5 vaka bulunmaktadır. Grup 1B'nin Hcy düzeylerinin Grup 2B, 3A ve 3B' ye göre istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemesi bu gruptaki vaka sayısının azlığı ile açıklanabilir.

Bilindiği gibi Hcy yüksekliğinin pek çok nedeni vardır ve vitamin eksiklikleri (vitamin B2, B6, B12 ve folik asit) bu nedenler arasında yer alır (78, 120–122). Diğer yandan Hcy 'nin artmış serum konsantrasyonları fonksiyonel vitamin B12 ve folik asit eksikliklerinin iyi bir göstergesidir (123–126). Hiperhomosisteinemi, önemli ve bağımsız bir kardiyovasküler risk faktörü olarak kabul edilmektedir (127). Bir görüşe göre Hcy, SOR oluşumuna neden olarak endotel ve düz kas hücre fonksiyonlarını değiştirmekte (128–130) ve sonuçta artan oksidatif stres ve azalan antioksidan kapasite kişilerde aterosklerotik damar hastalıkları riskini artırmaktadır (131, 132). Biz bu çalışmamızda değişik vitamin B12 düzeyleri olan kişilerde oksidatif stres göstergelerinden biri olan serum malondialdehit düzeylerini ölçtük. Özellikle vitamin B12 eksikliği olan kişilerde artan Hcy düzeyleri nedeniyle oksidatif stresin arttığını düşünerek, MDA düzeyleri açısından vaka grupları arasında anlamlı fark olup olmadığını araştırdık.

Bizim sonuçlarımıza göre vitamin B12 düzeyleri ile MDA ve Hcy düzeyleri arasındaki negatif ve istatistiksel olarak anlamlı korelasyon olması (sırasıyla,  $p<0,05$  ve  $p<0,001$ ) (Tablo–5) ve MDA düzeylerinin, vitamin B12 eksikliği olan 1. grupta diğer iki gruba göre daha yüksek ve birinci gruptaki hastaların MDA düzeylerinin 3. gruba göre anlamlı farklı ( $p<0,05$ ) bulunması (Şekil–11) vitamin B12 eksikliği olan hastaların oksidatif strese daha açık ve duyarlı olduğunu göstermektedir.



Vitamin B12 eksikliği özellikle yaşlılar arasında daha sık görülen bir halk sağlığı problemidir. Erken tanı ve tedavisi yapılmadığında ise nörolojik, hematolojik ve diğer pek çok sağlık sorununa yol açmaktadır (1,2, 133–135). Özellikle nörolojik hasarların geri dönüşsüz olmasından dolayı erken tanısı ve tedavisi önemlidir. Literatürde yer alan çok sayıda yayın ile vitamin B12 eksikliği tanısı için serum HoloTC düzeylerinin ölçümü önerilmektedir (17–23, 92).

Bizim çalışmamızın sonuçları da kobalamin durumunun değerlendirilmesinde HoloTC düzeylerinin, özellikle B12 eksikliği tanısında gri bölge olarak tanımlanan B12 düzeylerinin 193–300 pg/ml arasında ölçüldüğü vakalarda olumlu olarak yol gösterebileceğine dikkat çekmektedir. Diğer taraftan, B12 düzeyleri ile oksidatif hasar ilişkisi açısından incelendiğinde ise tek başına HoloTC'nin, total B12 vitamini ölçümü kadar değerli olmadığı anlaşılmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Carmel R, Gren R, Rosenblatt DS, Watkins D. Update on cobalamin, folate and homocysteine. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2003;62–81.
2. Refsum H, Smith AD, Ueland PM, et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* 2004;50:3–32.
3. Wolters M, Ströhle A, Hahn A. Cobalamin: a critical vitamin in the elderly. *Preventive Medicine* 2004;39:1256–66.
4. Baik HW, Russell RM. Vitamin B12 deficiency in the elderly. *Annu Rev Nutr* 1999;19:357–77.
5. Wolters M, Hermann S, Hahn A. B vitamins, homocysteine, and methylmalonic acid in elderly German women. *Am J Clin Nutr* 2003;78:765–72.
6. Bjorkegren K, Svardsudd K. Elevated serum levels of methylmalonic acid and homocysteine in elderly people. A population-based intervention study. *J Intern Med* 1999;246:317–24.
7. Bjorkegren K, Svardsudd K. Serum cobalamin, folate, methylmalonic acid and total homocysteine as vitamin B12 and folate tissue deficiency markers amongst elderly Swedes—A population-based study. *J Intern Med* 2001;249:423–32.
8. Herrmann W, Schorr H, Bodies M, et al. Role of homocysteine, cystathionine and methylmalonic acid measurement for diagnosis of vitamin deficiency in high-aged subjects. *Eur J Clin Invest* 2000;30:1083–9.
9. Klee GG. Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B12 and folate. *Clin Chem* 2000;46:1277–83.
10. Stabler SP, Lindenbaum J, Allen RH. Vitamin B-12 deficiency in the elderly: current dilemmas. *Am J Clin Nutr* 1997;66:741–9.
11. Wolters M, Strohle A, Hahn A. Altersassoziierte Veränderungen im Vitamin-B12- und Folsäurestoffwechsel: Prävalenz, Ätiopathogenese und pathophysiologische Konsequenzen. *Z Gerontol Geriatr* 2004;37:109–35.
12. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993;270:2693–8.
13. Quinn K, Basu TK. Folate and vitamin B12 status of the elderly. *Eur J Clin Nutr* 1996;50:340–2.
14. Lindeman RD, Romero LJ, Koehler KM, Liang HC, LaRue A, Baumgartner RN, et al. Serum vitamin B12, C and folate concentrations in the New Mexico elder health survey: correlations with cognitive and affective functions. *J Am Coll Nutr* 2000;19:68–76.

15. Charlton KE, Kruger M, Labadarios D, Wolmarans P, Aronson I. Iron, folate and vitamin B12 status of an elderly South African population. *Eur J Clin Nutr* 1997;51:424–30.
16. Carmel R. Measuring and interpreting holo–transcobalamin (holotranscobalamin II). *Clin Chem* 2002;48:407–9.
17. Nexo E, Hvas AM, Bleie O, Refsum H, Fedosov SN, Voliset SE, et al. Holo–transcobalamin is an early marker of changes in cobalamin homeostasis. A randomized placebo–controlled study. *Clin Chem* 2002;48:1768–71.
18. Loikas S, Lopponen M, Suominen P, Moller J, Irjala K, Isoaho R, et al. RIA for serum holo–transcobalamin: method evaluation in the clinical laboratory and reference interval. *Clin Chem* 2003;49:455–462.
19. Bor MV, Nexo E, Hvas AM. Holo–transcobalamin concentration and transcobalamin saturation reflect recent vitamin B12 absorption better than does serum vitamin B12. *Clin Chem* 2004;50:1043–9.
20. Refsum H, Smith AD. Low vitamin B12 status in confirmed Alzheimer’s disease as revealed by serum holotranscobalamin. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:959–61.
21. McCaddon A, Blennow K, Hudson P, Hedges A, Barber J, Gray R, et al. Transcobalamin polymorphism and serum holo–transcobalamin in relation to Alzheimer’s disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2004;17:215–21.
22. Herrmann W, Obeid R, Schorr H, Geisel J. The usefulness of holotranscobalamin in predicting vitamin B12 status in different clinical settings. *Curr Drug Metab* 2005;6:47–53.
23. Afman LA, Van Der Put NM, Thomas CM, Trijbels JM, Blom HJ. Reduced vitamin B12 binding by transcobalamin II increases the risk of neural tube defects. *QJM* 2001;94:159–66.
24. Smith C, Marks AD, Lieberman M. Mark’s Temel Tıbbi Biyokimyası Klinik Yaklaşım. 2. baskı. (Çeviri editörleri, İnal ME, Atik U, Aksoy N, Haşimi A) Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri Yayınları; 2007.
25. Moestrup SK, Verroust PJ. Megalin -and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. *Annu Rev Nutr* 2001;21:407-28.
26. Kristiansen M, Kozyraki R, Jacobsen C, Nexo E, Verroust PJ, Moestrup SK. Molecular dissection of the intrinsic factor–vitamin B12–receptor, cubilin, discloses regions important for membrane association and ligand binding. *J Biol Chem* 1999;274:20540–4.
27. He Q, Madsen M, Kilkenney A, et al. Amnionless function is required for cubilin brush–border expression and intrinsic factor–cobalamin (vitamin B12) absorption in vivo. *Blood* 2005;106:1447–53.
28. Chanarin I. The megaloblastic anemias. 3rd edition. London: Blackwell Scientific Publications; 1990.
29. Seetharam B, Yammani RR. Cobalamin transport proteins and their cell surface receptors. *Expert Rev Mol Med* 2003;5:1–18.
30. Markle HV. Cobalamin. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1996;33:247–356.

31. Hom BL, Olesen HA. Plasma clearance of cobalt-labelled vitamin B12 bound in vitro and in vivo to transcobalamin I and II. *Scand J Clin Lab Invest* 1969;23:201–11.
32. Nexo E, Gimsing P. Turnover in humans of iodine- and cobalamin-labeled transcobalamin I and of iodine-labeled albumin. *Scand J Clin Lab Invest* 1975;35:391–8.
33. Björkstén KS, Thorell LH, Nexo E. Circadian variation of plasma cobalamin, transcobalamin-bound cobalamin and unsaturated binding capacity of transcobalamin and haptocorrin in healthy elderly. *J Affect Disord* 1995;36:37–42.
34. Nexo E, Hvas AM, Bleie Q, et al. Holo-transcobalamin is an early marker of changes in cobalamin homeostasis. A randomized placebo-controlled study. *Clin Chem* 2002;48:1768–71.
35. Carmel R, Herbert V. Deficiency of vitamin B12-binding alpha globulin in two brothers. *Blood* 1969;33:1–12.
36. Hakami N, Neiman PE, Canellos GP, et al. Neonatal megaloblastic anemia due to inherited transcobalamin II deficiency in two siblings. *New Engl J Med* 1971;285:1163–70.
37. Hall CA. Congenital disorders of vitamin B12 transport and their contributions to concepts. II. *Yale J Biol Med* 1981;54:485–95.
38. Li N, Rosenblatt DS, Seetharam B. Nonsense mutations in human transcobalamin II deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;204:1111–18.
39. Lindgren A, Kilander A, Bagge E, et al. Holotranscobalamin—a sensitive marker of cobalamin malabsorption. *Eur J Clin Invest* 1999;29:321–9.
40. Tisman G, Vu T, Amin J, et al. Measurement of red blood cell-vitamin B12: a study of the correlation between intracellular B12 content and concentrations of plasma holotranscobalamin II. *Am J Hematol* 1993;43:226–9.
41. Hebert V, Fong W, Gulle V, et al. Low holotranscobalamin II is the earliest serum marker for subnormal vitamin B12 (cobalamin) absorption in patients with AIDS. *Am J Hematol* 1990;34:132–9.
42. Nexo E, Cristensen AL, Hvas AM, Petersen TE, Fedosov SN. Quantification of holotranscobalamin, a marker of vitamin B12 deficiency. *Clin Chem* 2002;48:526–32.
43. Ulleland M, Eilertsen I, Quadros EV, et al. Direct assay for cobalamin bound to transcobalamin (holotranscobalamin) in serum. *Clin Chem* 2002;48:526–32.
44. Obeid R, Jouma M, Herrmann W. Cobalamin status (holotranscobalamin, methylmalonic acid) and folate as determinants of homocysteine concentration. *Clin Chem* 2002;48:2064–5.
45. Herrmann W, Obeid R, Schorr H, et al. Functional vitamin B12 deficiency and determination of holotranscobalamin in populations at risk. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1478–88.
46. Herrmann W, Schorr H, Obeid R, et al. Vitamin B12 status, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians. *Am J Clin Nutr* 2003;78:131–6.

47. Lloyd-Wright Z, Hvas A-M, Meller J, et al. Holotranscobalamin as an indicator of dietary vitamin B12 deficiency. *Clin Chem* 2003;49:2076-8.
48. Miller JW, Garrod MG, Rockwood AL, et al. Measurement of total vitamin B12 and holotranscobalamin, singly and combination, in screening for metabolic vitamin B12 deficiency. *Clin Chem* 2006;52:278-85.
49. Refsum H, Yajnik CS, Gadkari M, et al. Hiperhomocysteinemia and indicate a high prevalence of cobalamin deficiency in Asian Indians. *Am J Clin Nutr* 2001;74:233-41.
50. Refsum H, Smith AD, Low vitamin B12 status in confirmed Alzheimer's disease as revealed by serum holotranscobalamin. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:959-61.
51. Chen X, Remacha AF, Sarda MP, et al. Influence of cobalamin deficiency compared with that of cobalamin absorption on serum holotranscobalamin II. *Am J Clin Nutr* 2005;81:110-14.
52. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper Biyokimya*. 25. baskı. (Çeviri Editörleri, Dikmen N, Özgüven T) İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Yayınları; 2004.
53. Chanarin I. *The megaloblastic anemias*, 2nd edition. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1979. 783.
54. Campbell AK, Miller JW, Green R, Haan MN, Allen LH. Plasma vitamin B12 concentrations in an elderly Latino population are predicted by serum gastrin concentrations and crystalline vitamin B12 intake. *J Nutr* 2003;133:2770-6.
55. Carmel R. Cobalamin, the stomach, and aging. *Am J Clin Nutr* 1997;66:750-9.
56. Russell RM. The aging process as a modifier of metabolism. *Am J Clin Nutr* 2000;72(2 suppl):529S-32S.
57. Russell RM. Factors in aging that effect the bioavailability of nutrients. *J Nutr* 2001;131(4 suppl):1359S-61S.
58. Selhub J, Bagley LC, Miller J, Rosenberg IH. B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function in the elderly. *Am J Clin Nutr* 2000;71:614S-20S.
59. Doscherholmen A, Swaim WR. Impaired assimilation of egg Co 57 vitamin B12 in patients with hypochlorhydria and achlorhydria and after gastric resection. *Gastroenterology* 1973;64:913-9.
60. Bradford GS, Taylor CT. Omeprazole and vitamin B12 deficiency. *Ann Pharmacother* 1999;33:641-3.
61. Saltzman JR, Russell RM. Nutritional consequences of intestinal bacterial overgrowth. *Compr Ther* 1994;20:523-30.
62. Peterson WL. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. *N Engl J Med* 1991;324:1043-8.
63. Logan RP, Walker MM. ABC of upper gastrointestinal tract: epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *BMJ* 2001;323:920-2.
64. Carmel R. Prevalence of undiagnosed pernicious anemia in the elderly. *Arch Intern Med* 1996;156:1097-100.

65. Stabler SP, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J. Clinical spectrum and diagnosis of cobalamin deficiency. *Blood* 1990;76:871–81.
66. Lindenbaum J, Healton EB, Savage DG, Brust JC, Garrett TJ, Podell ER, et al. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. *N Engl J Med* 1988;318:1720–8.
67. Howard JM, Azen C, Jacobsen DW, Green R, Carmel R. Dietary intake of cobalamin in elderly people who have abnormal serum cobalamin, methylmalonic acid and homocysteine levels. *Eur J Clin Nutr* 1998;52(4 Suppl):582–7.
68. Herbert V. Vitamin B12: plant sources, requirements, and assay. *Am J Clin Nutr* 1988;48:852–8.
69. Dwyer JT. Nutritional consequences of vegetarianism. *Annu Rev Nutr* 1991;11:61–91.
70. Carmel R, Gott PS, Waters CH, Cairo k, Green R, Bondareff W, et al. The frequently low cobalamin levels in dementia usually signify treatable metabolic, neurologic and electrophysiologic abnormalities. *Eur J Haematol* 1995;54:245–53.
71. Allen RH, Stabler SP, Lindenbaum J. Relevance of vitamins, homocysteine and other metabolites in neuropsychiatric disorders. *Eur J Pediatr* 1998;157(Suppl 2):S122–6.
72. Marcus DL, Shadick N, Crantz J, Gray M, Hernandez F, Freedman ML. Low serum B12 levels in a hematologically normal elderly subpopulation. *J Am Geriatr Soc* 1987;35:635–8.
73. Green R. Metabolite assays in cobalamin and folate deficiency. *Baillieres Clin Haematol* 1995;8:533–66.
74. Allen RH, Stabler SP, Savage DG, Lindenbaum J. Metabolic abnormalities in cobalamin (vitamin B12) and folate deficiency. *FASEB J* 1993;7:1344–53.
75. Herbert V. Vitamin B12. In: Ziegler EE, Filer IF, (Eds). *Present knowledge in nutrition*. Washington DC: International Life Science Institute Press; 1996. 191–205.
76. Snow CF. Laboratory diagnosis of vitamin B12 and folate deficiency: a guide for the primary care physician. *Arch Intern Med* 1999;159:1289–98.
77. Haynes WG. Hyperhomocysteinemia, vascular function and atherosclerosis: effects of vitamins. *Cardiovas Drugs and Ther* 2002;16:391–99.
78. Herrmann W, Schorr H, Purschwitz K, Rassoul F, Richter V. Total, homocysteine, Vitamin B12, and total antioxidant status in vegetarians. *Clin Chem* 2001;47:1094–101.
79. Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest* 1993;77:1370–6.
80. Heinecke JW, Rosen H, Suzuki LA, Chait A. The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1987;262:10098–103.

81. Emsley AM, Jeremy JY, Gomes GN, Angelini GD, Plane F. Investigation of the inhibitory effects of homocysteine and copper on nitric oxide-mediated relaxation of rat isolated aorta. *Brit J Pharmacol* 1999;126:1034–40.
82. Upchurch GR Jr, Welch GN, Fabian AJ, et al. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1997;272:17012–7.
83. Weir DG, Scott JM. Brain function in the elderly: role of vitamin B12 and folate. *Br Med Bull* 1999;55:669–82.
84. Hvas AM, Juul S, Gerdes LU, Nexø E. The marker of cobalamin deficiency, plasma methylmalonic acid, correlates to plasma creatinine. *J Intern Med* 2000;247:507–12.
85. Herbert V. Staging vitamin B12 (cobalamin) status in vegetarians. *Am J Clin Nutr* 1994;59(Suppl):1213S–22S.
86. Schneede J, Dagnelie PC, van Staveren WA, Voliset SE, Refsum H, Ueland PM. Methylmalonic acid and homocysteine in plasma as indicators of functional cobalamin deficiency in infants on macrobiotic diets. *Pediatr Res* 1994;36:194–201.
87. Herrmann W, Schorr H, Geisel J, Riegel W. Homocysteine, cystathionine, methylmalonic acid and B-vitamins in patients with renal disease. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:739–46.
88. Hvas AM, Nexø E. Holotranscobalamin—a first choice assay for diagnosing early vitamin B12 deficiency? *J Intern Med* 2005;257:289–98.
89. Baker H, Leevy CB, DeAngelis B, Frank O, Baker ER. Cobalamin (vitamin B12) and holotranscobalamin changes in plasma and liver tissue in alcoholics with liver disease. *J Am Coll Nutr* 1998;17:235–8.
90. Bhad DS, Thuse NV, Lubree HG, et al. Increases in plasma holotranscobalamin can be used to assess vitamin B12 absorption in individuals with low plasma vitamin B12. *J Nutr* 2009;139(11):2119–23.
91. Young IS, Trimble ER. Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Ann Clin Biochem* 1991;28:504–508.
92. Lindgren A, Kilander A, Bagge E, Nexø E. Holotranscobalamin—a sensitive marker of cobalamin malabsorption. *Europ J of Clin Invest* 1999;29:321–9.
93. Miller J, Garrod M, Rockwood A, Kushnir M. Measurement of total vit. B12 and holotranscobalamin, singly and in combination, in screening for vitamin B12 deficiency. *Clin Chem* 2006;52:278–85.
94. Lobreglio G.B, Gatto A, Cardinali R. Holotranscobalamin (Holo-TC) for diagnosing early vitamin B12 deficiency. *Haematologica* 2008;93(S1):403 Abs.1012.
95. Clarke R, Evans JG, Schneede J, Nexø E, Bates C, Fletcher A, et al. Vitamin B12 and folate deficiency in later life. *Age Ageing* 2004;33:34–41.
96. Andres E, Loukili NH, Noel E, Kaltenbach G, Abdelgheni MB, Perrin AE, et al. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *CMAJ* 2004;171:251–9.

97. Carmel R. Current concepts in cobalamin deficiency. *Ann Rev Med* 2000;51:357–75.
98. Morris M.S, Jacques P.F, Rosenberg IH, Selhub J. Folate and vitamin B12 status in relation to anemia, macrocytosis and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. *Am J Clin Nutr* 2007;85:193–200.
99. Fakhrzadeh H, Ghotbi S, Pourebrahim R, et al. Total plasma homocysteine, folate, and vitamin B12 status in healthy Iranian adults: the Tehran homocysteine survey (2003–2004)/a cross sectional population based study. *BMC Public Health* 2006;6;29:1471–2458.
100. Clarke R, Smith AD, Jobst KA, et al. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1998;55:1449–55.
101. Hvas A, Morkbak A.L, Nexø E. Plasma holotranscobalamin compared with plasma cobalamins for assessment of vitamin B12 absorption; optimisation of a non-radioactive vitamin B12 absorption test (CobaSorb). *Clinica Chimica Acta* 2007;376:150–4.
102. Snow F. Laboratory diagnosis of vitamin B12 and folate deficiency. *Arch Intern Med* 1999;159:1289–98.
103. Hvas A, Nexø E. Diagnosis and treatment of vitamin B12 deficiency. An update. *Haematologica* 2006;91:1506–12.
104. Loikas S, Koskinen P, Irjala K, et al. Vitamin B12 deficiency in the aged: a population-based study. *Age and Ageing* 2007;36:177–83.
105. Gimsing P, Nexø E. Cobalamin-binding capacity of haptocorrin and transcobalamin: age-correlated reference intervals and values from patients. *Clin Chem* 1989;35:1447–51.
106. Nexø E, Christensen AL, Hvas AM, Petersen TE, Fedosov SN. Quantification of holo-transcobalamin, a marker of vitamin B12 deficiency. *Clin Chem* 2002;48:561–2.
107. Carmel R. Subtle cobalamin deficiency. *Ann Intern Med* 1996;124:338–40.
108. Schilling RF. Who has vitamin B12 deficiency? *Proc Assoc Am Physicians* 1996;108:68–70.
109. Carmel R. Current concepts in cobalamin deficiency. *Annu Rev Med* 2000;51:357–75.
110. Hvas AM, Ellegaard J, Nexø E. Vitamin B-12 treatment normalize metabolic markers but has limited clinical effect: a randomized placebo-controlled study. *Clin Chem* 2001;47:1396–404.
111. Lindenbaum J, Rosenberg IH, Wilson PW, Stabler SP, Allen RH. Prevalence of cobalamin deficiency in the Framingham elderly population. *Am J Clin Nutr* 1994;60:2–11.
112. Rasmussen K, Vyberg B, Pedersen KO, Brochner-Mortensen J. Methylmalonic acid in renal insufficiency: evidence of accumulation and implications for diagnosis of cobalamin deficiency. *Clin Chem* 1990;36: 1523–4.
113. Hvas AM, Juul S, Gerdes LU, Nexø E. The marker of cobalamin deficiency, plasma methylmalonic acid, correlates to plasma creatinine. *J Intern Med* 2000;247:507–12.


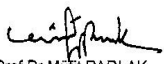


114. Hultberg B, Andersson A, Sterner G. Plasma homocysteine in renal failure. *Clin Nephrol* 1993;40:230–5.
115. Joosten E, van den Berg A, Riezler R et al. Metabolic evidence that deficiencies of vitamin B–12 (cobalamin), folate, and vitamin B–6 occur commonly in elderly people. *Am J Clin Nutr* 1993;58:468–76.
116. Goringe A, Ellis R, et al. The limited value of methylmalonic acid, homocysteine and holotranscobalamin in the diagnosis of early B12 deficiency. *Haematologica* 2006;91:231–234.
117. Cooper BA, Lowenstein L. Relative folate deficiency of erythrocytes in pernicious anemia and its correlations with cyanocobalamin. *Blood* 1964;24:502–21.
118. Refsum H, Johnston C, Guttormsen A.B, Nexø E. Holotranscobalamin and total transcobalamin in human plasma: determination, determinants, and reference values in healthy adults. *Clin Chem* 2006;52:129–37.
119. Serefhanoglu S, Aydogdu I, Kekilli E, Ilhan A, Kuku I. Measuring holotranscobalamin II, an early indicator of negative vitamin B12 balance, by radioimmunoassay in patients with ischemic cerebrovascular disease. *Ann Haematol* 2008;87:391–5.
120. Siri PW, Verhoef P, Kok FJ. Vitamins B6, B12, and folate: association with plasma total homocysteine and risk of coronary atherosclerosis. *J Am Coll Nutr* 1998;17:435–41.
121. Hustad S, Ueland PM, Vollset SE, Zhang Y, Bjorke–Monsen AL, Schneede J. Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine: effect of modification by the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Clin Chem* 2000;46:1065–71.
122. Miner SE, Evrovski J, Cole DE. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. *Clin Biochem* 1997;30:189–201.
123. Markle HV. Cobalamin. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1996;33:247–356.
124. Stabler SP, Lindenbaum J, Allen RH. Vitamin B–12 deficiency in the elderly: current dilemmas. *Am J Clin Nutr* 1997;66:741–9.
125. Koehler KM, Pareo–Tubbeh SL, Romero LJ, Baumgartner RN, Garry PJ. Folate nutrition and older adults: challenges and opportunities. *J Am Diet Assoc* 1997;97:167–73.
126. Haddad EH, Berk LS, Kettering JD, Hubbard RW, Peters WR. Dietary intake and biochemical, hematologic, and immune status of vegans compared with nonvegetarians. *Am J Clin Nutr* 1999;70:586S–93S.
127. Van der Griend R, Biesma DH, Banga JD. Hyperhomocysteinaemia as a cardiovascular risk factor: an update. *Neth J Med* 2000;56:119–30.
128. Andersson A, Lindgren A, Hultberg B. Effect of thiol oxidation and thiol export from erythrocytes on determination of redox status of homocysteine and other thiols in plasma from healthy subjects and patients with cerebral infarction. *Clin Chem* 1995;41:361–6.
129. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998;338:1042–50.
130. Lentz SR. Homocysteine and vascular dysfunction. *Life Sci* 1997;61:1205–15.

131. Olszewski AJ, McCully KS. Homocysteine metabolism and the oxidative modification of proteins and lipids. *Free Radic Biol Med* 1993;14:683–93.
132. Rauma AL, Mykkanen H. Antioxidant status in vegetarians versus omnivores. *Nutrition* 2000;16:111–9.
133. Thompson MD, Cole DE, Ray JG. Vitamin B12 and neural tube defects: the Canadian experience. *Am J Clin Nutr* 2009;89:697–701.
134. Varela–Moreiras G, Murphy MM, Scott JM. Cobalamin, folic acid, and homocysteine. *Nutr Rev.* 2009;67:69–72.
135. Wang YH, Yan F, Zhang WB, et al. An investigation of vitamin B12 deficiency in elderly inpatients in neurology department. *Neurosci Bull* 2009;25:209–15.

## EKLER

### EK-1: Etik Kurul Onay Yazısı

	<b>T.C. ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI</b>	
Sayı :	B.30.2.ULU.0.01.00.01.02.020/ 4215	BURSA
Konu :	Etik Kurul Kararı.	11-04-2008
Sayın Prof.Dr.Esma GÜR Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi		
<p>Fakültemiz Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulunun 01 Nisan 2008 tarih ve 2008-7/43 no'lu kararı ile usul ve esas yönünden uygun görülen <b>"B12 Vitamini ve Holotranskobalamin Düzeylerinin Serum Lipit Peroksidasyonu ile İlişkisi"</b> isimli çalışmanız Dekanlığımızca da uygun görülmüştür.</p> <p>Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.</p>		
 Prof.Dr.Mürit PARLAK D e k a n		
<b>EK:</b> -Etik Kurul kararı (3 adet) -Başvuru ve AHO formu (2 adet)		
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 16059 Görükle Yerleşkesi / BURSA Tel: (224)2950020 Faks: (224)2950029 e-mail:tipdek@uludag.edu.tr elektronik ađ:www.tip.uludug.edu.tr		

T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU  
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, ULUDAG UNIVERSITY  
Görükle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	B12 Vitamini ve Holotranskobalamin Düzeylerinin Serum Lipit Peroksidasyonu ile İlişkisi
	ARAŞTIRMA SORUMLULARI	Prof.Dr.Esma GÜR
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Dr.Faruk Sönmezşik
	ARAŞTIRMA YARDIMCILARI	-
	ARAŞTIRMANIN TAHMİNİ SÜRESİ KATILACAK GÖNÜLLÜ SAYISI	6-8 ay 400
	DESTEKLEYİCİ KURULUŞ	Kitle araştırmacılar tarafından karşılanacaktır.
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ / NİTELİĞİ	Laboratuvar incelemesi / Temel araştırma	

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Değişiklik No. su
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	01.04.2008	
	AYDINLATILMIŞ HASTA ONAM FORMU	01.04.2008	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2008-7/43	Tarih : 01 Nisan 2008
	Fakültemiz Biyokimya AD Öğretim Üyesi Prof.Dr.Esma Gür'ün sorumluluğunda yürütülmesi planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgelerin araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda yapılmasının uygun olduğuna ve araştırmanın aşağıda belirtilen hususlar göz önüne alınarak yürütülmesi gerektiğinin sorumlu araştırmacılara bildirilmesine oybirliği ile karar verildi. 1. Etik Kurul kaşesi bulunan "Onam" formunun kullanılmasına ve bu formun gönüllüye (hasta ve sağlıklı gönüllü) çalışma hakkında sözlü bilgi verilmesi sonrasında eksiksiz bir şekilde doldurulması. 2. Çalışmanın başlama tarihinin bildirilmesine ve çalışma tamamlandığında çalışmaya alınan gönüllülerin (hasta ve sağlıklı gönüllüler) adı-soyadı ve protokol numaralarının (Gizlilik ilkesi nedeniyle kapalı zarf içerisinde) ve özet bir sonuç raporunun hazırlanarak kurulumuza iletilmesi.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ



ÇALIŞMA ESASI İYİ KLİNİK UYGULAMALAR KILAVUZU

ÜYELER						
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeligi	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Levent BÜYÜKUYSAK Başkan	Farmakoloji	U.Ü.T.F. Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Mine Sibel GÜRÜN Başkan Yardımcısı	Farmakoloji	U.Ü.T.F. Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof.Dr.Selim Giray NAK Raportör	İç Hastalıkları	U.Ü.T.F. İç Hastalıkları AD. Gastroenteroloji BD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Ayşegül DEMİRHAN Üye	Deontoloji	U.Ü.T.F. Deontoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. İrfan KIRIŞTIOĞLU Üye	Çocuk Cerrahisi	U.Ü.T.F. Çocuk Cerrahisi AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	Katılmadı
Prof.Dr.Fahir ÖZKALEMKAŞ Üye	İç Hastalıkları Hematoloji	U.Ü.T.F. İç Hastalıkları AD. Hematoloji BD	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	Kongrede
Prof.Dr.Ömer YERCI Üye	Patoloji	U.Ü.T.F. Patoloji AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	

\* Araştırma ile İlişki  
\*\* Toplantıda Bulunma

T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU  
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, ULUDAG UNIVERSITY  
Görükle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

Doç. Dr. Zehra SERDAR Üye	Biyokimya	U.Ü.T.F. Biyokimya AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç.Dr.Betül Berrin SEVİNİR Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıklardan	U.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıklardan AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç.Dr.Davit SABA Üye	Kalp ve Damar Cerrahisi	U.Ü.T.F. Kalp ve Damar Cerrahisi AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	Katılmadı
Av.E.Dilek HARÇCI Üye	Hukuk	U.Ü.Rektörlüğü Hukuk Müşavirliği	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	Görevli

\* Araştırma ile İlişki  
\*\* Toplantıda Bulunma

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman esirgemeyen, eğitimim ve tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı değerli hocam ve tez danışmanım Prof.Dr. Esmâ GÜR'e şükranlarımı ve saygılarımı sunarım. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr. Melahat DİRİCAN'a, bilgi ve deneyimlerini paylaşarak zamanlarını ve emeklerini harcayan kürsümüzün tüm öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Beraber görev yaptığım dostluklarını, arkadaşlıklarını unutmayacağım sevgili iş arkadaşlarıma ve ayrıca Uludağ Üniversitesi Tıbbi Tahliller, Eğitim ve Araştırma Merkez ve Acil Laboratuvarı teknisyenlerine ve elemanlarına, yardımları ve destekleri için teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Ayrıca istatistiksel analizlerin yapılmasındaki katkılarından dolayı Araştırma Görevlisi Çağatay Büyükuysal'a teşekkür ederim.

Hiçbir zaman sevgi ve desteğini esirgemeyen eşime, anneme, kardeşime ayrıca mutluluk kaynağım oğullarım Oğuz ve Hüseyin'e teşekkür eder ve sevgilerimi sunarım. 04.05.2009 tarihinde kanser hastalığı nedeniyle aramızdan ayrılan çok sevdiğim babam Hüseyin SÖNMEZİŞİK'a minnet ve şükranlarımı da ayrıca bir borç bilirim.

Son olarak bu çalışmaya katılmayı kabul eden tüm kişilere teşekkür ederim.

## ÖZGEÇMİŞ

1967 yılında Kütahya–Tavşanlı’da doğdum. İlkokulu Bursa Ahmet Vefik Paşa İlkokulu’nda, ortaokulu Bursa Osmangazi Ortaokulu’nda okudum ve liseyi Bursa Süleyman Çelebi Lisesi’nde 1984 yılında tamamladım. Aynı yıl Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde tıp eğitimine başladım ve 1990 yılında tıp doktoru olarak mezun oldum. 1990 yılında İstanbul Bayrampaşa Cezaevi kurum tabibi olarak ilk göreve başladım. 1991–1992 yılları arasında Isparta’da askerlik görevimi yaptım. 1993 yılında İstanbul’daki mecburi hizmet görevimi tamamladım. 1994 yılında Bursa–Gemlik, Kurşunlu Beldesi’ne tayin oldum ve 2005 yılına kadar Kurşunlu Sağlık Ocağı’nda pratisyen hekim olarak çalıştım. 2005 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda uzmanlık eğitimine başladım. Evliyim ve iki çocuğum var.