



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

**VİTAMİN B12 İLİŞKİLİ BELİRTEÇLERİN GENÇ ORTA YAŞ
SAĞLIKLI DONÖRLERDE REFERANS ARALIKLARININ
BELİRLENMESİ**

Dr. Sedat ÖZDEMİR

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Selda DEMİRTAŞ

ANKARA 2015



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

**VİTAMİN B12 İLİŞKİLİ BELİRTEÇLERİN GENÇ ORTA YAŞ SAĞLIKLI
DONÖRLERDE NORMAL REFERANS ARALIKLARININ
BELİRLENMESİ**

Dr. Sedat ÖZDEMİR

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Selda DEMİRTAŞ

Bu tez 114S844 nolu proje kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir

ANKARA 2015

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

İÇİNDEKİLER	i
TEŞEKKÜRLER	iii
KISALTMALAR	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. VİTAMİN B12'İN TANIMI.....	4
2.1.1. Vitamin B12'nin Molekül Yapısı ve Genel Özellikleri	4
2.1.2. Vitamin B12'nin Emilimi ve Metabolizması.....	5
2.1.3. Vitamin B12 Kaynakları	7
2.1.4. Vitamin B12'in Serum Referans Aralığı	7
2.1.5. Vitamin B12 Eksikliği	8
2.1.6. Vitamin B12 Eksikliğinde Görülen Klinik Bulgular	11
2.2. FOLİK ASİT	12
2.2.1. Folik Asitin Genel Özellikleri.....	12
2.2.2. Folik Asitin Emilimi ve Metabolizması.....	12
2.2.3. Folik Asit Kaynakları.....	14
2.2.4. Folik Asit Eksikliğinin Nedenleri	15
2.2.5. Folik asit Serum Düzeyi Ölçümü ve Referans Aralığı	16
2.3. HOMOSİSTEİN.....	16
2.3.1. Homosisteinin Genel Özellikleri.....	16
2.3.2. Homosistein Metabolizması.....	17
2.3.3. Homosistein Serum Düzeyi Ölçümü ve Referans Aralığı	17
2.3.4. Homosisteinemi ve Homosistinüri.....	18

2.4. HOLOTRANSKOBALAMİN	19
2.4.1. Holotranskobalaminin Genel Özellikleri	19
2.4.2. Holotranskobalamin Serum Düzeyi Ölçümü ve Referans Aralığı	21
2.5. METİL MALONİK ASİT	22
2.5.1. Metil Malonik Asit Genel Özellikleri	22
2.6. REFERANS ARALIĞI.....	24
2.6.1. Referans Aralığı Tanımı.....	24
2.6.2. Referans Bireylerin Seçimi	26
2.6.2.1. Referans Bireyler ve Dışlama Kriterleri	26
2.6.2.2. Referans Kitesinin Gruplandırılması	29
2.6.3. Referans Aralık Tayininde Veri Sayısının Önemi ve Kullanılan İstatiksel Yöntemler	29
2.6.4. Referans Dağılımın İncelenmesi	31
2.6.5. Referans Aralığı Tayininde İstatiksel Yöntemler	31
2.6.5.1. Parametrik Yöntemler	31
2.6.5.2. Parametrik Olmayan Yöntemler	32
3. MATERYAL ve METOD	33
3.1. ÇALIŞMA TASARIMI VE KATILIMCI ÖZELLİKLERİ	33
3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN TESTLER	36
3.2.1. Vitamin B12, Folat, Homosistein, Holotranskobalamin ve MMA	36
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	41
4. BULGULAR	42
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇ	61
7. ÖZET.....	67
8. SUMMARY	68
9. KAYNAKLAR	69
10. EK - BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	82

TEŞEKKÜRLER

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarım süresince bana yol gösteren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Selda DEMİRTAŞ başta olmak üzere değerli fikirleriyle bu tezin yapılmasında büyük emeği olan Doç. Dr. M. Vakur BOR hocama uzmanlık eğitimim sırasında yardımlarını eksik etmeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Konçuy MERGEN, Prof. Dr. Levent KARACA, Yard. Doç. Dr. Tuba ÇANDAR ve Uzm. Dr. Rabia ŞEKER'e çalışmamda emeği geçen Prof Dr. Meltem AYLI, Yard. Doç. Dr. Ali Kemal OĞUZ, Yard. Doç. Dr. Aslıhan ALHAN ve Dr. Hesna URAL KAYALIK'a, dört yıldır kendileriyle bir aile havasında çalıştığım ve yardımlarını esirgemeyen tüm Laboratuvar personeline, bu günlere gelmemde desteklerini esirgemeyen Annem Ünzile ÖZDEMİR, Babam Hayrettin ÖZDEMİR ve kız kardeşim Ayşenur ÖZDEMİR KANAT'a, uzmanlık eğitimim ve çalışmalarım sırasında her anımda desteği ile hep yanımda olan sevgili eşim Nurhan ÖZDEMİR'e ve daha haberini ilk aldığımız andan itibaren hayatımıza umut ışığı olan biricik kızım Begüm'e en derin saygı ve sevgilerimi sunarım.

Dr. Sedat ÖZDEMİR

KISALTMALAR

TC-I	: Transkobalamin-I
TC-II	: Transkobalamin-II
TC-III	: Transkobalamin-III
IF	: Intrensek Faktör
Holo TC	: Holotranskobalamin
MMA	: Metil Malonik Asit
GİS	: Gastro İntestinal Sistem
MCV	: Mean Corpuscular Volume
MCHC	: Mean Corpuscular Hemoglobin Consantration
NHANES	: National National Health and Nutrition Examination Survey
HC	: Haptokorrin
CBS	: Systation Beta sentaz
BHMT	: Betain Homosistein Metil Transferaz
MS	: Metiyonin Sentaz
NADPH	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
THF	: Tetrahidrofolat
MTHFR	: Metilentetrahidrofolat Redüktaz
SAH	: S-Adenozil Homosistein
KC	: Karaciğer
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DHFR	: Dihidrofolat redüktaz
DTT	: Dithiothereitol
KOH	: Potasyum Hidroksit
FBP	: Folat Bağlayıcı Protein
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
RIA	: Radio İmmüno Assay

CMIA : Kemilüminesan İmmüno Assay

MEİA : Mikropartikül Enzim İmmüno Assay

CV : Coefficient of Variation

HELENA : Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1: Vitamin B12 Molekül Şekli	4
Şekil 2: Vitamin B12'nin Emilimi	6
Şekil 3: Folat metabolizması	13
Şekil 4: Homosistein Metabolizması.....	19
Şekil 5: Plazma Vitamin B12 (kobalamin) ve Bağlayıcı Proteinler.....	20
Şekil 6: Vitamin B12'nin Koenzim Olarak Görev Aldığı Reaksiyonlar.....	22
Şekil 7: Vitamin B12–Folik Asit Metabolizmalarının İlişkisi.....	23
Şekil 8: Yaş grupları - Vitamin B12 düzeyi	45
Şekil 9: Yaş grupları-Folat Düzeyi.....	46
Şekil 10: Yaş grupları – Homosistein düzeyleri.....	47
Şekil 11: Yaş grupları- HoloTC değerleri	48
Şekil 12: Yaş grupları- Plazma MMA değerleri.....	49

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1: Bazı Besin Ögelerinde Bulunan Porsiyon Başına Vitamin B12 Düzeyleri	7
Tablo 2: Vitamin B12 eksikliğinin nedenleri	8
Tablo 3: Vitamin B12 Eksikliğinde Görülen Majör Klinik Belirtiler	11
Tablo 4: Bazı Besin Ögelerinde Bulunan Porsiyon Başına Folik Asit Düzeyleri	15
Tablo 5: Abbott ARCHITECT Vitamin B12 testine ait tekrarlanabilirlik sonuçları	37
Tablo 6: Abbott ARCHITECT Folat testine ait tekrarlanabilirlik sonuçları	38
Tablo 7: Abbott ARCHITECT HoloTC testine ait tekrarlanabilirlik sonuçları	39
Tablo 8: Abbott ARCHITECT Homosistein testinde tekrarlanabilirlik sonuçları	40
Tablo 9: Vitamin B 12 İle İlişkili Belirteçlerin Referans Aralıkları.....	42
Tablo 10: Parametreler Arası Korelasyon ve p Değerleri	43
Tablo 11: Testlere Göre Gönüllülerin Yaş Ortalaması ve Sayısı	44
Tablo 12: Cinsiyetlere Göre Çalışılan Parametrelerin Referans Aralıkları ve Gönüllü Sayıları.....	44
Tablo 13: Yaş gruplarına Göre B12 ile İlişkili Belirteçlerin Referans Aralıkları	50
Tablo 14: Yaş Gruplarına Göre Vitamin B12 nin Gruplararası Farkı.....	51
Tablo 15: Yaş Gruplarına Göre Folat ın Gruplararası Farkı.....	51
Tablo 16: Yaş Gruplarına Göre Homosistein in Gruplararası Farkı.....	52
Tablo 17: Yaş Gruplarına Göre Holo TC nin Gruplararası Farkı.....	52
Tablo 18: Yaş Gruplarına Göre plazma MMA in Gruplararası Farkı	53

1. GİRİŞ

Vitamin B12 (kobalamin), normal hücre aktivitesi, proliferasyonu ve metabolizması için gerekli olan bir vitamindir (1). Vitamin B12 insan vücudunda sentez edilemez. Başta hücre bölünmesi ve çoğalması için gerekli olan DNA yapımında olmak üzere pek çok önemli molekül ve hormonun işlev görmesinde, hematopoezde, nöropsikiatrik metabolizmada koenzim olarak görev alır. Vitamin B12 esansiyel olan önemli bir vitamindir ve yaklaşık olarak günde 6 mikrogram alınmalıdır (2).

Vitamin B12 eksikliği, ilk 1849 yılında tanımlanmıştır. Eksikliğin ölümcul sonuçlara yol açtığı bildirilmiştir. Vitamin B12 yönünden zengin olduğu bilinen karaciğer diyeti 1926 yılına kadar hastalık sürecini yavaşlatmak için kullanılmıştır (3).

Günümüzde Vitamin B12 eksikliği bir halk sağlığı problemi olarak görülmektedir (4). Ayrıca vitamin B12 eksikliğinin halk sağlığı problemi olmasının ve ciddiyle takip edilmesi gerekliliğindeki esas neden klinik bulgular ortaya çıkmadan subklinik kobalamin eksikliği adı verilen durumun toplumda sıklıkla görülmesidir. Toplumda B12 vitamini eksikliği klinik olarak megaloblastik anemi ve nöro bilişsel işlev bozukluğu ile karakterizedir. Yaşlı nüfusta vitamin B12 eksikliğinin klinik bulguları %1-2 oranın görülmesine rağmen subklinik kobalamin eksikliği %10-20 oranında görülmektedir (5). Yine erişkin dönemde Vitamin B12 eksikliği olan hastaların %25'inden daha fazlasında, hematolojik bulgu olmadan nörolojik bulgular ortaya çıkabilir (6).

Klasik Vitamin B12 ve subklinik Vitamin B12 eksikliğinin tanısında biyokimyasal belirteçler çok önemli yer tutmaktadır. Ancak tek başına Vitamin B12 düzeyini gerçek anlamda gösteren ve klinik Vitamin B12 eksikliği ile subklinik kobalamin eksikliğini yeterli derecede ayırabilecek kesin bir belirteç bulunamamıştır.

Kobalamin eksikliği tanısının konulmasında; fonksiyonel belirteçler olarak ifade edilen Homosistein veya Metil Malonik Asit (MMA) ten birisinin -tercihen MMA- ile beraberinde dolaşımsal biyomarker olarak adlandırılan Vitamin B12 veya Holotranskobalaminin birinin kullanılarak kesin Vitamin B12 durumunun gösterilebileceği ifade edilmektedir (4).

Ancak MMA'nın ölçüm tekniğindeki zorluk, Homosisteinin özellikle Folattan, Vitamin B6 dan ve böbrek yetmezliği gibi faktörlerden etkilenmesi vitamin B12 eksikliğinin tesbitinde kullanılacak olan yöntem belirlemede problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca ölçülen Vitamin B12 nin ölçüm tekniklerindeki farklar nedeniyle güvenilirliğinin kısıtlılığı Vitamin B12 düzeylerinin değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle aktif Vitamin B12 olarak da adlandırılan ve aslında Vitamin B12 nin hücre içerisine girerek etkili olmasında öneme sahip yeni bir belirteç olan holotranskobalamin son yıllarda önem kazanmıştır (7).

Holotranskobalaminin güvenilir bir belirteç olduğunu kanıtlamaya yönelik yapılan çalışmalar hala devam etmektedir ancak yeterli değildir (7).

Vitamin B12 tanısında kullanılan belirteçlerin referans aralıklarının güvenilirliği vitamin B12 ile ortaya çıkan hastalıkların ve durumların tanılarının konmasında büyük önem taşımaktadır.

Ancak ülkemizde bu alanda yeterli çalışma bulunmamaktadır. Vitamin B12 ve diğer belirteçlerin değerlendirilmesinde bu belirteçlerin ölçümünde kullanılan reaktifleri üreten firmaların önerdiği ve başka ülkelerde çalışılmış referans aralıkları kullanılmaktadır

Ayrıca vitamin B12 eksikliğinde yeni bir belirteç olarak kullanılmaya başlanan dolaşımsal biyomarkerelemlerden Holotranskobalaminin referans aralığı hakkında çalışmalar devam etmektedir.

Yaşanan coğrafik bölge, beslenme alışkanlığı, sosyo ekonomik durum nedeniyle ırklar arasında bu vitaminin seviyesinde farklılık göstermektedir (8).

Bu durumda, sağlıklı değerlendirme amacıyla bulunulan toplum için geçerli olacak değerlerin tespiti gereklidir. Yabancı toplumlardan elde edilen referans değerleri kullanmak yanılıcı sonuçlara yol açabilir.

En önemlisi rutinde kullandığımız Vitamin B12 analizi için her merkezde farklı türden analiz yöntemleri kullanılmakta ve her merkezde ayrı bir referans aralığı uygulanmaktadır.

Diğer bir gereklilik vitamin B12 nin rutin analizi için farklı merkezlerde çok farklı teknikler kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda radyoaktif tekniklerle kemilüminesan teknikler arasında çok ciddi farklılıkların olduğu bildirilmektedir. Bu durum genellikle RİA(Radyoimmunoassay) tekniğiyle çok daha düşük sonuçların alınması şeklinde ortaya çıkmaktadır (4).

Çalışmamız Vitamin B12 ve Vitamin B12 metabolizmasıyla ilişkili olan Holotranskobalamin, Homosistein ve Metil Malonik Asit'in referans aralık çalışmasını yaparak, Vitamin B12 ile ilişkili tüm belirteçlerin referans aralık çalışmasını gerçekleştirmek ve NHANES 2010 da belirtilen tüm belirteçlerin metabolizmalarını bir arada görmeyi hedeflemektedir.

Böylece elde ettiğimiz veriler lkemizde ve dünyada yapılacak Vitamin B12 çalışmalarında daha doğru karar vermemizi sağlayacaktır

2. GENEL BİLGİLER

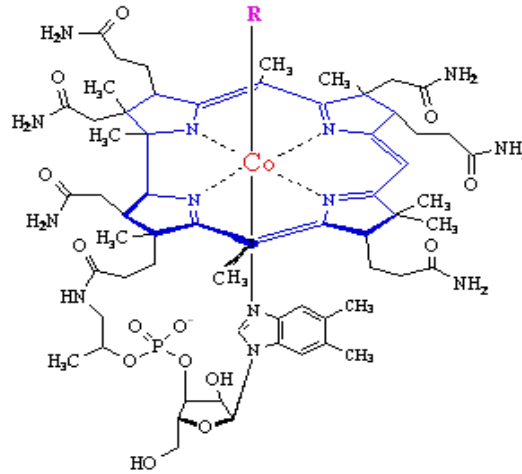
2.1. VİTAMİN B12'İN TANIMI

Vitamin B12, molekül ağırlığı 1,3 Kd olan ve vücutta önemli tepkimelerde görev alan, kobalt atomunun merkezinde bulunduğu, korrin halkasından oluşan kırmızı renkli bir vitamindir (9). En son bulunan B vitamini Vitamin B12 dir. 1948 yılında Dr. E. Lester Smith karaciğerden izole etmiştir (10).

2.1.1. Vitamin B12'nin Molekül Yapısı ve Genel Özellikleri

Merkezinde kobalt atomu bulunan bir korrin halkasına sahip olan vitamin B12, kobalta bağlı R grubuna göre isimlendirilir. Koenzim formları Metilkobalamin (MeCbl) ve 5-deoksiadenozilkobalamin (AdoCbl)'dir (11).

Siyanokobalamin ilk bulunan vitamin B12 türüdür ve yapısındaki –CN grubu sayesinde en stabil olan vitamin B12 türüdür. Siyanokobalamin, yapısındaki siyanid ayrılmadan aktif bir vitamin değildir. Vücutta koenzim olarak kullanılan şekilleri MeCbl ve AdoCbl dir. Her ikisi de ışık temasıyla bozulur fakat in vitro olarak daha stabil kobalamin şekillerine dönüşebilmektedir. Vücutta en fazla bulunan vitamin B12 türü Hidroksikobalamin (OHCbl) dir ve aktif koenzim türlerinin öncülüdür (12). Serumda çoğunlukla metilkobalamin, sitozolde ise deoksiadenozilkobalamin bulunur (13).



Şekil 1. Vitamin B12 Molekül Şekli

2.1.2. Vitamin B12'nin Emilimi ve Metabolizması

Vitamin B12 bakteriler tarafından üretilmesine rağmen bitki ve hayvanlar tarafından sentezlenemez. Vitamin B12'nin diyetdeki ana kaynakları deniz ürünleri, et, yumurta, süt ürünleri, balık ve kümes hayvanı etleridir (14).

Gıdalarla aldığımız Vitamin B12'nin emilime hazır hale getirilmesi için öncelikle midede hidroklorik asit ve pepsin etkisiyle serbest hale getirilmesi gerekir. Midenin asit ortamında tükrük kaynaklı, glikoprotein yapısındaki R-proteinleri Vitamin B12 ile bağlanır (15). Midenin asit ortamında kompleks yaptığı glikoprotein yapıdaki R-proteinin adı haptokorrindir ve ince bağırsağa haptokorrin (HC) ile kompleks yapmış halde transfer olur (16).

Haptokorrin midedeki asit ortamda, vitamin B12'ye intrinsek faktörden daha fazla afinite gösterir. Bu nedenle vitamin B12 midede intrinsek faktöre bağlanamaz (17, 18).

Duodenum ve jejunumun alkalen pH'sında, pankreatik enzimlerle Vitamin B12 haptokorrinden ayrılır. Midenin paryetal hücrelerinden salgılanan intrinsek faktör ile birleşir. İntrinsek faktör midedeki hidroklorik asit miktarı ile doğru orantılı olarak salınır. Vitamin B12-intrinsek faktör kompleksi proteolitik sindirime dirençlidir (19,15).

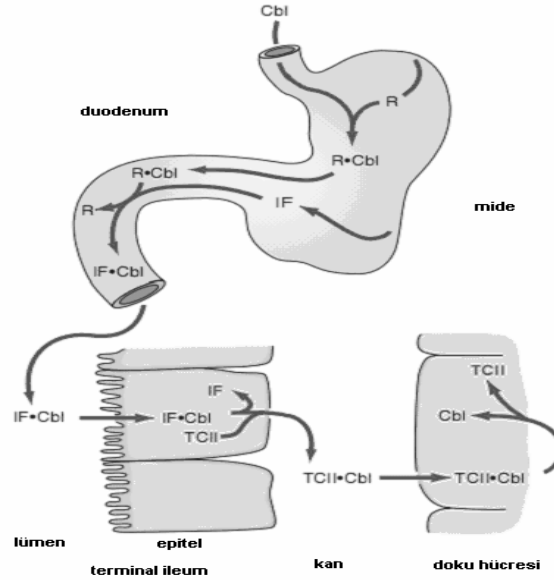
Bazı gastrektomili hastalarda gastrektomi sonrasında görüldüğü gibi veya pernisiyöz anemili hastalardaki gibi eğer IF yeterince yoksa, sindirimdeki Vitamin B12'nin sadece %1 kadarı pasif difüzyonla emilir (20). Eğer IF yeteri kadar varsa, 0,5 µg'dan daha az alınan fizyolojik dozun yaklaşık %75'i emilir, 1.0 µg alınan dozun ise %50'si emilir. Böylece vitamin B12'nin oral alımı artsa da toplam vitamin B12 emilimi daha fazla artmaz (20).

İleuma taşınan Vitamin B12-IF kompleksi, kalsiyum iyonlarının varlığında ve uygun pH'da mukoza hücrelerinin yüzeyindeki reseptörlere bağlanır. Reseptöre bağlanan Vitamin B12-IF kompleksinde, vitamin B12 intrinsek faktörden ayrılarak, endositoz yoluyla enterosit içine alınır (18,14).

Vitamin B12, enterosit hücresi içinde TC-II'ye (Transkobalamin) bağlanır (15, 16). Vitamin B12-TC-II kompleksi dolaşıma geçer sonrasında vücutta hücreler

tarafından alınır (16,17). Dolayısıyla Vitamin B12 iki proteine bağlı halde bulunur: Transkobalamin (TC-II) ve Haptokorrin (TC-I). TCII- Vitamin B12 kompleksi hücre içine taşınır. Holotranskobalamin (HoloTC) olarak bilinen bu kompleks, B12 Vitaminini vücudun tüm hücrelerine taşır ve Vitamin B12 bu hücrelerde bulunan transkobalamin membran reseptörleri tarafından hücre içine alınır (21,20). Burada TC parçalandıktan sonra Vitamin B12 serbestlenir (21).

Haptokorrin fonksiyonu bilinmeyen neredeyse tamamen doymuş Vitamin B-12 bağlayıcı bir glikoproteindir. Haptokorrin dolaşımdaki Vitamin B-12 nin inaktif formu olarak adlandırılan büyük bir kısmını taşır. Haptokorrin proteinin Vitamin B12 kompleksi ile turn overı çok yavaştır ve günlük 0,1 nmol olarak hesaplanmıştır (22,23).



Şekil 2. Vitamin B12'nin Emilimi

Diğer bir taşıyıcı protein de TC-II'ye benzeyen TC-III'tür. Plazmadaki fazla Vitamin B12, TC-III tarafından bağlanır. TC-III, Vitamin B12'nin enterohepatik dolaşımını gerçekleştirir. Karaciğer tarafından Vitamin B12-TC-III kompleksi alınır ve safraya sekrete edilir. Kompleks duodenuma gelince TC-III proteazlar ile parçalanır ve kobalamin serbest hale geçer intrensek faktör ile birleşir, ileumdan %75'i tekrar emilir. Absorbe edilmeyen %25'lik bölümün büyük bir miktarı gaita ile ve çok az bir kısmı da idrar ile atılır (24).

2.1.3. Vitamin B12 Kaynakları

Vitamin B12'nin diyetsetel kaynağı yumurta, et, süt gibi başlıca hayvansal besinlerdir (11). Bu yüzden vejeteryan beslenenlerde eksiklik gelişmesi olasıdır. Hayvanlar Vitamin B12'lerinin bir kısmını barsakta mikroorganizmalar yoluyla sentez ederek elde edebilirler (11,25). Tablo 1' de Vitamin B12 kaynakları gösterilmiştir (26).

Tablo 1. Bazı Besin gelerinde Bulunan Porsiyon Başına Vitamin B12 Düzeyleri

Besin geleri	Porsiyon Başına Vitamin B12 (μgr)
Yumuşakçalar, ıstiridye, karışık türler (pişirilmiş).	84.1
Karaciğer, sığır eti (pişirilmiş).	47.9
Alabalık	5.4
Somon	4.9
Ton balığı (konneve edilmiş)	1.0
Mezgit (pişirilmiş)	1.2
İstiridye (kızartılmış)	1.1
Sığır eti, fileto (yağsız kaynatılmış)	2.4
Hamburger	1.9
Takviye edilmiş kahvaltılık tahıllar	1.5
Yoğurt (sade, kaymaksız)	1.4
Süt (1 su bardağı)	0.9
Yumurta (kaynatılmış)	0.6
Tavuk göğsü (kızartılmış, ½ göğsü)	0.3

2.1.4. Vitamin B12'in Serum Referans Aralığı

Kullanılan metoda ve laboratuvara bağlı olarak serum Vitamin B12 düzeyi değişebilir. Vitamin B12'nin seviyesi ırklar arasında farklılık göstermekle birlikte genellikle ortalama serum referans aralığı 200-900 pg/ml'dir. 80-100 pg/ml altındaki serum düzeylerinde hemen daima Vitamin B12 eksikliğini görülür. Megaloblastik anemi gibi klinik bulguların ortaya çıktığı düzey genellikle 100 pg/ml'den düşüktür. Vitamin B12 düzeyi 100 pg/ml'den daha düşük olan bu hastaların da ancak %20-30'da kemik iliği incelemelerinde megaloblastik değişiklikler bulunmuştur. Klinik olarak megaloblastik anemi saptamış olan hastalarda serum Folat düzeyinin normal

veya artmış bulunması kobalamin yetersizliğinin güçlü indirekt bir kanıtıdır (27,28,29).

2.1.5. Vitamin B12 Eksikliği

Vitamin B12 eksikliği için çeşitli nedenler sayılabilir (30,31,32) (Tablo 2). Başlıca görülen önemli problemler emilimin bozulması, Vitamin B12 ihtiyacının artması ve diyetle Vitamin B12 alımındaki yetersizliklerdir (33). Yaşlılarda kronik atrofik gastrit nedeniyle mide salgıları azalmıştır; bu durum Vitamin B12 eksikliğinin en büyük sebebi olarak karşımıza çıkmaktadır (34,35,36,37). Yapılan çalışmalar, yaşlılarda, Vitamin B12 eksikliği nedenlerinin %20–50'sini kronik atrofik gastrit kaynaklı olduğunu göstermektedir (38).

Tablo 2. Vitamin B12 eksikliğinin nedenleri

Diyetsel eksiklik
Sıkı vejeteryan diyet Yetersiz beslenme Düşük alım
Malabsorbsiyon
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)
Ölümün rezeksiyonu
Pankreatik yetersizlik
Parazit hastalıkları (Difilobotrium latum solucanı) Bakteriye aşırı çoğalma
Antiepileptik ilaçlar (karbamazepin, fenitoin, primidon) Proton pompası inhibitörleri (omeprazol)
Histamin H2 reseptör antagonistleri
Antidiyabetik ilaç metformin Antibiyotikler (kloramfenikol, neomisin) Kolestiramin
Gereksinim artışı
Metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) mutasyonu
Hipertiroidizm
Diyabet
Böbrek yetmezliği Sigara kullanımı Düzenli alkol alımı

Kronik atrofik gastritte başlıca problem, HCl ve pepsinojen gibi mide salgılarının ayrıca intrinsek faktör salınımının azalmasıdır (36,38). Kronik atrofik gastritte ortaya çıkan bu değişiklikler diyetsel Vitamin B12'nin bağırsakta serbestleşmesini önlemektedir. Diyetsel Vitamin B12 nin atrofik gastritteki

biyoyararlanımının bu şekilde düşüşü Doscherholmen ve Swaim (39) ile Bradford ve Taylor (40) tarafından da gösterilmiştir. Yine azalmış asit salınımı ince bağırsakta pH'ı yükselterek mikroorganizmalara karşı koruyucu olan bariyeri zayıflatır ve ince bağırsak geçirgenliğinin artmasına neden olur. Kolonda bulunan bakterilerin kolondan ince barsağa geçmesi sonucunda ince bağırsakta, sıklıkla Camfilobakter, Yersinia ve Clostridium gibi bakteriler aşırı çoğalır. Bu durum Vitamin B12 alımı için bir yarışa neden olur, böylece Vitamin B12 yetersizliğinde artış kaçınılmaz hale gelir (41).

Yaşlanmayla ilişkisi olmayan gastrik atrofinin diğer bir sebebi ise kronik Helikobakter pylori enfeksiyonudur (34, 37). Yapılan bir çalışmada Amerikan halkında 30 yaşın üstündekilerin %10'u, yaşlıların (60 yaş üstü) ise %60'ı enfekte bulunmuştur (42). Düşük sosyoekonomik bölgelerde Helikobakter pylori enfeksiyonu daha yüksek prevalans gösterir (43).

1992 yılında Türkiye'de yapılmış bir çalışmada 18–24 yaşları arasındaki asemptomatik bireylerde Helikobakter Pylori görülme sıklığı %76,8 bulunmuştur (44).

Yine 2003 yılında kan donörlerinde yapılan bir çalışmada ise bu oran 20–29 yaş grubunda %85,9, 60–69 yaş grubunda ise %88,6 olarak bulunmuştur (45).

Yener ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Türk ve Hollanda kökenli depresyon hastası vakalarda Vitamin B12 değerleri karşılaştırılmış, sonuçta Türk kökenlilerde Vitamin B12 düzeyi Hollanda kökenlilere göre daha düşük bulunmuş ve bunun en önemli nedenlerinden biri olarak ta Helikobakter Pylori enfeksiyonu gösterilmiştir (46).

Vitamin B12 eksikliğine neden olan pernisiyöz aneminin nedenlerinden olan Tip A atrofik gastrit yaşlılarda sıklıkla tanı konulan bir hastalıktır. Pernisiyöz anemi genellikle seyrek görünmektedir ancak tipik hastalık belirtileri, makrositik anemi, glossit ve vibrasyon duyusu ve propriyosepsiyon duyusu bozukluğundan dolayı anormal yürüyüş ve pareteziler gibi nörolojik durumlardır (47,48). Bu bulgular sayesinde hastalar kolayca tanınır. Eğer zamanında tanınır ve tedavi başlanırsa tam olarak tedavi edilebilirler.

Hayvansal gıdaları diyetinden çıkaran vejeteryanlarda ve veganlarda Vitamin B12' yi de içeren bazı gerekli besinlerin alımı azalır. Çünkü Vitamin B12 sadece

hayvansal gıdalarda bulunur. Hayvansal gıdaların alınmaması ile ilişkili katı vejeteryan diyet, Vitamin B12 eksikliğinin esas nedeni olabilmektedir (49, 50).

Vitamin B12'nin uzamış eksikliği bir hastalık durumudur. Bu durum genellikle nörolojik bozukluklar, mide bağırsak bozuklukları ve anemi ile kendini gösterir (51, 52).

Vitamin B12 durumunu saptamada duyarlı ve spesifik deneylere hala ihtiyaç vardır. Vitamin B12 eksikliği yüksek prevalansa sahiptir ve ciddi komplikasyonlara yol açar. Ancak bu kadar önemli ve sık görülen durum genellikle klinisyenler tarafından fark edilemez ve tipik olarak Vitamin B12 eksikliği sadece megaloblastik aneminin hematolojik göstergeleri görüldüğünde farkedilir. Klinik belirtilerse sadece şiddetli Vitamin B12 düşüşü olan bireylerde ortaya çıkar (53).

Vitamin B12 eksikliği için klinik tarama testi olarak halen geçerli standart toplam plazma Vitamin B12 konsantrasyonu ölçümüdür. Toplam plazma Vitamin B12 konsantrasyonunun <200 pg/ml (<148 pmol /L) olması eksiklik olarak kabul edilir. Bu değer, Vitamin B12 eksikliği durumlarının çoğu için tanısal olarak kullanışlıdır. Bununla beraber, Vitamin B12 eksikliği olduğu düşünölen bireylerin bir çoğunda klinik veya biyokimyasal eksikliği gösteren başka hiçbir delil yoktur (54). Diğer yandan ölçölen Vitamin B12 konsantrasyonları referans aralıkları içindeyken bile nöropsikiyatrik bulgular (48) ve metabolik anomaliler (48, 52) görölebilir. Bu durumda özellikle genç nüfusta subklinik kobalamin eksikliği denen sıklıkla rastlanmaktadır. Subklinik kobalamin eksikliği görölen bireylerde Vitamin B12 eksikliğinden kaynaklı hematolojik bulgular ortaya çıkmadığı halde, nörokognitif fonksiyon bozukluğu vardır (7).

Vitamin B12 eksikliğinde metil malonik asit ve Homosistein konsantrasyonları artar. Bunların Vitamin B12 değerlendirilmesinde toplam plazma Vitamin B12 düzeylerinden daha duyarlı olduğu düşünölmektedir (48, 52). Fakat MMA'nın ölçüm tekniğindeki zorluk, Homosisteinin özellikle Folattan, Vitamin B6 dan ve böbrek yetmezliği gibi faktörlerden etkilenmesi nedeniyle daha güvenilir, daha duyarlı ve daha özgül tarama testlerine ihtiyaç vardır.

2.1.6. Vitamin B12 Eksikliğinde Görülen Klinik Bulgular

Vitamin B12 Suda çözünen bir Vitamin olmasına rağmen karaciğerde depolanır. Karaciğer depolanmış olması Vitamin B12 eksikliğinde klinik bulgularının ortaya çıkmasını 5-10 yıl kadar geciktirir (55).

Vitamin B12 eksikliğinin klinik bulguları nadir görülmesine rağmen eksiklik geliştiğinde hematolojik, nöropsikiyatrik, gastrointestinal, neoplastik ve kardiyovasküler belirtilerle seyredebilir (56-60).

Görülen belirtiler hafif sensöriyel nöropati ve makrositozdan spinal kordun kombine dejenerasyonu, pansitopeni, demans, depresyon gibi ciddi tablolara kadar gidebilen geniş bir yelpazededir (61, 11).

Vitamin B12 eksikliğinin klinik belirtileri Tablo 3’de özetlenmiştir (62).

Tablo 3. Vitamin B12 Eksikliğinde Görülen Majör Klinik Belirtiler

Vitamin B12 eksikliğinin major klinik belirtileri	
Sistem	Bulgular
Hematolojik	Makrositoz, nötrofil hipersegmentasyonu, Megaloblastik anemi, medüller megaloblastozis İzole trombositopeni, nötropeni, pansitopeni Hemolitik anemi, trombotik mikroanjyopati
Nöropsikiyatrik	Spinal kordun kombine dejenerasyonu Polinöropati, ataksi, Babinski fenomeni Kranial sinirleri etkileyen serebellar sendromlar; Optik nörit, optik atrofi, üriner veya fekal inkontinans Demans, inme ve ateroskleroz gibi ileri fonsiyonlardaki değişiklikler (hiperhomosisteinemi) Parkinson sendromları, depresyon
Sindirim sistemi	Hunter glossiti, sarılık, laktat dehidrogenaz ve indirekt bilirubin yüksekliği Dirençli veya rekürren mukokutanöz ülserler Karın ağrısı, dispepsi, bulantı, kusma, diyare ve barsak fonksiyonlarında değişiklikler
Kardiyovasküler	Anjina, venöz tromboembolizm
Jinekolojik	Vaginal mukoza atrofisi, vaginal ve üriner infeksiyonlar. Hipofertilite ve tekrarlayan düşükler vb.

2.2. FOLİK ASİT

2.2.1. Folik Asitin Genel Özellikleri

Suda eriyen bir vitamin olan Folik asit (pteril monoglutamat), pterik asit (para-aminobenzoik asit ve pteridinden oluşur) ve L-glutamik asidin birleşmesi ile oluşur. Pteril monoglutamatın dihidrofolat redüktaz enzimi tarafından indirgenmesi ile folik asidin aktif formu oluşur ve tetrahidrofolik asit ismini alır (25). Görev yaptığı önemli metabolik reaksiyonlar: pürin, timidilat, metiyonin sentezi, serin-glisin dönüşümü ve histidin yıkımıdır. Bu reaksiyonlarda tek karbon birimlerini taşır (18,63). Memeliler vitaminin bütün bileşenlerini sentezleyebilir. Ancak memeliler pterin ile para-aminobenzoik asit arasındaki bağı oluşturamazlar (63).

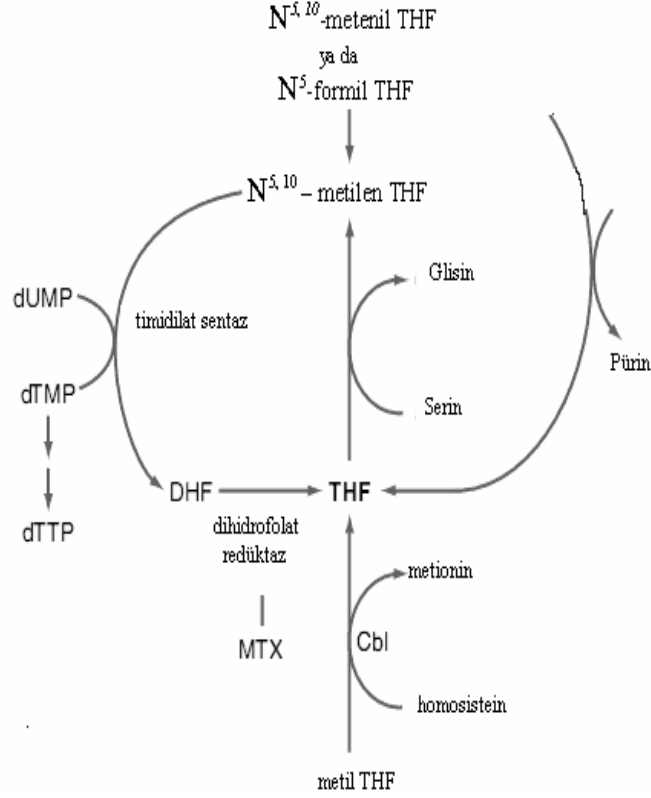
2.2.2. Folik Asitin Emilimi ve Metabolizması

Besinle alınan ve folatın bir formu olan poliglutamat emilmeden önce pterilpoliglutamat hidrolaz (glutamat karboksipeptidaz) tarafından monoglutamata çevrilir. Pterilpoliglutamat hidrolaz (glutamat karboksipeptidaz), jejunum mukozasında fırçamsı kenarlarda membrana bağlı olarak aktivite gösterir (24, 63). Çinko bağımlı ektopeptidaz olan glutamat karboksipeptidaz enzimleri pankreatik sıvıda ve safra sıvısında da bulunur. Glutamat karboksipeptidaz aktivitesi çinko yetersizliğinde bozulur, Folatın sindirim ve Emilimi azalır (24). Yemekle glutamat karboksipeptidaz inhibitörü (bakliyat, mercimek, lahana, portakal) alımı ve kronik alkol alımı ile glutamat karboksipeptidaz aktivitesini azaltır ve Folat Emilimi bozulur (24, 63).

Folat bağlayan protein ya da Folat reseptörü intestinal fırçamsı kenarlara bağlıdır. Emilim en çok jejunumda olmak üzere ince bağırsakta gerçekleşir. Folat bağlayıcı proteine yüksek affinite gösteren sütteki Folat daha çok ileumdan emilir. Folik asit, farmakolojik dozda verildiğinde Emilimi difüzyonla olur. Yemeklerdeki Folatın %50'si emilir ve mide boşken tahıl ürünü alınırsa Emilim daha yüksek değerlere ulaşabilir (63).

Esas olarak bir monoglutamat olan N⁵-metiltetrahidrofolat plazmada bulunan Folat formudur. Hücre içerisine N⁵-metiltetrahidrofolat, vitaminin tetrahidro

formlarına spesifik bir taşıyıcı ile alınır. Folat hücre içinde N⁵-metil grubu kobalamin gerektiren reaksiyonla ayrılır (Şekil 3) (15) ve tekrar poliglutamata formuna çevrilir. Diyetle poliglutamatin eklenmesinin Folatın hücre içinde tutulmasında rol aldığı düşünülmektedir (19, 15).



Şekil 3. Folat metabolizması

İntestinal hücrelerin içinde Folat ve dihidrofolat, tetrahidrofolata (THF) dönüşür. NADPH bağımlı dihidrofolat redüktaz (DHFR) tarafından bu dönüşüm yapılır. THF, N⁵-metiltetrahidrofolat'a, 5. pozisyonuna (N5); metil, formil ve formimino gruplarının eklenmesiyle dönüşür. 10. pozisyona (N10); formil ve hidroksimetil eklenirse THF, N¹⁰-formiltetrahidrofolat'a dönüşür (24,63). Portal dolaşımında Folat, 5 metil THF, dihidrofolat ve 10 formil THF şeklinde bulunur. Folat karaciğere, karaciğerde bulunan Folat reseptörü tarafından alınır. Dihidrofolat KC'de, tetrahidrofolata dönüştürülür ve glutamat ile konjuge edilir. Depolanır ya da 5 metil tetrahidrofolata dönüştürülür. Folatın %33'ü KC'de THF, %37'si 5 metil THF, %23'ü 10 formil THF ve %7'si 5 formil THF olarak bulunur. Total vücut

Folat miktarı 11 ile 28 mg arasındadır ve bunun yarısı KC'de depolanmıştır. Folatın esas olarak depolanan form THF ve 5 metil THF'tir. İntraselüler Folat bağlayıcı protein Folatın depolanmasını sağlar (63).

Kanda Folat, 1/3'ü serbest halde ve 2/3'ü plazma proteinlerine bağlı monoglutamat olarak bulunur. Kandaki Folatı, Folat bağlayıcı protein yüksek affinite ile bağlar. Albümin ve alfa-2 makroglobülin ise Folata düşük affinite ile bağlanır. Folat kanda en sık THF şeklinde olup ayrıca 5 metil THF, 10 formil THF şeklinde de bulunur (19, 63). KC, renal tübül ve hemotopoetik hücreler gibi birçok hücrede Folat, Folat reseptörü tarafından hücre içine alınır.

Tek karbon birimlerinin taşıyıcısı olarak görev yapan Folat, hücrenin sitozol ve mitokondrisinde bulunur. Folat özellikle hızlı bölünen dokular için kritik öneme sahiptir. Folat dengesi bu dokular için önemlidir. Hücre içindeki konsantrasyonu poliglutamat sentez hızına bağlı olarak değişir. Metabolik aktivitesi düşük olan dokularda Folat, monoglutamat formunda KC'e geri döner. KC'den de proliferen olan Folat hücrelere tekrar dağıtılır. Fakat Folat dolaşımının nasıl yönetildiği tam bilinmemektedir (63).

Folat, böbrekten değişmeden idrar yoluyla, KC'den de metabolize olarak feçes ile atılır. Para-aminobenzoil poliglutamat Folatın oksidatif yıkımı sonucu meydana gelir, glutamat rezidüleri (birisi hariç) hidrolize edilir ve N-asetil paraaminobenzoil glutamat formuna dönüştürülerek ana üriner atılım formuna dönüştürülür. KC tarafından Folat safra sıvısına sekrete edilir ve sekrete edilen Folatın büyük kısmı enterohepatik dolaşım ile tekrar geri emilir. Folatın dışkıyla kaybı minimaldir (63)

2.2.3. Folik Asit Kaynakları

Ispanak, lahanası, brokoli, yer fıstığı ve şalgam gibi yeşil sebzelerle ayrıca baklagiller, turunçgil (çilek ve portakal) ve karaciğer Folat içerir (24,63). Gıdaları pişirirken aşırı ısıtma, kaynatırken fazla su kullanma; Folat kaybına neden olur (11). İnsanların günlük 320 µg (diyetsel Folat eşdeğeri) Folata ihtiyacı vardır. Bu miktar Folatın alınabilmesi için 400 µg (diyetsel Folat eşdeğeri) Folat içeren diyet alınmalıdır. Gebelikte ve laktasyonda ihtiyaç artar. Gebelikte 600 µg, laktasyon

döneminde 500 µg/gün Folat önerilir. Bir diyetset Folatın eşdeğeri, 1 µg yemek Folatına eşittir. Bu ise Folat destekli yiyeceklerde 0.6 µg Folata, ilaç olaraksa 0.5µg Folata eşittir (64)

Besinlerdeki Folik asit içeriği Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. Bazı Besin Ögelerinde Bulunan Porsiyon Başına Folik Asit Düzeyleri

SEBZELER (haşlanmış)	FOLİK ASİT (µg)	MEYVELER	FOLİK ASİT (µg)
Brüksel lahanası	110	Portakal	30
Ispanak	90	Greyfurt	25
Brokoli	65	Portakal suyu	20
Yeşil fasulye	55	Muz	15
Marul (çiğ)	55	TAHILLAR	
Karnabahar	50	Beyaz ekmek	30
Bezelye	45	Kepekli ekmek	40
Taze mısır	35	Spagetti (haşlanmış)	4
Lahana	30	Pirinç (haşlanmış)	4
Patates eski	25	DİĞER BESİNLER	
Patates taze	20	Karaciğer yağda pişmiş	240
Domates (çiğ)	15	Ceviz	77
Havuç	15		
Salatalık (çiğ)	9		

2.2.4. Folik Asit Eksikliğinin Nedenleri

Folik asit eksikliğinde fizyolojik durumlar, nütrisyonel eksiklik, emilim bozuklukları (çöliak, tropikal spure, ülseratif kolit vb.), hemolitik anemi, sigara-alkol ve ilaçlar gibi birçok faktör etkilidir (66). Hemolitik anemi, demir eksikliği anemisi, kemik iliğini infiltre eden neoplaziler, ihtiyacın artması nedeniyle Folat eksikliği açısından risk oluşturur.

Hızlı büyümenin olduğu yeni doğan ve adolosan döneminde Folat ihtiyacı artmaktadır. Plasentanın hızlı büyümesi nedeniyle hamilelikte ve süttteki yüksek affiniteli Folat bağlayıcılar nedeniyle laktasyon döneminde Folik asit gereksinimini artar (11). Yaşlılarda diyetset eksiklik Folat eksikliğine neden olmaktadır (67).

Folat eksikliği yapan başlıca ajanlar; oral kontraseptifler, nitroz oksit, Folik asit antimetabolitleri, antikonvülzanlardır. Metotreksat 10-methyl-tetrahydrofolate analogudur, dihidrofolat reduktaz enzimini kompetitif olarak inhibe eder. Bunun sonucunda DNA sentezi durur. DNA sentezinin durması sonucu pürin sentezi azalır ve dolayısıyla hücre bölünmesi engellenir. Bu mekanizma, ilaç- enzim etkileşmesi Folat düzeylerinin azalmasına ve idrarla atılımının artmasına neden olur (11, 25, 66).

Dihidrofolat reduktaz enzimleri bazı bakteri ve parazitlerde insandakinden farklıdır. Bu enzimlerin inhibitörleri antibakteriyel (Trimetoprim) ve antimalaryal (Primetamin) olarak kullanılabilir. Bu ilaçlar Folik asit eksikliği yaptıklarından gebelerde teratojenik etki gösterir (25).

Fenitoin, fenobarbital ve karbamezapin gibi antikonvülzan ilaçlar Folatın absorpsiyonunu azaltırlar. Folatın KC'de metabolizmasını arttırarak Folat eksikliğine neden olabilirler (11, 66).

2.2.5. Folik asit Serum Düzeyi Ölçümü ve Referans Aralığı

Serum Folat referans aralığı Kemilüminesan Mikropartikül İmmuno Assay yöntemiyle 3-20 ng/mL olarak kabul edilmiştir. Serum Folat seviyesi < 3 ng/ml ise Folat eksikliği mevcuttur. Eritrosit içi Folat konsantrasyonu doku Folatının durumunu daha iyi yansıtır, eritrositin sentez edildiği dönemdeki Folat seviyesini gösterir. Eritrosit Folat konsantrasyonu < 140 ng/ml ise Folat eksikliği düşünülür (65).

2.3. HOMOSİSTEİN

2.3.1. Homosisteinin Genel Özellikleri

Homosistein, proteinlerin yapısına katılmayan ve sülfür içeren bir aminoasittir. Homosistein diyetle alınmayıp, metiyonin metabolizmasında ara ürün olarak oluşur. Plazmada %70-80'i albumine bağlıdır. Serbest kısmı stabil olmayıp, hemen homosistin ve homosistein disülfite dönüşmektedir. Hem bağlı hem de serbest olan kısmı total Homosistein düzeyini yansıtmaktadır (68).

2.3.2. Homosistein Metabolizması

Memeli diyetlerindeki sülfür içeren tek aminoasit metiyonindir. Hayvansal kökenli proteinde bulunan ve diyetle alınan metiyonin, metionin adenozil transferaz enzimi aracılığı ile demetile olarak metil vericisi olan S-adenozilmetiyonine (SAM), S-adenozilmetiyonin ise yapısında bulunan metil grubunu, glisin gibi metil alıcılara vererek transferaz enzimleriyle S- adenozil homosisteine (SAH) dönüşmektedir. Hidrolaz enzimi ile katabolize olan SAH, Homosistein (hcy) ve adenozin oluşturmaktadır. Remetilasyon ve transsülfürasyon, Homosistein metabolizmasında başlıca iki yoldur (69) (Şekil 4).

Homosistein, transsülfürasyon yolunda sistatyonin beta sentaz (CBS) enzimi vasıtası ile serin aminoasidi ile birleşerek sistatyonini oluşturur. Sistatyonin, gama sistatyonaz enzimi tarafından daha sonra sisteine dönüşmektedir. Sistein idrarla atılmadan önce sülfata dönüşür. Bu metabolik yolun regülatör enzimi CBS'dir. Enzimin kofaktörü Vitamin B6'nın aktif formu olan pridoksal 5 fosfattır. Remetilasyonla, Homosistein metiyonine dönüşür. Betain-homosistein metil transferaz (BHMT) enzimi ve metiyonin sentaz (MS) (5-metiltetrahidrofolat-homosistein metiltransferaz) enzimi bu reaksiyonda görevli olan enzimlerdir. BHMT enzimi temel olarak karaciğerde bulunur. Az miktarda olmak üzere böbrekte de bulur. Enzim çinko içerir ve metil vericisi olarak betaini kullanır. Hayvan dokularında yaygın olarak bulunan MS enzimi ise, 5-metiltetrahidrofolatı metil vericisi, Vitamin B12'yi ise kofaktör olarak kullanmaktadır. Metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi aracılığıyla 5-10 metilen tetrahidrofolat, 5-metil tetrahidrofolata (5-metil THF) dönüşür. MTHFR folik asiti kofaktör olarak kullanmaktadır. Vitamin B12 bağımlı enzim olan MS, 5-metil THF'nin bir metil grubunu Homosisteine aktararak metiyonini oluştururken, diğer tarafta da THF meydana gelir. Sonra THF, tekrar 5-10 metilen THF'ye dönüşür (70).

2.3.3. Homosistein Serum Düzeyi Ölçümü ve Referans Aralığı

Homosisteinin kan değeri genellikle 5-15 $\mu\text{mol/L}$ düzeyindedir. Normalde Homosistein düzeyi idrarda ölçülemeyecek kadar azdır. Tandem Mass Spektrometri, ELİSA, MEİA ve benzeri yöntemlerle ölçüm yapılabilir. Ancak Homosistein'in

kanda ölçümü için en geçerli ve “gold standart” kabul edilen ölçüm yöntemi “high performance liquid chromatography”(HPLC) yöntemidir. Homosistein düzeylerinde postprandial yükselmeler olabilmesi nedeniyle en az 12 saat açlıktan sonra test yapılması önerilmektedir. Oda sıcaklığında bekleme Homosistein düzeylerini artırabilir. Alınan numune tüplerine spesifik S-adenozil Homosistein hidrolaz inhibitörleri veya florid eklenmesi glikolize bağlı sorunları engelleyebilir. Kan örnekleri zaman kaybetmeden santrifüjlenmelidir (71).

Son yıllarda HPLC yönteminin pahalı ve uzun bir prosedür olması nedeniyle İmmünokemilüminesan yöntemle çalışan kitler kullanılmaya başlanmıştır.

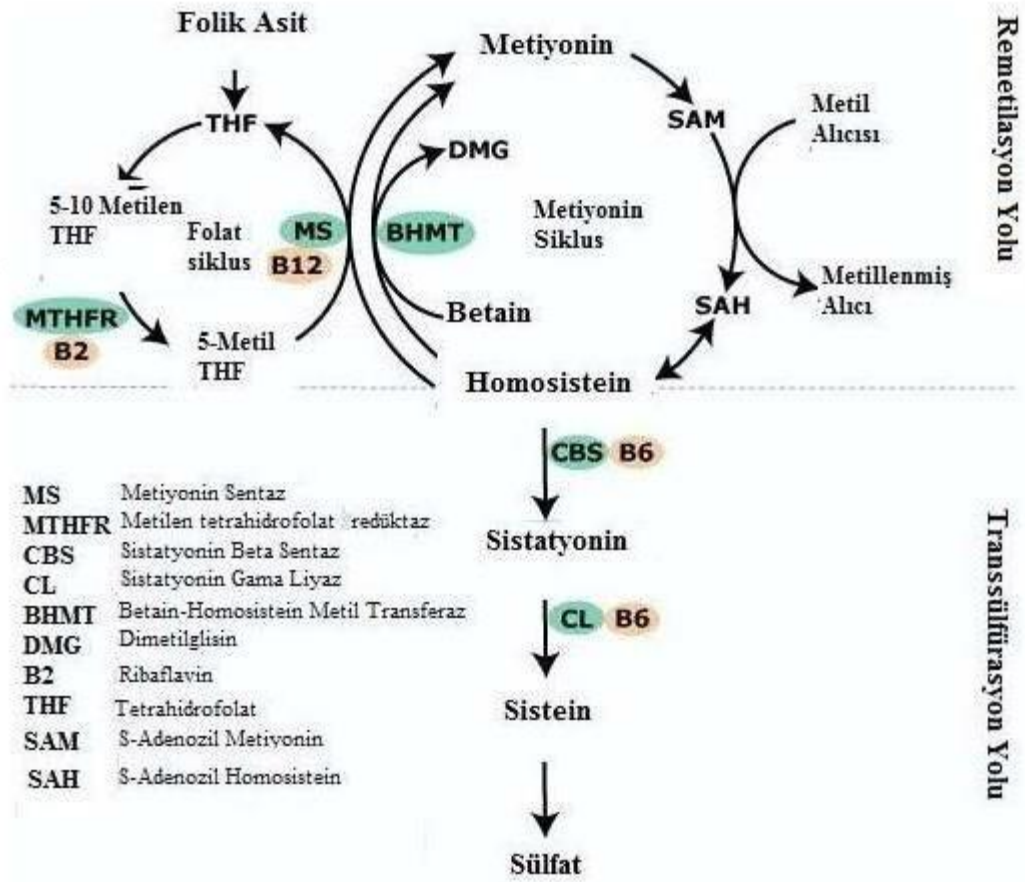
2.3.4. Homosisteinemi ve Homosistinüri

Vitamin eksiklikleri hiperhomosisteinemi etyolojisinde rastlanılan en sık etkendir. Homosistein metabolizmasında kofaktör olan folik asit, B12 ve B6 vitaminlerinin diyetteki eksiklikleri, Homosisteinin plazma düzeylerinde artışa yol açmaktadır (72).

Ateroskleroz ve tromboz gibi vasküler hastalıklar için bağımsız risk faktörü olarak hiperhomosistinemi gösterilmiştir (73). Homosisteinin direkt olarak kan damarları duvarını ve özellikle de endotel hücrelerini etkileyerek fonksiyonel değişikliklere neden olduğu bilinmektedir (74).

Yapılan çalışmalarda hiperhomosisteineminin vasküler endotel hasarı sonucu endotelde disfonksiyon yaparak, endotel bağımlı vazodilatasyon kaybına yol açtığı ve endotel bağımlı antitrombotik özellikleri engellediği ve vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (75-83).

Homosisteinin direkt proagregatör etkisine veya endotel bağımlı trombosit inhibisyonunun bozulması görülen belirgin trombosit kümelenmesinin sekonder nedeni olabilir (81). Çalışmalarda, endotelin normal antitrombotik özellik gösterirken hiperhomosisteinemi nedeniyle protrombotik fenotipe dönüştüğü ve faktör V, faktör VIIa ve faktör XII aktivitesinin arttığı, antitrombinin ve protein C nin inhibe olduğu, trombomodülin ekspresyonunun azaldığı, doku faktör ekspresyonunun arttığı, heparin sülfat ekspresyonunun azaldığı ortaya konmuştur (82, 83).



Şekil 4. Homosistein Metabolizması

2.4. HOLOTRANSKOBALAMİN

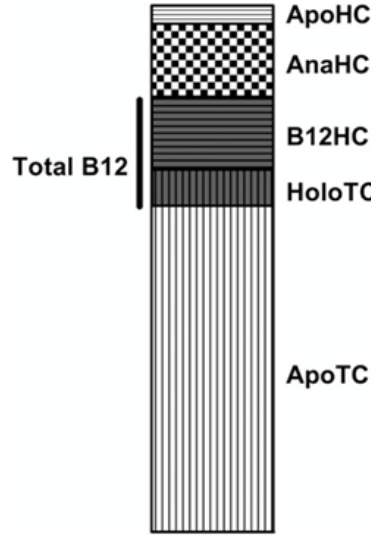
2.4.1. Holotranskobalaminin Genel Özellikleri

Vitamin B12 plazmada 2 proteine bağlanır, transkobalamin ve haptokorrin. (Şekil 3) Transkobalamin dolaşımdaki Vitamin B12 nin çok az bir bölümünü yaklaşık %10 luk bir kısmını bağlayabilir (84).

Transkobalamin–Vitamin B12 kompleksine Holotranskobalamin (Holo-TC) denir. Transkobalamin Vitamin B12’yi tüm hücrelere taşır. Taşınan Vitamin B12 yaklaşık olarak günlük 4 nmol dür (85).

Diğer taşıyıcı protein olan haptokorrin ise dolaşımdaki Vitamin B12 nin büyük bir kısmını bağlar. Haptokorrinin fonksiyonu bilinmemektedir ve haptokorrine

bağlanan Vitamin B12 inaktif form olarak kabul edilmektedir. Haptokorrinin turnover günlük 0.1 nmol gibi çok düşük bir düzeydedir (22, 23).



Şekil 5. Plazma Vitamin B12 (kobalamin) ve Bağlayıcı Proteinler

İnsan plazmasında bulunan Vitamin B12 (kobalamin) ve bağlama proteinlerini göstermektedir. Şekil plazmada Vitamin B12 bağlayıcı proteinlerin toplam konsantrasyonu ve Vitamin B-12 dağılımını, protein analogları arasındaki ilişkiyi göstermektedir (7).

Kullanılan konsantrasyonlar ortalama değerlerdir transkobalamin: 1000 pmol / L' [holotranskobalamin (HoloTC): 100 pmol / L; apotranskobalamin (ApoTC): 900 pmol / L]; Toplam haptokorrin: 450 pmol / L [B-12 Vitamini (B12HC) haptokorrin bağlı: 200 pmol / L; haptokorrin bağlı B-12 analogları (AnaHC): 200 pmol / L; apohaptokorrin (ApoHC): 50 mmol / L]; toplam B-12 Vitamini: 300 pmol / L.

Transkobalamin in yarı ömrü ~18 saattir ve Vitamin B12 alımındaki değişikliklere duyarlıdır (85). Vitamin B12 alımından 3 saat sonra HoloTC kanda tespit edilebilir ve maksimum plazma konsantrasyonuna 8–12 saatte ulaşır. HoloTC dolaşıma geçtikten dakikalar sonra hücrelere alınır (85).

Haptokorrin–Vitamin B12 kompleksi (HoloHC) ile HoloTC'nin, dolaşımdaki yarı ömrü karşılaştırıldığında HoloTC'nin yarı ömrü daha kısadır. HoloTC ölçümünde saptanan azalma kobalamin eksikliğinin erken bir belirteci olabilir (86, 87).

Vitamin B12 eksikliğinin belirlenmesinde holotranskobalamin ve haptokorrinin ölçüm metodları geliştirilmiştir ve tanı koymada kullanılabilir (88, 89, 90).

Günümüzde Vitamin B-12 eksikliğinin teşhisinde HoloTC'nin total Vitamin B-12 ölçümünden çok daha uygun görüldüğü sonucuna ulaşılmıştır. Buna karşın,

günümüze değin, HoloTC geniş bir klinik kabul görmemiştir. Bunun temel sebebi olarak testin maliyeti ve testin sınırlı kullanımını gösterilmiştir (7).

Buna rağmen yapılan çalışmalar HoloTC'nin Vitamin B12 seviyesini gözlemlemek için mükemmel bir marker olacağını göstermekle birlikte bu öngörüyü doğrulayacak çalışmalara halen ihtiyaç olduğunu göstermektedir (7).

Haptocorrin in genetik yokluğu ciddi bir durum değildir ve nadir görülmektedir (91). Diğer taraftan transcobalamin'in genetik yokluğu veya anomalileri Vitamin B12 eksikliğindeki tipik hematolojik, nörolojik ve metabolik patolojiler ile kendini gösterir (92, 93, 94).

2.4.2. Holotranskobalamin Serum Düzeyi Ölçümü ve Referans Aralığı

HoloTC dolaşımdaki toplam transkobalamin'in %5-20'sini teşkil etmektedir (95). Vitamin B 12 yetersizliği olan hastalarda toplam transkobalamin değişmediği gözlemlenmiştir. (7). Ancak transkobalaminin genotipi, yaş ve cinsiyet gibi faktörler göz önüne alındığında HoloTC nin referans intervalinde küçük farklılıklar meydana gelebildiği gösterilmiştir (90, 96, 95, 97, 98).

Bu faktörler nedeniyle oluşan varyasyonlara ilişkin raporlar nispeten az sayıdadır ve yaş, cinsiyet ve ırka dayalı ayarlanmış referans intervallerinin belirlenmesi ihtiyacı doğmadan önce bu konuya odaklanan yeni çalışmaların yapılmasının gereği çeşitli yayınlarda vurgulanmıştır (7).

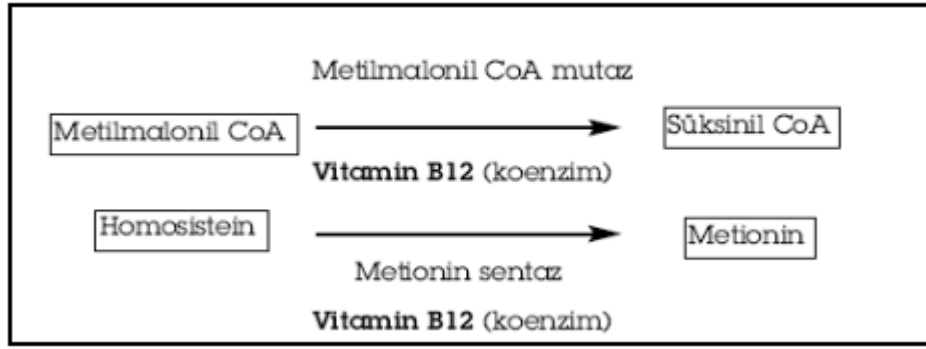
HoloTC referans intervali ile ilgili mevcut konsensus 40-200 pmol/L oranında bir referans intervalinin uygun olduğu yönündedir Ebba Nexo ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda klinisyenlerin ve araştırmacıların, holoTC'yi günlük klinik pratiklere dahil etmeden önce HoloTC referans intervalinin laboratuvar çalışmalarıyla lokal olarak onaylamaları gerektiğini vurgulamıştır (7).

2.5. METİL MALONİK ASİT

2.5.1. Metil Malonik Asit Genel Özellikleri

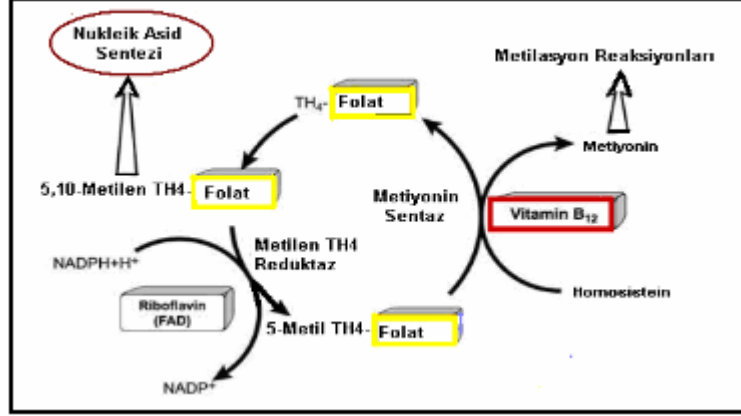
Metilmalonik asit normal koşullarda metabolize edilebilen ve bu nedenle itrahi çok az olan bir organik asittir (99).

Vitamin B12, vücutta iki tepkimeye koenzim olarak katılır: bir metil grubunun metiyonin yapmak üzere N5–metil tetrahidrofolat’dan Homosisteine taşınması (metiyonin sentaz reaksiyonu) ve L–metil malonil KoA’nın metil grubunun süksinil KoA yapmak üzere yeniden düzenlenmesi (metil malonil KoA mutaz reaksiyonu) (14).



Şekil 6. Vitamin B12'nin Koenzim Olarak Görev Aldığı Reaksiyonlar

Metiyoninin 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 metiyonin sentaz enzimi aracılığı ile Homosisteine aktarır ve metiyonin sentezlenir. Metiyonin daha sonra, metil grubunu diğer bileşiklere aktarmak üzere S–Adenozil Metiyonin (SAM) haline çevrilir (14). Bu tepkimenin metabolik yararları, metiyonin depolarının sürdürülmesi ve pürin, pirimidin ve nükleik asit sentezine katılacak tetrahidrofolat formlarının sağlanmasıdır (100).



Şekil 7. Vitamin B12–Folik Asit Metabolizmalarının İlişkisi

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 teksayıda 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 da önem taşır.

Vitamin B12 eksikliğinde bu enzim sistemi iyi çalışmamakta ve bu nedenle kanda metilmalonik asit birikimi olmaktadır. Serumda artan metilmalonik asit böbrekten itrahi artacağı için idrarda da ölçülebilir değerlere çıkar.

Metilmalonik Asit düzeyi hücre içi Vitamin B12 eksikliğinin en iyi göstergesi olarak kabul edilir. Ayrıca metilmalonik asit Homositein gibi Folattan etkilenmediği için Vitamin B12 eksikliğinin en iyi göstergesi olarak kabul edilir. Ancak yöntemin kısıtlılığı ve test maliyetinin fazla olması testin çalışılmasının önündeki en büyük engeldir.

2.5.2. Metilmalonik Asit Plazma Düzeyi Ölçümü ve Referans Aralığı

Metilmalonik Asit'in gaz kromatografik ölçüm yöntemi 1950'lerin sonlarından itibaren bilinmektedir. 1979'da çok daha duyarlı bir gaz

kromatografi/kütle spektrometri metodu geliştirilmiştir. Pek çok modifikasyona sahip duyarlı kılcal gaz kromatografi/kütle spektrometri ölçüm yöntemleri serumdaki küçük konsantrasyonların doğru ve kesin biçimde ölçümünü mümkün kılmıştır. Otomasyon sistemleri geliştikçe, serum MMA belirleme yöntemleri daha geniş kullanıma kavuşmuştur.

Plazma ve idrar MMA değerleri farklı olsa da LC-MS/MS yöntemi ile ölçülen plazma MMA referans aralığı 0-0,4 µmol/L olarak kabul edilmektedir.

2.6. REFERANS ARALIĞI

2.6.1. Referans Aralığı Tanımı

Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization; WHO), sağlıklı olmayı, fiziksel, mental, sosyal refah durumlarını da göz önünde bulundurarak tanımlamaktadır (101).

Bireyin sağlıklı veya sağlıksız olduğu kararına referans verilere başvurularak karar verilmektedir. Referanslar anamnezlerden, muayenelerden ve laboratuvar sonuçlarından elde edilebilir (101,102). Biyokimyasal testler, tanının konmasında, tedavi takibinde, prognoz seyrinde, taramada yer almaktadır (103).

Biyokimyasal testlerin biyokimya laboratuvarlarında yorumlanması sırasında referans aralıklarına başvurulmaktadır (104).

Referans değeri bir referans bireyinde belirli bir fenotipin gözlemlenmesi ya da ölçülmesi ile elde edilen değere denir. Referans kitlesi örnek bir popülasyondan seçilen referans bireylerin oluşturduğu topluluğa denir. Referans kitlesinden elde edilen sonuçlar bir dağılım oluşturacak ve bu dağılıma istatistiksel analizler uygulandığı zaman da dağılımın belli bir bölümünü içine alan alt ve üst değerler bulunacaktır. Böylece dağılımın belli bir yüzdesini alt ve üst değerlerin içine alındığı kesim ifade edecektir. Günümüzde bu kavramlar kullanılırken normal değer ya da normal aralık sözcükleri kullanılmamaktadır. Çünkü normal terimi kişiden kişiye göre değişebilecek bir kavramdır. Bireyden bireye değişebilen bu değerlerin hangisinin normal olarak tanımlanacağını belirlemek çok zordur (105).

Normal değerler terimi farklı anlamlar içerebilmesi nedeniyle, referans değerler teriminin kullanılmasının daha doğru olacağı ifade edilmiştir. Normali açıklamak için bazı tanımlamalar yapılmıştır (103, 106, 107, 108).

Bu tanımlamalar:

- 1) Bireyin normal değeri: Sağlıklı dönemde bireyden elde edilmiş değer
 - 2) Optimum sağlık durumundaki bireylerden elde edilen verilere dayalı değerler
 - 3) Kohort (eş grupları) normalleri: Hasta grubunu temsil eden sağlıklı toplumdan elde edilen değerler
 - 4) Genel toplum normalleri: Hastanın seçildiği toplumun tüm fertlerini temsil eden gruptan elde edilen normal değerler
 - 5) İstatistiksel olarak: Gaussian dağılım gösteren veriler grubu (biyolojik veriler çoğunlukla normal dağılım gösteren çan eğrisi grafiğine uymamaktadır)
 - 6) Epidemiyolojik olarak: Toplum taramaları sırasında çok görülen değerler normal kabul edilmektedir
 - 7) Klinik olarak: Normal sözcüğü belirli bir hastalığın veya hastalık gelişme riskinin yokluğunu göstermektedir
- şeklinde ifade edilmektedir.

Bir testin bir birey için normal değerinin tespit edilmesi, ancak o test bireye uygulandığı zaman anlaşılabilir. Bu değerin önceden bilinmesi tercih sebebidir. En zor karar bireyin hangi sağlık durumunun normal olarak kabul edileceği aşamadır. Bu belirledikten sonra da, bir kişiden elde edilen değerlerin bir başka kişiyle benzeme olasılığı düşüktür. Bu nedenle, kişinin kendisine ait eski sonuçları ile değerlendirme yapılması sayesinde en ideal referans değere ulaşmak mümkündür. Fakat herkes için bu koşulların sağlanması zor ve masraflıdır. Bu bile yapılırsa bireylerin hayatlarının farklı dönemlerinde farklı sağlık durumları olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (109).

Bulgu veren bir patolojiye sahip olmayan bireyler, normal olarak kabul edilecek olursa, bu bireylerden elde edilen referans değerlerini, hasta olan kişilerin test sonuçlarını değerlendirmek için kullanmak, yanlış referans aralığı kullanmak olacaktır. Bundan dolayı, "normal" terimi kullanılmasından uzaklaşılmış ve karşılaştırmada temel alındığı için, "referans" teriminin kullanılmasının daha uygun olacağı dūřünmüřtür (106, 107).

Her bireyin yaşadığı topluma gōre değerlendirilmesi önemlidir, her laboratuvar kendi toplumuna ait referans değerlerini bulması ve uygulaması gerekmektedir. Ancak her laboratuvarın bu içi yapması ve uygulaması oldukça zaman kaybına ve masrafa neden olmaktadır. Bu nedenle, belirli kriterlere gōre seçilmiş bōlgelerden elde edilecek Homojen referans grupları oluşturularak, referans aralıklar hesaplanabilir. Laboratuvarlar arasında kullanılan analiz yöntemlerine ve cihazlara gōre birbirlerine evrilebilirler. Önemli olan husus, (103) referans aralıkların, kullanıldıkları toplumu temsil edebilme özelliğinin ne olduğudur (106).

2.6.2. Referans Bireylerin Seçimi

2.6.2.1. Referans Bireyler ve Dışlama Kriterleri

Referans aralığının saptanmasında ki en önemli aşamalardan biri referans bireylerinin seçimi aşamasıdır. Bunun için referans birey tanımı, sağlık veya ilgilenilen hastalık ile ilgili kriterlerin ne olduğu iyi bilinmelidir (101).

Referans bireyler muayene edilen adaylar arasından daha önceden tanımlanmış kriterlere uyan bireylerin seçilmesi ile saptanır. Referans popūlasyon, bir çalıřmada olması istenen, hedeflenen bir grubu temsil eder. Bu popūlasyon kiřinin kendisi olabileceęi gibi, saęlıklı kabul edilen popūlasyon ya da hastane popūlasyonu da olabilir (104, 110).

Örnek referans kitlesi referans popūlasyonundan belli kriterler dikkate alınarak elde edilecek bireylerin oluşturduğu topluluğa denir. Örnek referans kitlesini oluşturacak bireylerin seğimi sırasında doğrudan ve dolaylı örneklendirme yöntemi adı verilen iki yöntem kullanılabilir (103).

Doğrudan örneklendirme: Doğrudan örneklendirme IFCC (International Federation of Clinical Chemistry; Uluslararası Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbi Federasyonu) tarafından önerilen ve bazı kriterler kullanılarak hasta seçiminin yapılmasıdır. Bu kriterlere dışlama kriterleri denilmektedir (103).

Referans bireyler seçiminde dikkate alınması gereken dışlama kriterleri arasında; alkol alımı, yakın zamanda kan vermek veya almak, hipotansiyon veya hipertansiyon, reçeteli veya reçetesiz ilaç kullanımı, ilaç bağımlılığı, yakın zamanda hastalık hikayesi, gebelik, emzirme, obezite, sigara, vitamin kullanımı, yoğun egzersiz, yakın zamanda ameliyat olmak, kronik hastalıklar, oral kontraseptif kullanımı yer almaktadır (111).

Bu kriterler IFCC tarafından önerilen ve ayrıca NCCLS' nin (National Committee for Clinical Laboratory Standards; Klinik Laboratuvar Standartları Ulusal Komitesi) ilgili dökümanlarında da bulunan dışlama kriterleridir. Bireyler seçilirken bu faktörlerin etkisi altında olup olmadığına dikkat edilmelidir. Bu kriterler seçim esnasında göre iki şekilde kullanılabilir: Test öncesi örnekleme (Apriori) yönteminde dışlanma kriterleri bireyler seçim aşamasında kullanılır. Test sonrası örnekleme (Aposteriori) yönteminde ise elde bir veri kitlesi vardır ve bu kriterler test sonrası kullanılır (111, 103). Apriori yönteminde ileriye dönük, aposteriori yönteminde ise geriye dönük bir dışlanma mevcuttur (101).

Aposteriori yöntemine göre dışlanmanın yapılabilmesi için elimizde çok iyi şekilde düzenlenmiş bir veritabanı olması gereklidir (103).

IFCC ve NCCLS klavuzları referans bireylerin doğrudan örneklendirme yöntemiyle seçilmelerini önermektedir. Ancak doğrudan örneklendirme yöntemindeki uygulama zorlukları ve masraflı olması sebebiyle çok fazla kullanılmamaktadır (103).

Dolaylı Örneklendirme: Bir başka yöntem ise dolaylı örneklendirme. Birçok laboratuvar verilerini direk örneklendirme kriterlerine göre düzenleyemediği için dolaylı yöntem daha fazla kullanılmaktadır. Bu yöntemde elimizde bir veri kitlesi vardır ve bu veri grubu dışlama kriterlerine göre bir ayıklama yapılmadan olduğu gibi alınır (103).

Dolaylı örnekleme yönteminde laboratuvarlarda elde sonuçların büyük bir kısmı Gaussian bir dağılım göstermeseler bile normale yakın bir dağılım görülmektedir. Çok miktarda aşırı uç değer ya da gruplaşma olmamak şartı ile bu dağılımda bulunan Gaussian tipe uyan bölümler alınabilir. Dolaylı örnekleme yöntemi ile elde edilen verilerin değerlendirilebilmesi için çeşitli istatistiksel analiz yöntemleri geliştirilmiştir (103).

Bu yöntemler bazı dezavantajlar barındırmaktadır. Kullanılabilecek birden fazla yöntem olması ve elde edilen alt ve üst referans değerlerin kullanılan yöntemdeki matematiksel metodlara bağlı olması en büyük dezavantajlardır. Bir başka dezavantaj ise; elde edilen referans aralıkları o hastanenin belli bir zaman dilimini göstermesidir. Bulunan bu değerler hastaneden hastaneye farklılıklar gösterebilmektedir. Bu şekilde elde edilen referans değerlerin daha geniş bir popülasyona uygulanmasının sakıncalar doğurabileceği düşünülmektedir (103).

Referans aralığı hesaplanırken dolaylı örnekleme yolu kullanılması düşünülüyorsa veri toplanması aşamasında uyulması gerekenler şöyle sıralanabilir (103);

- 1) Kullanılacak örnek dağılımın, referans popülasyonunun bir parçası olması gerekmektedir. Hastane popülasyonu dışındakiler değerlendirilmeye dahil edilmemelidir.
- 2) Örnek referans dağılımı ünimodal olmalı, homojeniteyi bozacak gruplaşmalar olmamalıdır.
- 3) Verilerin yoğunlaştığı bölge, dağılım moduna uygunluk göstermelidir (112).

Dolaylı örnekleme, doğrudan örnekleme yöntemine göre daha kolay bir yöntemdir. Ancak dağılımda birden fazla modun olduğu (bimodal) bir görünüm varsa, hasta tanısı ve demografi kullanılarak muhtemel gruplaşmalar ortadan kaldırılmalıdır (103).

Sonuçta örnekleme her iki yolla da yapılabilmekte ve bu yöntemlere göre seçilen referans bireyler, farklı istatistiksel metotlarla değerlendirilmektedir. Doğru bir veri seçimi yapılırsa dağılımlarda uç değerlere ve gruplaşmaya rastlanma olasılığı

azalacaktır. Kullanılan bir diğerkriter de hastanın taburcu olduğunda kayıtlara geçen tanısıdır. Bu tanı yardımıyla hastanın tüm test sonuçları yerine sadece bazı test sonuçları dışlanmakta ve tanıda belirtilen patolojinin etkilemediğı test sonuçları örnek referans kitlesine dahil edilebilmektedir (113).

2.6.2.2. Referans Kitlesinin Gruplandırılması

Referans aralığı hesaplanırken verileri gruplara ayırmanın gerekli olup olmadığı fikrine karar vermek önemlidir. Elde edilen verilerin Gaussian dağılıma uyması istenir. Ancak biyolojik veriler genellikle Gaussian bir dağılım oluşturmazlar. Bunun nedeni, dağılım içinde modülasyona yol açabilecek faktörlerin olabileceğı düşünölmektedir (103).

Bireyler arasındaki olabilecek varyasyonların en aza indirilmesi gruplara ayırma da ki en önemli nedendir. Sınıf içi varyasyon ne kadar az olursa daha doğru referans aralığı hesaplanabilir. Sınıflar arasında istatistiksel açıdan farklılık izlenirse elde edilen referans değerleri alt gruplara ayrılarak dağılımın homojenitesi sağlanmalıdır (101).

Dağılımlardaki gruplaşmaya veya alt gruplara ayrılmaya neden olan faktörler arasında; en fazla yaş ve cinsiyet vardır. Ayrıca ırk, coğrafi yerleşim, gebelik, kan grubu, açlık ve tokluk, sigara ve alkol, beslenme alışkanlığı, eksersiz, örnek alım saati, postür, menstruel siklus dağılımlardaki gruplaşmaya veya alt gruplara ayrılmaya neden olan faktörlerdir (103).

Bu dikkat edilmesi gereken bir durumdur. Gruplara veya alt gruplara ayırma kriterlerinden bazılarının aynı zamanda gruptan dışlama kriterleri olarak da kullanılabilmektedir (101, 114, 115).

2.6.3. Referans Aralık Tayininde Veri Sayısının Önemi ve Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Referans aralıklarının belirlendiğı çalışmalarda kullanılması gereken veri sayısının ne kadar olması gerektiğı de önemli bir aşamadır. Veri sayısının çok olması referans aralık değerlerinin daha doğru ve güvenilir olmasını sağlayacaktır. Referans

aralığının saptanmasında kullanılan istatistiksel yöntemler parametrik ve parametrik olmayan yöntemler olarak ikiye ayrılır. Her iki yöntemden hangisinin kullanılması gerektiği, dağılım tipine ve veri sayısına bakılarak karar verilir. Bu nedenle önce dağılım tipinin ne olduğunun saptanması gerekir. Bunun için dağılıma etki edebilecek uç değerler ve veri sayısı gibi faktörler dikkate alınmalıdır. Olası etkileri en aza indirmek ve metodun güvenilir olmasını sağlamak için kullanılması gereken veri sayısının kaç olduğu saptanmalıdır (103).

İstatistikte verilerin analiz edilmeleri için gerekli veri sayısı hesaplama yöntemleri belirlenmiştir (116). Yapılan çalışmalarda, referans aralığın hesaplanabilmesi için 120 verinin yeterli olduğu saptanmıştır (111).

Bu veri sayısında dağılımın %2,5 - %97,5'inci noktalarına denk gelen yerler saptanacaktır. Normal olmayan dağılımda, merkezi %95 alan içindeki verilerin, hem referans aralık sınırları hem de referans aralık sınırlarının %90 güven aralıklarının hesaplanması için yeterli olduğu kabul edilmektedir (103).

NCCLS C28-A3 (117) klavuzu, parametrik olmayan yöntemlerde, 120 verinin %90 güven aralığı için yeterli olacağını ileri sürmektedir (103).

Özellikle orijinal yöntemlerin düşük veri sayılarında da uygulanabilir hale getirmek için modifiye yöntemler geliştirilmiştir. 120 veri kullanıldığında yöntemler arasında fark çok az iken veri sayısı düştüğü zaman özellikle parametrik olmayan yöntemlerin etkisi azalmaktadır. 120 verinin altındaki veri (118) sayılarında modifiye parametrik olmayan yöntemler ile iyi sonuçlar alınmıştır. Parametrik yöntemlerle, en az 30 veri ile de çalışma yapılabileceğinin mümkün olduğunu ileri sürülmektedir (111).

Sonuç olarak, eğer dağılımımız gaussian dağılıma dönüştürülemiyorsa 120 altında ki veri sayısı ile çalışma yapmak zordur. Bu gibi durumlarda ya modifiye parametrik olmayan yol kullanılmalı yada 120 veri sayısına ulaşip modifiye edilmemiş parametrik olmayan yöntemler kullanılmalıdır (119).

Bir dağılımda uç değerlere rastlanılabilir. Dağılımdaki uç değerlerin çıkartılmasında bazı metodlar kullanılır. Bunlar Dixon metodu, Blok prosedürü, Standart Sapmanın kullanılması, Grubbs T istatistiği, Boxplot Çizimlerinde Cut-Off Bulma Yaklaşımı gibi bazı istatistiksel metodlardır (111).

2.6.4. Referans Dağılımın İncelenmesi

Verilerin görsel olarak kolayca incelenebilmesi için veriler histogram haline getirilmelidir. Histogramın incelenmesi istatistiksel tekniklerin yanlış kullanımını engelleyebilir. Dağılım histogramı incelenirken dikkat edilmesi gereken hususlar mevcuttur (101);

- 1) Aşırı uç verilerin bulunup bulunmamasına bakılmalıdır
- 2) Birden fazla tepe noktası olan (bimodal veya polimodal) dağılımlar birden fazla alt grubun bulunduğunu gösterir

Bu gibi durumlarda referans bireylerinin seçiminde kullanılan kriterler yeniden gözden geçirilerek yaş, cinsiyet ve diğer faktörlere göre gruplara ayırma işlemleri tekrar değerlendirilmelidir.

2.6.5. Referans Aralığı Tayininde İstatistiksel Yöntemler

Referans aralığı tayininde kullanılan parametrik ve parametrik olmayan yöntemlerin kendi içerisinde birçok modifiye yöntemleri vardır. Bu modifiye yöntemler, yöntemin gücünün artırılması ve düşük veri sayılarında daha doğru ve güvenilir sonuçlar vermesi için yapılır. Bu modifikasyon yöntemleri gaussian dağılıma dönüşmeyen dağılımlar için kullanılır, çünkü normal bir dağılım olduğunda Gaussian yöntemler (parametrik yöntemler) (120) kullanılır. Bu yöntemler düşük veri sayılarında da doğru sonuçlar verebilir. Ancak biyolojik verilerde Gaussian olmayan dağılımların daha sık olması nedeniyle çoğunlukla parametrik olmayan yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin dezavantajı daha yüksek veri sayılarının olmasına ihtiyaç duymasıdır. Bu problemler modifikasyon yöntemleri ile aşılmaya çalışılmıştır (111, 121).

2.6.5.1. Parametrik Yöntemler

Gaussian karakter gösteren dağılımlar; ortalama değer, standart sapma, medyan gibi dağılımın şeklini belirten parametreler tarafından tanımlanırlar. Gaussian karakterdeki dağılımlarda parametrik yöntemler kullanılır. Bu yöntem

parametrik olmayan yöntemlere göre zor bir yöntemdir. Fakat elde edilen güven aralıkları daha dar çıkmaktadır. Parametrik yöntemler iki grupta incelenir (103, 101):

1- Parametrik yüzde tahmini yöntemi

2- Parametrik tolerans aralığı yöntemi

Parametrik yüzde tahmin yönteminde, %2,5-%97,5'lik bir bölgenin sınırlarını oluşturan alt ve üst değerler aranır. Bu aralık dağılımın %95'ini yansıtır (111).

Parametrik tolerans aralığı yönteminde, dağılımın %95'i belli bir olasılık içerisinde tanımlanır. %90'ın altında olasılıklarda parametrik tolerans aralığı yöntemi ile çok geniş referans aralıklarının ortaya çıktığı görülmüştür. Bunu ancak çok yüksek veri sayıları ($n \geq 1000$) kullanıldığı takdirde engellenebilir. Elde edilen %95'lik alan dağılım sonuçlarında farklı yerlerde lokalize olabilir (122).

Referans aralığının çok geniş tutulması testin tanısal gücünün azalmasına neden olur. Tam tersine %95 olasılıkta ise çok dar bir aralık ortaya çıkar. Bu nedenlerden dolayı bu yöntem, parametrik yüzde tahmini yöntemine göre daha az tercih edilir.

2.6.5.2. Parametrik Olmayan Yöntemler

Parametrik olmayan yöntemleri 3 grupta incelenir (111, 103, 107):

1) Parametrik olmayan yüzde tahmini yöntemi

2) Parametrik olmayan tolerans aralığı yöntemi

3) Modifiye parametrik olmayan yöntemler

Bu yöntemlerin en büyük avantajı gaussian olmayan dağılımlarda kullanılabilmesidir. Bu sayede referans bireylerinin seçimi kolaylaşır. Referans bireyler seçimi, bu yöntemle ile hiçbir kritere bağlı olmadan alınır. Parametrik olmayan yöntemler için veri sayısının 120 olması önerilmiştir. Düşük denek sayılarında ise parametrik olmayan yöntemler yetersiz kalmaktadır. Modifiye yöntemler bu gibi problemlerin aşılması için geliştirilmiştir (103).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. ÇALIŞMA TASARIMI VE KATILIMCI ÖZELLİKLERİ

Çalışmamızda serum Vitamin B12 ile ilişkili parametreler olan Vitamin B12, Folik Asit, plazma Homosistein, Holotranskobalamin ve MMA in ülkemizde araştırılmamış olan referans aralığının bulunması hedeflenmiştir.

Çalışmamıza Ekim 2014-Mayıs 2015 tarihleri arasında Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi kan bankasına ve polikliniklerine başvuran 18-65 yaş arası sağlıklı gönüllüler dahil edildi. Gönüllülere kan bankası ve polikliniklerle iş birliği yapılarak ilgili birimlerin yönlendirmesi ile ulaşıldı. Çalışmaya alınacak gönüllülere çalışmanın içeriğinin anlatıldığı form okutulup imzalatılarak onamları alındı.

Çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterleri aşağıda gösterilmiştir:

Dahil Edilme Kriterleri:

1. 18-65 yaş aralığında bulunan,
2. Herhangi bir sistemik hastalığı bulunmayan,
3. Bitkisel kaynaklı dahil hiçbir ilaç kullanmayan,
4. Vitamin preperatı kullanmayan,
5. Daha önce Vitamin B12 tedavisi almamış olan,
6. Gönüllü olmayı kabul etmiş sağlıklı bireyler.

Dışlanma Kriterleri:

1. Son 1 haftadır Vitamin B12 metabolizmasını etkileyen herhangi ilaç kullanmış olmak (buna ağızdan alınan multi vitamin tabletleri kullananlar dahildir).
2. Oral kontraseptif kullanan bayan hastalar

3. Son 3 ay içinde 1000 µg veya son 1 ay içinde 100 µg intramuskuler Vitamin B12 tedavisi almış olanlar,
4. Son bir hafta içinde akut enfeksiyon geçirmiş olanlar,
5. Kronik bir hastalığı olanlar (sistemik inflamatuvar hastalıklar, KC ve böbrek hastalıkları),
6. Gebe olanlar,
7. Son 3 ay içinde doğum yapmış olanlar,
8. Tam kan sayısı düşük olup anemi kriterlerine uyan,
9. Hepatit belirteçleri pozitif olan kişiler,
10. Cerrahi girişim sonucu midesi veya ince bağırsaklarının bir kısmı kısmen alınmış olanlar.

Çalışmamız için 703 birey ile görüşüldü. 31 birey çalışmaya katılmayı reddetti. 19 gönüllünün kronik hastalığı olduğu görüldü. 12 gönüllü son üç ay içerisinde ilaç kullandığı için çalışmaya dahil edilmedi. 1 gönüllü lenfoma tedavisi görmüş olması nedeniyle çalışmaya dahil edilmedi. 18 gönüllüde hipokrom mikrositer anemi 2 gönüllüde makrositer anemi tespit edilmesi, 23 gönüllünün incelenen değerlerinde CRP yüksekliği tesbit edilmesi nedeniyle çalışmamıza dahil edilmedi. 4 gönüllü karaciğer fonksiyonlarının, 13 gönüllü böbrek fonksiyonlarının yüksek olması nedeniyle çalışmamıza dahil edilmedi. 39 gönüllünün alınan numunelerinde hemoliz tespit edilmesi nedeniyle çalışmamıza dahil edilmedi.

Plazma MMA referans aralık çalışması için toplam 450 gönüllünün numunesi çalışıldı. Çalışma sonuçları incelendiğinde 6 numune örnek yetersizliği nedeniyle çalışma dışı bırakıldı. 40 numunede çalışılan plazma MMA değerleri içerisinde çok aşırı uç değerler olduğu tespit edilmiş ve bu değerler çalışmamızın ortalamasında ileri derecede sapmaya yol açması nedeniyle, çalışma dışı bırakıldı.

Gönüllülülerden bir kırmızı kapaklı biyokimya tüpü ve bir adet mor kapaklı tüp alındı. Alınan numunelerden kırmızı kapaklı biyokimya tüpü öncelikle 4000 rpm de 5 dk santrifüj edildikten sonra ayrılan serum 500 µL lik üç tüpe ayrıldı. Ayrılan numunelerden birinden biyokimya parametreleri (BUN, Kreatin, CRP, AST, ALT, T.

Bilirubin, D. Bilürubin, Na, K, Cl, Ca) çalışıldı. Diğer tüpe ayrılmış olan serumdan hormon parametreleri (T3, T4, TSH, Feritin, Vitamin B12, Folat) çalışıldı. Üçüncü tüpe ayrılan serum -80°C de Holotranskobalamin çalışılmak üzere saklandı.

Mor kapakla alınmış olan EDTA lı kan örneğinden önce tam kan sayımı çalışıldı. daha sonra 4000 rpm de 5 dak santrifüj edilerek plazma kısmı ayrıldı. 500 µL iki tüpe ayrıldı. Birinci tüpteki plazmadan plazma Homosistein düzeyi bekletilmeden çalışıldı. Diğer plazma MMA çalışılmak üzere -80° Clik dolaba ayrıldı.

Serum Vitamin B12, Folat ve Homosistein düzeyleri numuneler bekletilmeden aynı gün çalışıldı. Plazma MMA analizi numuneler alındıktan sonra 60 ar günlük peryotla anlaşmalı dış laboratuvarında 3 grup halinde çalışıldı. Bu süreçte -80 ° C lik dolapta numuneler saklandı. Holotranskobalamin analizi için toplanan numuneler 4 er aylık iki peryotta çalışıldı. Numuneler -80°C de saklandı.

Çalışmamızda Vitamin B12 (n=541 ort. yaş: 31,1), Folat (n=541 ort. yaş: 31,1), Homosistein (n=416 ort. yaş: 32,8), holotranskobalamin (n=416 ort. yaş: 32,3) ve metil malonik asit (n=404 ort. yaş: 32,8) olmak üzere Vitamin B12 ile ilgili belirteçler çalışıldı.

Her bir çalışma grubu, kendi içerisinde cinsiyet ve yaş grupları göz önüne alınarak ayrıldı.

Cinsiyetlere göre gönüllüler ayrıldığında Vitamin B12 ve Folat için 195 erkek (ort yaş: 35,8) 346 kadın (ort yaş:28,4), Homosistein için 164 erkek (ort. yaş: 37,3) 252 kadın (ort. yaş:29,8), Holotranskobalamin için 156 erkek (ort yaş: 37,05) 260 kadın (ort. yaş: 29,5), metilmalonik asit için 156 erkek (ort. yaş: 37,1) 248 kadın (ort. yaş: 30) çalışmamıza dahil edildi.

Yaş grupları 18-25, 26-35, 36-45, 46-55, 56-65 olarak ayrıldı.

Vitamin B12 referans aralığı için 18-25 yaş aralığında 318, 26-35 yaş aralığında 75, 36-45 yaş aralığında 42, 46-55 yaş aralığında 43 ve 56-65 yaş aralığında 63 gönüllü numunesi çalışıldı.

Folat referans aralığı için 18-25 yaş aralığında 318, 26-35 yaş aralığında 75, 36-45 yaş aralığında 42, 46-55 yaş aralığında 43 ve 56-65 yaş aralığında 63 gönüllü numunesi çalışıldı.

Plazma Homosistein referans aralığı için 18-25 yaş aralığında 216, 26-35 yaş aralığında 66, 36-45 yaş aralığında 38, 46-55 yaş aralığında 40 ve 56-65 yaş aralığında 56 gönüllü numunesi çalışıldı.

Plazma MMA referans aralığı için 18-25 yaş aralığında 211, 26-35 yaş aralığında 59, 36-45 yaş aralığında 37, 46-55 yaş aralığında 39 ve 56-65 yaş aralığında 58 gönüllü numunesi çalışıldı.

Gönüllüler anemi yönünden değerlendirildi ve çalışmaya katılan tüm gönüllülerin Hemoglobin, MCV, MCHC, Hematokrit gibi parametrelerinin normal sınırlar arasında olmasına dikkat edildi.

3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN TESTLER

3.2.1. Vitamin B12, Folat, Homosistein, Holotranscobalamin ve MMA

Vitamin B12, Folat ve Homosistein için alınan serum örnekleri aynı gün içinde çalışılmıştır. Holotranskobalamin 4 er aylık periyotlarla numuneler biriktirilerek çalışıldı. Numuneler gönüllülerden alındıktan sonra -80°C de saklandı. MMA anlaşmalı dış laboratuvarın kuryesi tarafından 60 günlük periyotlarla laboratuvarımızdan alındı ve 60 ar günlük üç periyotta çalışıldı. Numuneler gönüllülerden alındıktan sonra -80°C de saklandı.

Vitamin B12: Abbott Architect i2000 (2015 Abbott Laboratories. Abbott Park, Illinois, U.S.A.) cihazında insan serumu ve plazmasında bulunan Vitamin B12'in belirlenmesi için Kemilüminesan Mikropartikül İmmünolojik Test (CMIA) teknolojisi ile chemifleks olarak adlandırılan esnek tetkik protokoller kullanan otomatik örnek ön hazırlıklı olan iki adımlı bir tetkiktir. Örnek ve pre-treatment reaktif 1, pre-treatment reaktif 2 ve pre-treatment reaktif 3 birleştirilir. Ön hazırlanmış örneğin bir aliquotu aspire edilir ve ikinci bir (Reaksiyon kabına) RV'ye transfer edilir. Ardından, ön hazırlanmış örnek tetkik dilüenti ve intrinsik faktör kaplı paramanyetik mikropartiküllerle birleştirilir. Örnekte mevcut Vitamin B12,

intrinsik faktör kaplı mikropartiküllere tutunur. Yıkamadan sonra, Vitamin B12-akridinium etiketli konjugat ikinci adımda ilave edilir. Pre-trigger ve trigger solüsyonları reaksiyon karışımına ilave edilir, Elde edilen kemilüminesan reaksiyon relatif ışık üniteleri (RLU'lar) olarak ölçülür. Örnekteki Vitamin B12 miktarı ve ARCHITECT *i* optik sistemi ile tesbit edilen RLU'lar arasında ters orantı bulunmaktadır.

Üretici firma tarafından Vitamin B12 tetkiki düşük, orta ve yüksek kontrol aralığındaki konsantrasyonlar için \leq %11 toplam %CV (Coefficient of Variation) lik keskinliğe sahip olacak şekilde tasarlanmıştır. Üretici firma tarafından rapor edilen kalite kontrol verilerine göre Vitamin B12 testi için tekrarlanabilirlik Tablo 5'te özetlenmiştir.

Tablo 5. Abbott ARCHITECT Vitamin B12 testine ait tekrarlanabilirlik sonuçları

	İntraassay	İnterassay
	%CV	%CV
Serum Panel	4.8	6.2
Düşük kontrol aralığında olan konsantrasyonlar için	5.6	6.2
Orta kontrol aralığında olan konsantrasyonlar için	3.4	6.8
Yüksek kontrol aralığında olan konsantrasyonlar için	4.0	4.9

Kitin referans aralığı olarak 187-883 pg/mL verilmiştir.

Folik asit: Abbott Architect *i* 2000 cihazında insan serumu, plazması ve kan hücrelerinde bulunan Folatın kantitatif belirlenmesi için CMIA teknolojisi ile chemifleks olarak adlandırılan esnek tetkik protokoller kullanan iki adımlı bir tetkiktir.

Folatın endojenik Folat bağlayıcı proteinden salınması için iki ön hazırlık adımı aracılık yapmaktadır. Ön hazırlık adımı 1 de örnek ve ön hazırlık reaktif 2 Dithiothreitol (DTT)aspire edilip bir RV ye pipetlenir. Ön hazırlık adımı 2 de örnek\ön hazırlık reaktif 2 karışımının bir aliquotu aspire edilir ve ikinci bir RV'ye dispense edilir. Ardından, ön hazırlık reaktif 1 potasyum hidroksit (KOH) eklenir. Ön hazırlığa tabi tutulmuş örneğin bir aliquotu üçüncü bir RV ye transfer edilir ve ardından Folat Bağlayıcı protein (FBP) kaplı paramanyetik mikropartiküller ve

tetkik spesifik dilüent eklenir. Örnekte mevcut Folat, FBT kaplı mikropartiküllere tutunur. Yıkamadan sonra pteroiik asit- akridinium etiketli konjugat eklenir ve FBT-kaplı mikropartiküllerde boş bölümlere tutunur. Pre-trigger ve trigger solusyonları reaksiyon karışımına ilave edilir, Elde edilen kemilüminesan reaksiyon RLU'lar olarak ölçülür. Örnekteki Folat miktarı ve ARCHITECT i optik sistemi ile tesbit edilen RLU'lar arasında ters orantı bulunmaktadır.

Üretici firma tarafından Folat tetkiki düşük, orta ve yüksek kontrol aralığındaki konsantrasyonlar için \leq %12 toplam %CV lik keskinliğe sahip olacak şekilde tasarlanmıştır. Üretici firma tarafından rapor edilen kalite kontrol verilerine göre Folat testi için tekrarlanabilirlik Tablo 6'da özetlenmiştir.

Tablo 6. Abbott ARCHITECT Folat testine ait tekrarlanabilirlik sonuçları

	İntraassay	İnterassay
	%CV	%CV
Düşük kontrol aralığında olan konsantrasyonlar için	3.5	3.9
Orta kontrol aralığında olan konsantrasyonlar için	1.7	3.8
Yüksek kontrol aralığında olan konsantrasyonlar için	1.6	3.1

Kitin referans aralığı 3,1-20,5 ng/mL olarak verilmiştir.

Holotranscobalamin: Abbott Architect i2000 cihazında insan serumunda, bulunan Aktif B12 (Holotranscobalamin)'in kantitatif belirlenmesi için CMIA teknolojisi ile chemifleks olarak adlandırılan esnek tetkik protokoller kullanan iki adımlı bir tetkiktir. Birinci adımda numuneye anti-holotranscobalamin kaplı paramanyetik mikropatiküller konulur. Numunenin içindeki holotranscobalamin ile anti-holotranscobalamin kaplı mikropatiküller bağlanır ve yıkama yapılır. İkinci adımda anti-transcobalamin acridinium bağlı konjugat reaksiyona eklenir. Yıkamadan sonra pre-trigger ve trigger solusyonları reaksiyon karışımına ilave edilir, Elde edilen kemilüminesan reaksiyon relatif ışık üniteleri (RLU'lar) olarak ölçülür. Örnekteki holotranscobalamin miktarı ve ARCHITECT i optik sistemi ile tesbit edilen RLU'lar arasında direkt orantı bulunmaktadır.

Üretici firma tarafından HoloTC tetkiki düşük, yüksek kontrol aralığındaki konsantrasyonlar için \leq %8 toplam %CV lik keskinliğe sahip olacak şekilde

tasarlanmıştır. Üretici firma tarafından rapor edilen kalite kontrol verilerine göre HoloTC testi için tekrarlanabilirlik Tablo 7’de özetlenmiştir.

Tablo 7. Abbott ARCHITECT HoloTC testine ait tekrarlanabilirlik sonuçları

	İntraassay	İnterassay
	%CV	%CV
Düşük kontrol aralığında olan konsantrasyonlar için	4.2	4.9
Yüksek kontrol aralığında olan konsantrasyonlar için	3.0	5.3

Kitin referans aralığı 25,1-165 pmol/L olarak verilmiştir.

Plazma Homosistein: Abbott Architect i2000 cihazında insan plazmasında bulunan total L-Homosisteinin kantitatif belirlenmesi için CMIA teknolojisi ile chemifleks olarak adlandırılan esnek tetkik protokoller kullanan tek adımlı bir tetkiktir.

Bağlı veya dimerize Homosistein yapısı DTT ile serbest Homosisteine dönüştürülür, Rekombinant enzim olan s-adenozil homosistein hidrolaz (rSAHHase) aşırı adenozin varlığında S-Adenozil Homosisteine (SAH) oluşturur. SAH, monoklonal antikorlara bağlanmak için acridinium bağlı S- Adenozil Sistein ile yarışır. Yıkamadan sonra durağan ve mayetik ayrıştırma sonrasında pre-trigger ve trigger solusyonları eklenerek reaksiyon karışımına ilave edilir. Elde edilen kemilüminesan reaksiyon relatif ışık üniteleri (RLU’lar) olarak ölçülür. Örnekteki Homositein miktarı ve ARCHITECT i optik sistemi ile tesbit edilen RLU’lar arasında ters orantı bulunmaktadır.

Üretici firma tarafından Homosistein tetkiki düşük, orta ve yüksek kontrol aralığındaki konsantrasyonlar için \leq %10 toplam %CV’lik keskinliğe sahip olacak şekilde tasarlanmıştır. Üretici firma tarafından rapor edilen kalite kontrol verilerine göre Homosistein testi için tekrarlanabilirlik Tablo 8’de özetlenmiştir.

Tablo 8. Abbott ARCHITECT Homosistein testinde tekrarlanabilirlik sonuçları

	İntraassay	İnterassay
	%CV	%CV
Düşük kontrol aralığında olan konsantrasyonlar için	3.5	5.9
Orta kontrol aralığında olan konsantrasyonlar için	2.0	4.8
Yüksek kontrol aralığında olan konsantrasyonlar için	2.3	4.1

Kitin referans aralığı 5,08-15,39 µmol/L olarak verilmiştir.

Plazma Metil Malonik Asit: LC-MS/MS fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılan örnek moleküller kütle dedektörü ile analiz edilmektedir. Ayırma işlemi için Shimadzu Prominence LC ünitesi (Shimadzu, Tokyo, Japan) kullanılmıştır. Moleküller normalde yüklü partiküller değildir ve kütle spektrometreleri iyonizasyon işlemi ile molekülleri uyararak yüklü iyonize moleküller haline dönüştürülür.

Elektrosprey iyonizasyonda, örnek içeriği iyonize edilir ve daha sonra gaz faza transfer edilir. İyonize olan moleküller gaz faz ile iki kuadropolden oluşan ve kollizyon hücresi ile bağlı olan LS/MS'e geçer. Bu analitik yöntemde analitin LC/MS ölçümü Çoklu Reaksiyon İzleme modunda (Multiple Reaction Monitoring Mode, MRM) gerçekleştirilir. Bu modda, kütle/yük oranları (m/z) tanımlanmış olan, seçilmiş iyonlar (öncü iyon olarak bilinen) birinci quadropolde izole edilir ve daha sonra kollizyon hücresine transfer edildi. İyonlar burada, seçilen uygun voltaj ayarında, inert gaz etkisiyle (argon) frangmante edilir. Oluşan fragmanlar arasında (ürün iyonlar olarak bilinen), sadece m/z oranları tanımlanmış olanlar sonraki tespit için son quadropol tarafından izole edilirler. Böylece, MRM modda ölçüm, yüksek duyarlılık ve özgüllükte analitin kuantifikasyonunu sağlarken, ilgili bileşik için kütle transizyon özelliklerine dayanan analit tanımlamasının da gerçekleştirilmesini sağlar.

Üretici firma tarafından rapor edilen kalite kontrol verilerine göre plazma MMA testi için tekrarlanabilirlik ≤ 10 toplam %CV'lik keskinliğe sahip olacak şekilde tasarlanmıştır.

Kitin referans aralığı 0,1-0,4µmol/L olarak verilmiştir.

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmamızın istatistiksel analizi Ufuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi İstatistik Anabilim Dalı tarafından yapıldı.

İstatistiksel analizler için IBM *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS software v. 21, Chicago, IL, USA) ve referans aralık analizinde Reference Value Advisor v2.0 (117, 123, 124, 125) istatistik paket programları kullanıldı. Sayısal verilerin normal dağılım analizi histogram eğrileri, mod, ortanca, ortalama değerleri ve *Kolmogorov Smirnov* testleri dikkate alınarak yapıldı.

Referans değer saptamaya çalıştığımız 5 parametrenin de; serum Vitamin B12, Folat, HoloTC, plazma Homosistein ve plazma MMA düzeylerinin normal dağılım göstermediği görüldü. Parametrelerin ikili grup karşılaştırması *Mann Whitney U* testi ve çoklu grup karşılaştırması *Kruskal-Wallis* yöntemi ile incelendi. Gruplararası ikili karşılaştırması için Conover-Inmann testi kullanıldı. $P < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda Vitamin B12 (n=541 ort. yaş: 30,8±13,9), Folik asit (n=541 ort. yaş: 30,8±13,9), homosistein (n=416 ort. yaş: 32,6±14,7), holotranskobalamin (n=416 ort. yaş: 32,3±14,5) ve metil malonik asit (n=404 ort. yaş: 32,6±14,8) olmak üzere Vitamin B12 ile ilgili belirteçler çalışıldı.

Çalışmamızda, tüm gönüllülerde ölçülen Vitamin B12 ile ilişkili belirteçlerin referans aralıkları sırasıyla; Vitamin B12 139-583,7 pg/mL (300,5±117,2), Folat 3-13,6 (6,5±2,8)ng/mL, plazma Homosistein 5,6-17,6 (10,9 ±3,4) µmol/L, serum holotranskobalamin 10,3-101,1 (46,6±25,9) pmol/L, plazma MMA 0-0,8 (0,2±0,2) µmol/L olarak bulundu.

Çalışmamıza ait bulunan referans değerler, ortalamalar, standart sapma, minimum ve maksimum değerler Tablo 9’da özetlenmiştir.

Tablo 9. Vitamin B 12 İle İlişkili Belirteçlerin Referans Aralıkları

	n	Yaş	Min	Max	Medyan	Mean	Standart Sapma	Referans aralığı
B12	541	30,8±13,9	105	722	280	300,5	117,2	139-583,7 pg/ml
Folat	541	30,8±13,9	1,6	20	5,9	6,5	2,8	3-13,6 ng/ml
Homosistein	416	32,6±14,7	4,2	24,8	10,4	10,9	3,4	5,6-17,6 µmol/L
HoloTC	416	32,3±14,5	8,1	119,2	45,3	46,6	25,9	10,3-101,1 pmol/L
MMA	404	32,6±14,8	0	1,1	0,1	0,2	0,2	0-0,8 µmol/L

Çalışmamıza katılan tüm gönüllülerde çalışılan parametreler incelendiğinde, Homosistein ile MMA hariç diğer parametrelerin arasında anlamlı farklılık saptanmıştır (p<0,05).

Çalışmamızda parametreler arasında ki korelasyon incelendiğinde yalnızca Homosistein ile plazma MMA arasında korelasyon bulunmamıştır (r= - 0,03). Diğer parametrelerin birbirleriyle anlamlı korelasyonu olduğu tesbit edilmiştir (r > 0,05). Özellikle Vitamin B12 ile HoloTC arasında kuvvetli bir korelasyon bulunmuştur.

Ayrıca Yaş ile tüm parametreler arasında korelasyon bulunmaktadır. Yaş ile plazma MMA arasında negatif korelasyon ($r=-0,256$) diğer parametreler arasında pozitif korelasyon belirlenmiştir.

Testler arasındaki p değerleri ve korelasyonlar Tablo 10'da özetlenmiştir.

Tablo 10. Parametreler Arası Korelasyon ve p Değerleri

Spearman's rho			Yaş	VitB12	Folat	Homosistein	HoloTC	MMA
Spearman's rho	Yaş	r	1,000	0,092*	0,198**	0,103*	0,126*	-0,256**
		p		0,032	0,000	0,036	0,010	0,000
		N	541	541	541	416	416	404
	VitB12	r	0,092*	1,000	0,362**	-0,478**	0,780**	-0,263**
		p	0,032		0,000	0,000	0,000	0,000
		N	541	541	541	416	416	404
	Folat	r	0,198**	0,362**	1,000	-0,206**	0,336**	-0,184**
		p	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000
		N	541	541	541	416	416	404
	Homosistein	r	0,103*	-0,478**	-0,206**	1,000	-0,372**	-0,003
		p	0,036	0,000	0,000		0,000	0,952
		N	416	416	416	416	394	372
	HoloTC	r	0,126*	0,780**	0,336**	-0,372**	1,000	-0,198**
		p	0,010	0,000	0,000	0,000		0,000
		N	416	416	416	394	416	382
	MMA	r	-0,256**	-0,263**	-0,184**	-0,003	-0,198**	1,000
		p	0,000	0,000	0,000	0,952	0,000	
		N	404	404	404	372	382	404

r = Korelasyon Katsayısı

*. =Korelasyon 0.05 düzeyinde anlamlı (2-tailed).

** = Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlı (2-tailed).

Çalışmamızda, Vitamin B12 ve Folat referans aralık çalışmasına katılan 541 gönüllünün %36,04 ü erkek %63,96 sı kadın, Homosistein referans aralık çalışmasına katılan 416 gönüllünün %39,42 ü erkek %60,58 i kadın, holoTC referans aralık çalışmasına katılan 416 gönüllünün %37,5 i erkek, %62,5 i kadın ve plazma MMA referans aralık çalışmasına katılan 404 gönüllünün %38,61 i erkek, %61,38i kadındı.

Çalışılan parametrelerin cinsiyetler arası farklılıkları Mann-Whitney U testi ile incelendiğinde Vitamin B12 (p=0,899), Folat (p=0,624), Homosistein (p=0,911), HoloTC (p=0,534) ve MMA (p=0,070) in cinsiyetler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığı görüldü.

Çalışmamıza katılan gönüllülerin çalışılan parametrelere göre yaş-cinsiyet dağılımı ve gönüllü sayıları Tablo 11’de verilmiştir

Tablo 11. Testlere Göre Gönüllülerin Yaş Ortalaması ve Sayısı

Parametreler	Erkek Gönüllü Yaş (Mean±SD)	n	Kadın Gönüllü Yaş (Mean±SD)	n	Toplam Gönüllü Yaş (Mean±SD)	n
Vitamin B12	35,32±15,67	195	28,3±12,2	346	30,8±13,9	541
Folat	35,32±15,67	195	28,3±12,2	346	30,8±13,9	541
Homosistein	36,75±15,8	164	29,9±13,3	252	32,6±14,7	416
Holo TC	36,8±15,8	156	29,6±13,1	260	32,3±14,5	416
Plazma MMA	36,9±16,09	156	29,9±13,3	248	32,6±14,8	404

Çalışmamıza katılan gönüllülerin cinsiyetlerine göre çalışılan parametrelerin referans aralıkları incelendiğinde; erkeklerde Vitamin B12 referans aralığı 123,8-669,2 pg/mL, Folat 2,7-14,9 ng/mL, Homosistein 5,8-23,2 µmol/L, holoTC 9,4-96,6 pmol/l, plazma MMA 0-0,8 µmol/L olarak, kadınlarda; Vitamin B12 143-577,6 pg/mL, Folat 3,2-13,6 ng/mL, homosistein 5,4-17,4 µmol/L, holoTC 10,3-101,5 pmol/l, plazma MMA 0-0,8 µmol/L bulundu.

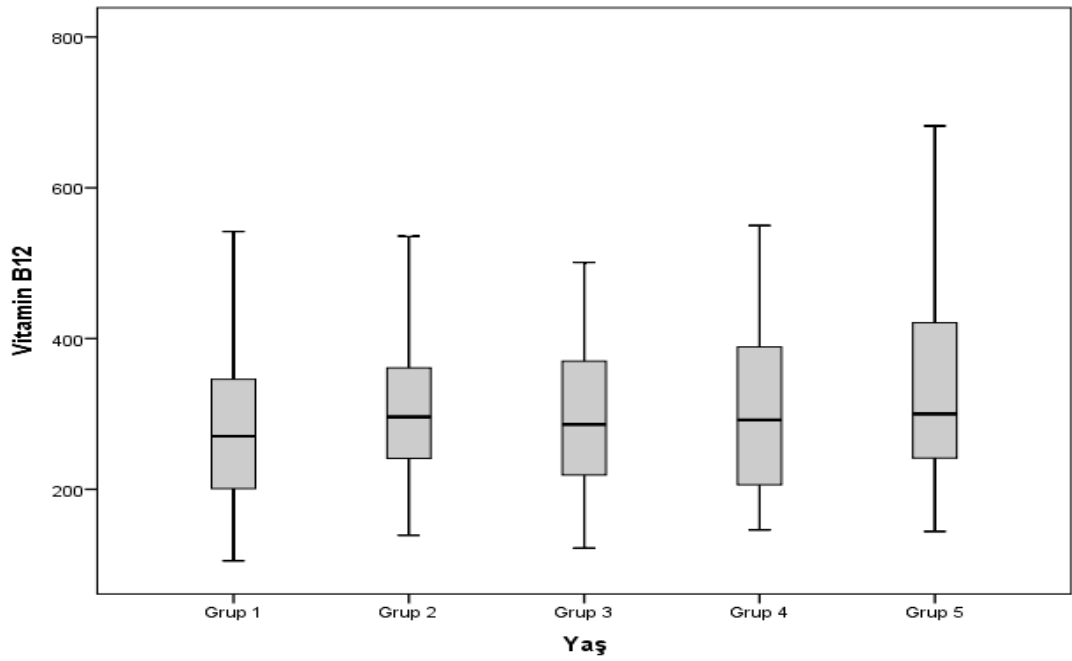
Çalışılan parametrelerin cinsiyetlere göre referans aralıkları ve çalışmaya katılan gönüllü sayıları (n) Tablo 12’de özetlenmiştir

Tablo 12. Cinsiyetlere Göre Çalışılan Parametrelerin Referans Aralıkları ve Gönüllü Sayıları

	Vitamin B12 (pg/mL)	n	Folat (ng/mL)	n	Homosistein (µmol/L)	n	HoloTC (pmol/L)	n	MMA (µmol/L)	n
Erkek	123,8-669,5 (301,8±125,8)	195	2,7-14,9 (6,5±2,8)	195	5,8-23,2 (11,7±3,6)	164	9,4-96,6 (47,5±24)	156	0-0,8 (0,2±0,2)	156
Kadın	143-577,6 (299,8±112,2)	346	3,2-13,6 (6,5±2,7)	346	5,4-17,4 (10,4±3,2)	252	10,3-101,5 (46±27)	260	0-0,8 (0,2±0,2)	248
Toplam	139-583,7 (300,5±117,2)	541	3-13,6 (6,5±2,8)	541	5,6-17,6 (10,9±3,4)	416	10,3-101,1 (46,6±25,9)	416	0-0,8 (0,2±0,2)	404

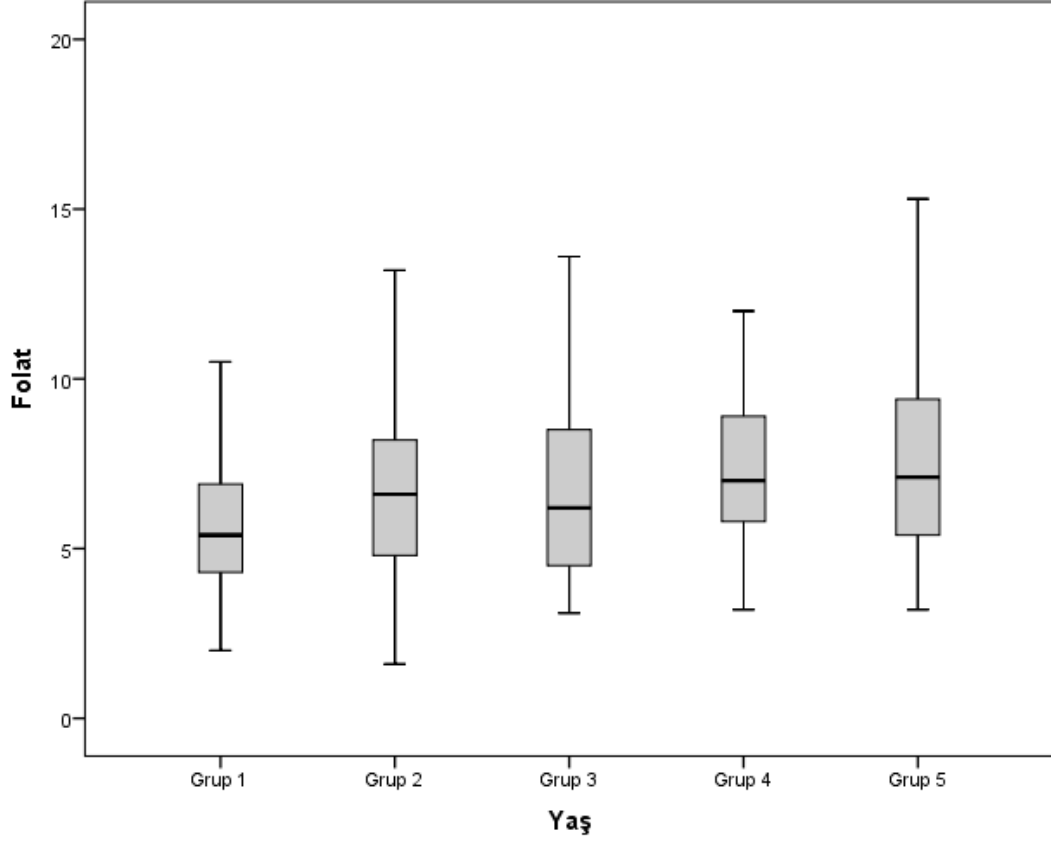
Çalışmamızda ayrıca yaş aralıklarına göre de referans aralık çalışması yapıldı. Bu nedenle genç-orta yaş gönüllüleri belirli yaş gruplarına göre ayrıldı. 18-25 yaş aralığına Grup I, 26-35 yaş aralığına Grup II, 36-45 yaş aralığına Grup III, 46-55 yaş arası Grup IV ve 56-65 yaş arasında olan gönüllüler Grup V olarak adlandırıldı.

Vitamin B12 nin yaş gruplarına göre referans aralığı incelendiğinde; 18-25 yaş aralığında (Grup I) 130,9-581,2 pg/mL, 26-35 yaş aralığında (Grup II) 146,2-599,3 pg/mL, 36-45 yaş aralığında (Grup III) 125,7-705,4 pg/mL, 46-55 yaş aralığında (Grup IV) 146,5-543,8 pg/mL, 56-65 yaş aralığındaki (Grup V) 159,6-649,6 pg/mL olarak saptandı (Şekil 8).



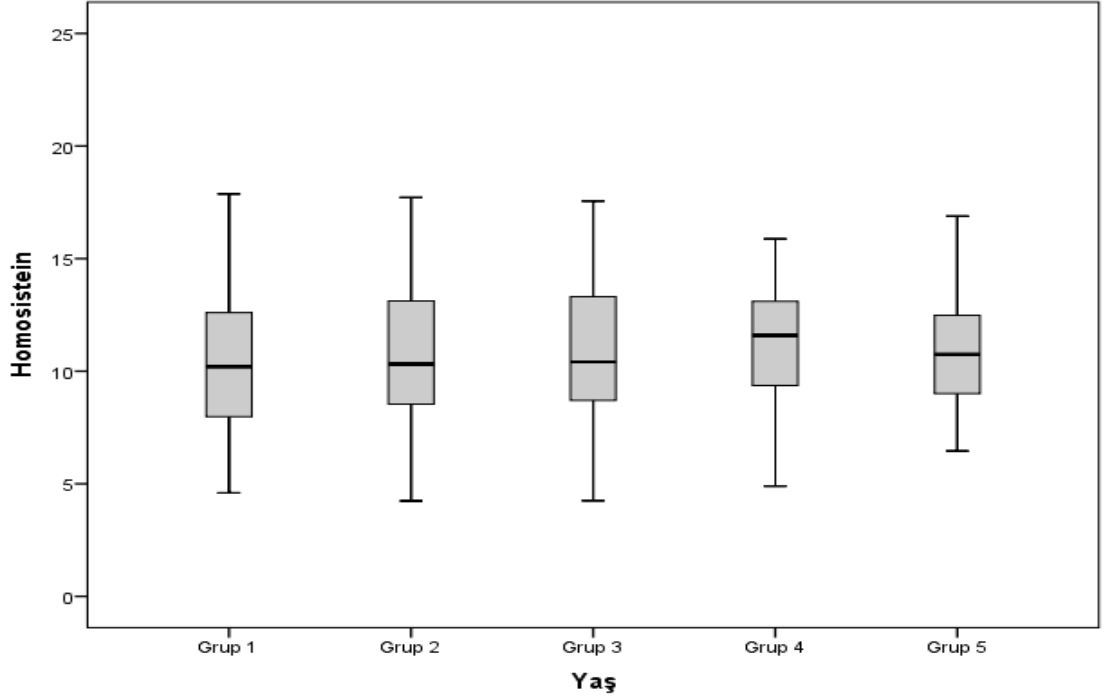
Şekil 8. Yaş grupları - Vitamin B12 düzeyi

Folat in yaş gruplarına göre referans aralığı Grup I de 2,7-11,3 ng/mL, Grup II de 2,9-16,9 ng/mL, Grup III te 3,1-19,7 ng/mL, grup IV te 3,2-16 ng/mL ve grup V te 3,3-17,9 ng/mL olarak saptandı (Şekil 9).



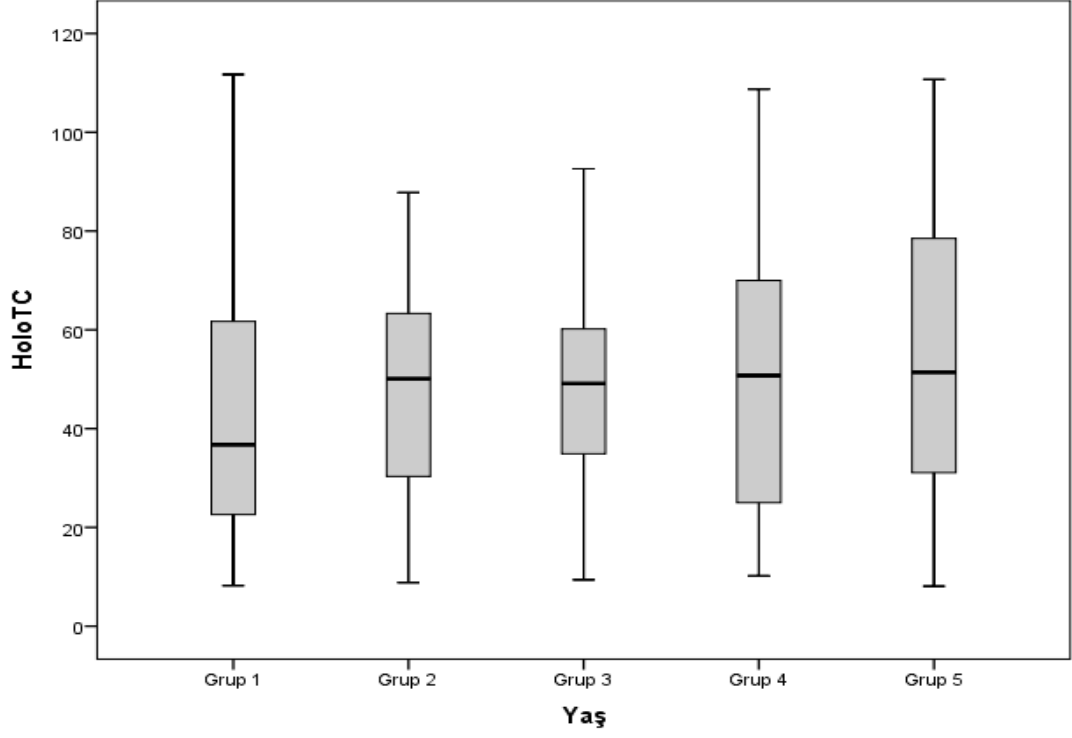
Şekil 9. Yaş grupları-Folat Düzeyi

Homositein in yaş gruplarına göre referans aralığı Grup I 5,4-22,3 $\mu\text{mol/L}$, Grup II 5,6-17,5 $\mu\text{mol/L}$, Grup III 5,4-19,9 $\mu\text{mol/L}$, Grup IV 4,9-16,1 $\mu\text{mol/L}$ ve Grup V te 6,7-20,6 $\mu\text{mol/L}$ olarak saptandı (Şekil 10).



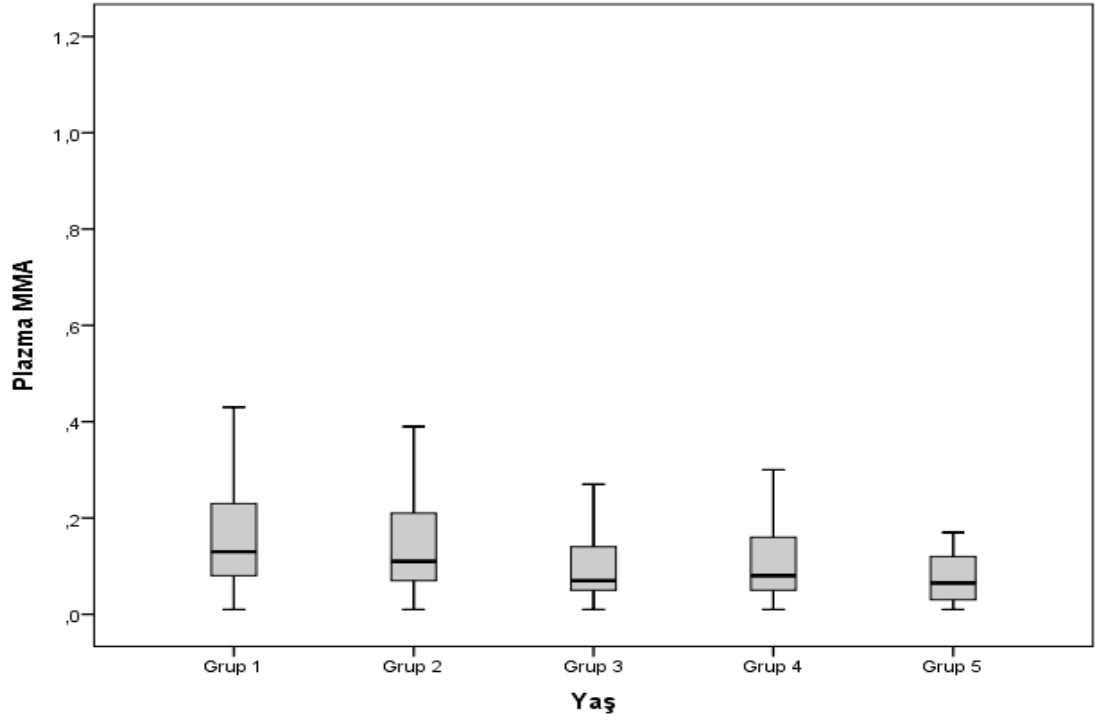
Şekil 10. Yaş grupları – Homositein düzeyleri

Holo TC nin yaş gruplarına göre referans aralığı; Grup I de 10,4-100,7 pmol/L, Grup II de 8,9-87,7 pmol/L, Grup III 8,6-103,3 pmol/L, Grup IV 10,2-108,5 pmol/L ve Grup V 8,4-107,9 pmol/L olarak saptandı (Şekil 11).



Şekil 11. Yaş grupları- HoloTC değerleri

Plazma MMA in yaş gruplarına göre referans aralığı Grup I 0-0,8 $\mu\text{mol/L}$, Grup II 0-0,6 $\mu\text{mol/L}$, Grup III 0-0,8 $\mu\text{mol/L}$, Grup IV 0-0,6 $\mu\text{mol/L}$ ve Grup V in 0-0,8 $\mu\text{mol/L}$ olarak saptandı (Şekil 12).



Şekil 12. Yaş grupları- Plazma MMA değerleri

B12 ile ilişkili belirteçlerin bu yaş gruplarındaki referans aralıkları Tablo 13’de özetlenmiştir.

Tablo 13. Yaş gruplarına Göre B12 ile İlişkili Belirteçlerin Referans Aralıkları

Testler		Yaş Grupları					Toplam (18-65)
		Grup I (18-25)	Grup II (26-35)	Grup III (36-45)	Grup IV (46-55)	Grup V (56-65)	
Vitamin B12 (pg/ml)	*RI	130,9-581,2	146,2-599,3	125,7-705,4	146,5-543,8	159,6-649,6	139-583,7
	Mean±SD	287,7±114,8	316,1±11,6	300,1±112,9	309,6±113	340,6±131,7	300,5±117,2
	n	318	75	42	43	63	541
Folat (ng/ml)	RI	2,7-11,3	2,9-16,9	3,1-19,7	3,2-16	3,3-17,9	3-13,6
	Mean±SD	5,8±2,1	6,8±3	7,6±4,1	7,5±2,6	7,8±3,5	6,5±2,8
	n	318	75	42	43	63	541
Homosistein (µmol/L)	RI	5,4-22,3	5,6-17,5	5,4-19,9	4,9-16,1	6,7-20,6	5,6-17,6
	Mean±SD	10,8±3,7	10,8±3,1	11±3,6	11,2±2,7	11,2±3,2	10,9±3,4
	n	214	66	38	38	60	416
Holo TC (pmol/L)	RI	10,4-100,7	8,9-87,7	8,6-103,3	10,2-108,5	8,4-107,9	10,3-101,1
	Mean±SD	43±26	47±21,4	49,8±24	51,1±28,9	54,1±27,8	46,6±25,9
	n	216	66	38	40	56	416
Plazma MMA (µmol/L)	RI	0-0,8	0-0,6	0-0,8	0-0,6	0-0,8	0-0,8
	Mean±SD	0,2±0,2	0,2±0,1	0,1±0,2	0,1±0,1	0,1±0,2	0,2±0,2
	n	211	59	37	39	58	404

*RI= Referans Interval

Çalışmamızda yaş grupları arasındaki Vitamin B12 ile ilişkili belirteçlerin farklarına bakıldı.

Çalışmamızda bulduğumuz Vitamin B12 değerlerinin yaş grupları arasındaki farklılığına baktığımızda, yaş gruplarında ölçülen Vitamin B12 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p=0,03).

Grup I(18-25 yaş) ile Grup V (56-65 yaş) arasında (p=0,03) ve Grup I (18-25 yaş) ile Grup II (26-35 yaş) arasında da (p=0,024) istatistiksel anlamlı fark saptandı. Diğer gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı.

Vitamin B12 için gruplar arası fark Tablo 14’te özetlenmiştir.

Tablo 14. Yaş Gruplarına Göre Vitamin B12 nin Gruplararası Farkı

Vitamin B12	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
Grup I	1	0,024	0,391	0,150	0,003
Grup II	0,024	1	0,439	0,769	0,455
Grup III	0,391	0,439	1	0,668	0,165
Grup IV	0,150	0,769	0,668	1	0,353
Grup V	0,003	0,455	0,165	0,353	1

p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir.

Çalışmamızda bulduğumuz Folat değerlerinin yaş grupları arasındaki farklılığına baktığımızda, yaş gruplarında ölçülen Vitamin B12 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. (p<0,001).

Folat değeri yaş gruplarına göre incelendiğinde Grup I(18-25 yaş) ile Grup II (26-35yaş) p=0,05; Grup I ile Grup III(36-45 yaş) p= 0,010; Grup I ile Grup IV (46-55 yaş) p<0,00; Grup I ile Grup V(56-65 yaş) p<0,001 arasında istatistiksel anlamlı fark bulundu. Ancak diğer yaş grupları arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p>0,05).

Folat için gruplar arası fark Tablo 15’te özetlenmiştir.

Tablo 15. Yaş Gruplarına Göre Folat ın Gruplararası Farkı

Folat	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
Grup I	1	0,005	0,010	< 0,0001	< 0,0001
Grup II	0,005	1	0,725	0,104	0,120
Grup III	0,010	0,725	1	0,262	0,319
Grup IV	< 0,0001	0,104	0,262	1	0,821
Grup V	< 0,0001	0,120	0,319	0,821	1

p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir

Çalışmamızda bulduğumuz Homosistein değerlerinin yaş grupları arasındaki farklılığına baktığımızda, yaş gruplarında ölçülen Homosistein düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (p=0,543).

Çalışmamızda Homosistein düzeylerinin, yaş grupları açısından istatistiksel anlamlı farklılık olmadığı Tablo 16’da özetlenmiştir.

Tablo 16. Yaş Gruplarına Göre Homosistein in Gruplararası Farkı

Homosistein	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
Grup I	1	0,764	0,571	0,152	0,225
Grup II	0,764	1	0,778	0,302	0,450
Grup III	0,571	0,778	1	0,505	0,709
Grup IV	0,152	0,302	0,505	1	0,716
Grup V	0,225	0,450	0,709	0,716	1

p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir

Çalışmamızda bulduğumuz holoTC değerlerinin yaş grupları arasındaki farklılığına baktığımızda, yaş gruplarında ölçülen holoTC düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu (p=0,036).

HoloTC değerleri açısından özellikle en genç yaş grubu olan Grup I ile en yaşlı yaş grubu olan Grup V arasında istatistiksel anlamlı farklılık olduğu saptanmıştır (p=0,006).

HoloTC nin yaş grupları arasındaki istatistiksel fark Tablo 17’de özetlenmiştir.

Tablo 17. Yaş Gruplarına Göre Holo TC nin Gruplararası Farkı

HoloTC	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
Grup I	1	0,111	0,106	0,107	0,006
Grup II	0,111	1	0,768	0,792	0,299
Grup III	0,106	0,768	1	0,975	0,540
Grup IV	0,107	0,792	0,975	1	0,512
Grup V	0,006	0,299	0,540	0,512	1

p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir.

Çalışmamızda bulduğumuz plazma MMA değerlerinin yaş grupları arasındaki farklılığına baktığımızda, yaş gruplarında ölçülen plazma MMA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu (p<0,001).

Plazma MMA açısından Grup I ile Grup III ($p=0,001$), Grup I ile Grup IV ($p=0,003$), Grup I ile Grup V ($p<0,001$) Grup II ile Grup III ($p=0,037$) ve Grup II ile Grup V ($p=0,001$) arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır.

Plazma MMA in yaş grupları arasındaki istatistiksel fark Tablo 18’de özetlenmiştir.

Tablo 18. Yaş Gruplarına Göre plazma MMA in Gruplararası Farkı

Plazma MMA	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
Grup I	1	0,276	0,001	0,003	< 0,0001
Grup II	0,276	1	0,037	0,087	0,001
Grup III	0,001	0,037	1	0,712	0,412
Grup IV	0,003	0,087	0,712	1	0,215
Grup V	< 0,0001	0,001	0,412	0,215	1

$P<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir

5. TARTIŞMA

Vitamin B12 eksikliği tüm dünyada görülen ciddi bir problem olmasına rağmen tek başına Vitamin B12 eksikliğini gerçek anlamda gösteren ve yeterli derecede ayırdedebilecek kesin bir belirteç bulunamamıştır (126).

Vitamin B12 eksikliği tanısında tek başına serum Vitamin B12 değeri yeterli olmamakta Homosistein, Metil Malonik Asit gibi fonksiyonel belirteçlerin de kullanılması önerilmektedir (7). Ancak bu testlerin maliyetleri ve standardizasyon problemleri nedeniyle Vitamin B12 eksikliği tanısında gözler yeni bir belirteç olan Holotranskobalamine (HoloTC) çevrilmiştir (7).

Vitamin B12 ve ilişkili belirteçler olan Homosistein, plazma MMA, Folat ve HoloTC ölçüm yöntemleri sürekli gelişme göstermektedir. Özellikle daha önceki yıllarda RIA ve IRMA gibi radyoaktif ve izotopik yöntemler kullanılmış olmasına rağmen günümüzde non radyoaktif immünokimyasal yöntemler daha çok tercih edilmektedir. Ayrıca elde edilen veriler ışığında RIA ve daha az kullanılan IRMA yöntemleriyle ölçülen Vitamin B12 düzeyleri non radyoaktif yöntemlere göre daha düşük sonuçlar vermektedir (126). Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda son 5 yılın literatür çalışmaları göz önünde bulundurulmuştur.

Ülkemizde son yıllarda sınırlı sayıda araştırma yayınlanmış olmakla birlikte Vitamin B12 ile ilgili yeterli derecede referans aralık çalışması bulunmamaktadır. Yaptığımız literatür araştırmasına göre özellikle Vitamin B12 ile ilişkili belirteçler olan Folat, Homosistein, HoloTC ve plazma MMA nın tümünü içeren referans aralık çalışmasına rastlanmamıştır.

Çalışmamız Türkiye’de 18-65 yaş arası bireylerde Vitamin B12 ile ilişkili olan Vitamin B12, Folat, Homosistein, HoloTC ve MMA nın tümünü kapsayan referans aralık çalışması özelliğine sahip ilk çalışmadır. Yine bu çalışma ile Türkiye’de 18-65 yaş aralığındaki bireylerde HoloTC referans aralığı ilk kez belirlenmiştir. LC-MS/MS yöntemi ile plazma MMA çalışılarak (127) ülkemizde ilk kez 18-65 yaş arası plazma MMA referans aralığı belirlenmiştir.

Sunulan araştırma sonuçlarına göre; Vitamin B12 referans aralığı olarak 139-583,7 pg/mL (mean±SD 300,5±117,2) olarak bulunmuştur. Bulduğumuz referans değer aralığı üretici firma referans aralığı olan 187-883 pg/mL nin çok altında kalmıştır. Üstelik kullandığımız popülasyondaki bireylerin hiç biri Abbott Architect i 2000 otoanalizörü CMIA Vitamin B12 kitinde üst sınır olarak verilen 883 pg/mL değerine yaklaşmamıştır (min-max: 105-722 pg/ml).

NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey)'in 2011 de Vitamin B12 nin alt sınırı olarak 200 pg/mL (148 pmol/L) değerini belirlediği göz önüne alındığında toplumumuzda Vitamin B12 değerlerinin ne kadar düşük olduğu ve firmalar tarafından verilen çalışma kitlerinin referans değerlerinin toplumumuzu yeterince yansıtmadığı görülmektedir.

Dokuz farklı Avrupa ülkesine ait on farklı şehrin dahil edildiği, 12,5-17,9 yaş arası 1051 kişinin katıldığı, Vitamin B12 düzeyleri Siemens DPC İmmulite 2000 otoanalizörü ile kemilüminesan yöntem kullanılarak çalışılan HELENA Study verilerine göre, Vitamin B12 referans aralığı 199,5- 977,5 pg/mL (147,3-721,4 pmol/L) olarak bulunmuştur (128). Ancak bu çalışma verileri bizim yaş grubumuza uyumluluk göstermemekte sadece adölesan yaş grubu verilerini içermektedir. Bu çalışma ışığında yaş grubumuz dışında çocukluk ve ileri yaş grupları için farklı referans aralık çalışmaları planlanabilir.

Yine Fayet-Moore F. ve arkadaşları Australya Sidneyde 18-35 yaş arası 302 sağlıklı kız üniversite öğrencisi üzerinde, Beckman Coulter UniCel DXI 800 Access otoanalizörü ile kemilüminesan metodu kullanılarak yaptığı araştırmada Vitamin B12 referans aralığını 162,6-813 pg/mL (120-600 pmol/L) olarak bulmuşlardır. Bu çalışma da sadece kadın cinsiyetinin çalışmaya dahil edilmiş olması çalışmanın kısıtlayıcı faktörü olarak görülmektedir. Ancak bizim çalışmamızda kadın-erkek arasında fark bulunmamış olması çalışma verilerimizi uyumlu kılmaktadır.

Türkiye'de yapılmış olan çalışmalar incelendiğinde Batı Karadeniz bölgesinde 18-79 yaş arası 1251 referans birey, Siemens DPC İmmulite 2000 otoanalizörü ile kemilüminesan yöntem kullanılarak incelenmiş ve Vitamin B12 referans aralığı 158-563 pg/mL olarak bulunmuştur. (129). Batı Karadeniz çalışması

göz önüne alındığında çalışmamızda bulduğumuz Vitamin B12 referans aralığı alt sınırının düşük olduğu ancak üst sınırının daha yüksek olduğu görüldü.

Kartal bölgesinde 0-60 yaş üzerinde 300 sağlıklı birey üzerinde, Siemens Advia Centaur XP otoanalizörü ile kemilüminesan yöntem kullanılarak yapılan Vitamin B12 referans aralık çalışmasında, Vitamin B12 referans aralığı 155-639 pg/mL olarak bulunmuştur (130).

Her iki çalışmanın yaş gruplarına uyan ortalama (mean) değerleri karşılaştırıldığında, çalışmamızda bulduğumuz ortalama (mean) değerlerin (18-25 yaş: 287,7±114,8; 26-35 yaş: 316,1±11,6; 36-45 yaş: 300,1±112,9; 46-55 yaş: 309,6±113; 56-65 yaş: 340,6±131,7) Kartal çalışmasına göre (20-29 yaş: 300±107; 30-39 yaş: 296±84; 40-49 yaş: 306±97; 50-59 yaş: 286±71 ve 60 yaş üstü: 286±128) en genç yaş grubumuz olan 18-25 yaş arası hariç, diğer yaş gruplarında değerlerin daha yüksek olduğu görülmüştür. Ancak bulunan referans aralıklarına baktığımızda Kartal çalışmasına ait referans aralığının bizim referans aralığımızdan daha yüksek olduğu görülmektedir. Bunun sebebi Kartal çalışmasında bizim çalışmamızdan farklı olarak çocuk ve adölesan popülasyonunun da bulunması olabilir.

Konya'da 0-24 yaş grubunda 1010 (erkek n=509, kadın n=501) birey üzerinde Beckman Coulter UniCel DXI 800 Access otoanalizörü ile kemilüminesan metod kullanılarak, yapılmış olan çalışmanın alt grubu olan 18-24 yaş arası 140 erkek ve 140 kadında, Vitamin B12 referans aralığı erkeklerde 126-473 pg/mL, kadınlarda 127-449 pg/ml olarak bulunmuştur (131).

Aynı yaş grubuna uyan bizim çalışmamızın grup I (18-25 yaş) popülasyonunda Vitamin B12 referans değeri 130,9-581,2 pg/mL olarak bulundu. Bu durum Konya'da yapılan çalışmadaki yaş grup aralığının Vitamin B12 değerine uyumluluk göstermektedir.

Folat düzeylerine baktığımızda bizim çalışmamızda Folat referans aralığı 3-13,6 ng/mL olarak saptanmıştır. Üretici firmanın kitinde verilen referans aralığının 3,1-20,5 ng/mL olduğu göz önünde bulundurulduğunda çalışmamızda saptanan Folat referans aralığının alt sınırı ile uyumlu ancak üst sınırının daha düşük olduğu görüldü.

Kartal çalışmasına baktığımızda, Siemens Advia Centaur XP otoanalizörü ile kemilüminesan yöntem kullanılarak ölçülen Folat değerlerinin alt sınırının 2,87 ng/mL üst sınırının ise 19,49 ng/mL olduğu görülmüştür. Yine bu çalışmaya göre araştırmamızın alt sınırının daha yüksek fakat üst sınırının daha düşük olduğu görülmüştür (130).

Batı Karadeniz çalışmasına baktığımızda, Siemens DPC İmmulite 2000 otoanalizörü ile kemilüminesan yöntem kullanılarak çalışılan Folat değerlerinin 3-17 ng/mL olduğu, referans aralık alt değerinin çalışmamızla uyumluluk gösterdiği ancak üst değerinin bizim çalışmamızda daha düşük olduğu görülmüştür. (129) Bilindiği gibi Folat düzeyi beslenme alışkanlıkları ve coğrafi koşullardan etkilenmektedir. Batı Karadeniz bölgesinde daha fazla yeşil yapraklı sebze tüketilmesi bu çalışmada bulunan Folat düzeylerinin çalışmamızdan daha yüksek olmasının sebebi olabilir düşüncesindeyiz.

Fayet-Moore F. ve arkadaşlarının yaptığı, Beckman Coulter UniCel DXI 800 Access otoanalizörü ile kemilüminesan yöntem kullanılarak yapılan çalışmada, Folat değerleri 3-11 ng/mL (7-25 nmol/L) olarak bildirilmiştir. Bu sonuçlar bizim çalışmamızda bulduğumuz referans değerlere benzerlik göstermektedir (132).

Mersin Üniversitesi'nde Roche E-170 otoanalizörü ile kemilüminesan yöntem kullanılarak yapılan bir tez çalışmasında, Folat referans aralığı çalışmamız ile karşılaştırıldığında yaş gruplarına göre referans değerlerinin birbirleriyle uyum gösterdiği görüldü (133).

Homosistein ölçüm sonuçları değerlendirildiğinde çalışmamızda Homosistein düzeyi 5,6-17,6 (10,9±3,4) µmol/L olarak bulundu. Bizim kullandığımız Abbott Architect i2000 cihazına ait reaktifin referans aralığı 5,08-15,39 µmol/L olarak verilmiştir. Bu test için de kullandığımız reaktifin alt referans değeri ile uyumlu olduğu ancak üst referans değerinin reaktife göre yüksek olduğu saptanmıştır.

Fayet-Moore F. ve arkadaşları 307 kadın üzerinde yaptığı çalışmada Homosistein düzeyini HPLC metoduyla 5-18 µmol/L olarak bulmuşlardır ve bu sonuçlar bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir (132).

Hindistan'da 1288 sağlıklı birey üzerinde yapılan bir çalışmada Homosistein enzimatik metotla ölçülmüş olup referans aralığı 6,5-16,38 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulunmuştur. Bu araştırma sonuçları Homosistein verilerimizle uyumluluk göstermektedir (134).

Yaş grubu bakımından çalışmamıza uymamakla birlikte 12,5-17,5 yaşında 498 sağlıklı adölesanın araştırıldığı HELENA çalışmasında Homosistein kemilüminesan metotla ölçülmüş olup referans aralığı 3,7-22,2 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulunmuştur ve bulduğumuz referans aralığıyla oldukça farklılık göstermektedir. Ancak HELENA çalışması yalnızca adölesan çağıdaki çocuklarda yapılmıştır ve bu çalışmada bizim araştırmamızla uyan yaş grubu bulunmamaktadır (128).

Ülkemizde yapılan çalışmalara baktığımızda Mersin bölgesinde 2446 erkek, 1957 kadın üzerinde yapılmış olan Homosistein referans aralık çalışmasında, HPLC yöntemi kullanılmıştır. Yine bu çalışmada yaş ve cinsiyete göre farklılık olduğu gözlemlendiğinden 0-46 yaş arası erkeklerde 6,51-56,85 $\mu\text{mol/L}$, 47 yaş ve üzeri erkeklerde ise $9,12+(0,20 \times \text{yaş})$, 0-40 yaş arası kadınlarda 5-32 $\mu\text{mol/L}$, 41 yaş ve üzeri bireylerde ise $3,32+(0,23 \times \text{yaş})$ olarak yaş ve cinsiyete göre ayrı ayrı referans aralıkları belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda Homosistein düzeyleri açısından kadın-erkek arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Mersin bölgesinde yapılmış olan bu çalışma ile referans aralıklarımız karşılaştırıldığında alt sınırlarda farklılık olmamakla birlikte referans değer üst sınırında çok büyük bir farklılık gözlemlenmektedir. Çalışmanın 0-96 yaş aralığında olduğu düşünülürse çocukluk yaş grubu, genç -orta yaş grubu ve yaşlı grubunun tümünün birlikte değerlendirilmesinin bu kadar yüksek sonuçlara neden olduğu düşünülebilir (135).

Anabilim Dalımızda yapılmış olan önceki tez çalışmasında, şimdiki çalışmamızdan farklı olarak Homosistein düzeylerine HPLC yöntemi kullanılmıştır. Bahsi geçen çalışmadaki Homosistein düzeyi $10,02\pm 4,75 \mu\text{mol/L}$ ortalama değeri gözlenmiştir ve bu değer çalışmamızdaki Homosistein ortalama değeriyle uyumluluk göstermektedir ($10,9\pm 3,4 \mu\text{mol/L}$) (136).

Plazma MMA değerlerinin referans aralığı incelendiğinde çalışmamızda Plazma MMA düzeyinin 0-0,8 $\mu\text{mol/L}$ olduğu bulundu. Üretici firmanın LC-MS/MS yöntemine ait plazma MMA ya ilişkin verdiği referans aralığının 0-0,4

$\mu\text{mol/L}$ olduğu düşünülürse, bizim belirlediğimiz referans aralığının daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Clinica Chimica Acta da yayınlanan 0-71 yaş üzeri 4944 kişinin katıldığı ve yöntem olarak LC-MS/MS kullanılan bir plazma MMA referans aralık çalışmasında referans değer olarak 0,05-0,45 $\mu\text{mol/L}$ olarak bildirilmiştir. Bizim çalışmamızın plazma MMA referans aralığının bu çalışmadan yüksek olduğu görülmektedir.

Yine Magera MJ ve arkadaşlarının yapmış olduğu plazma MMA ve idrar MMA düzeylerinin iki farklı yöntem olan stabil izotop dilüsyon ve Tandem Mass Spektrofotometri yöntemleriyle karşılaştırılmasının yapıldığı bir çalışmada plazma MMA referans aralığı 0-0,4 $\mu\text{mol/L}$ bulunmuştur (137).

Obeid R ve arkadaşlarının plazma MMA ölçümünde iki metodu karşılaştırdığı 138 kişide yapılmış olan çalışmada LC-MS/MS yöntemiyle plazma MMA değerleri 0,15-0,782 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulunmuştur. Bu çalışmadaki veriler çalışmamıza uyum göstermektedir (138).

Literatür incelendiğinde ülkemizde yapılmış herhangi bir plazma MMA referans aralık araştırması bulunmamıştır. Bu da göstermektedir ki toplumumuz için plazma MMA değeri henüz bilinmemektedir. Bizim araştırmamız plazma MMA referans aralığının belirlenmesi açısından ülkemizde yapılmış ilk çalışmadır.

Holotranskobalamin değerine bakıldığında HoloTC referans aralığı 10,3-101,1 pmol/L olarak bulundu. HoloTC ye ait Abbott Architect i2000 cihazında kullandığımız kit için rapor edilen referans aralığı ise 25,1-165 pmol/L olarak belirlenmiştir. Bulduğumuz referans aralığı ise bu aralığın çok altında kalmıştır

Valente E. ve arkadaşlarının yaptığı 119 sağlıklı bireyin katıldığı, Abbott AxSYM otoanalizörü ile mikropatikül enzim immünassay yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada HoloTC referans aralığı 24,1-124,7 pmol/L olarak bulunmuştur (139). Yine bu çalışmada bulunan referans aralığa göre bizim çalışmamızın referans aralığının daha düşük olduğu görüldü. Çalışmanın mikropatikül enzim immünassay yöntemiyle yapılmış olması referans aralıklar arasındaki farkın sebebi olabilir.

Lewerin C ve arkadaşlarının yaptığı yaş ortalaması 79,5 olan 790 sağlıklı bireyin katıldığı, Abbott AxSYM otoanalizörü ile mikropatikül enzim immünassay yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada HoloTC referans aralığı 19.6-132.3 pmol/L olarak bulunmuştur (140).

Bizim çalışmamızda bulunan referans aralık değeri bu çalışmadaki referans değerden daha düşük bulunmuştur. Lewerin C. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın yaşlı (mean yaş: 79,5) popülasyonunda yapılmış olması ve bu çalışmada mikropatikül enzim immünassay yöntemi kullanılmış olması sonuçlar arasındaki farklılığın sebebi olabilir.

Literatür tarandığında ülkemizde HoloTC referans aralığıyla ilgili çalışma bulunamamıştır. Bu durum da bizi tıpkı plazma MMA da olduğu gibi üretici firma veya yabancı yayınlarda kabul edilen ve bizlere verilen referans aralıkları kullanmaya mahkum etmektedir. Son yıllarda özellikle HoloTC çalışma yöntemlerinde değişiklik göze çarpmaktadır. Yaklaşık 10 yıl önce HoloTC çalışılmasındaki tek yöntem RIA iken radyo-izotop çalışmalardan uzaklaşılması nedeniyle önce Abbott AxSYM sistemleri ile mikropatikül enzim immünassay yöntemiyle çalışılmıştır. Ancak son yıllarda Abbott Architect analizörlerinde HoloTC Kemilüminesan Mikropatikül İmmünoassay yöntemiyle çalışılmaya başlanmıştır. HoloTC CMIA yöntemiyle ilgili elimizde yeterli referans aralık çalışması bulunmamaktadır. Literatür incelenirse HoloTC için ülkemizde yapılmış olan ilk referans aralık çalışmasının bizim araştırmamız olduğu görülmektedir.

Referans aralık değerimizin düşük olması çalışmanın diğerlerinden farklı olarak CMIA yöntemiyle genç-orta yaş popülasyonda yapılmış olmasından kaynaklanabilir düşüncesindeyiz. Ayrıca, ülkemizde bu yöntemle bir referans aralık çalışması yapılmamış olması çalışmamızın diğer araştırmalarla karşılaştırılmasını güçleştirmektedir. Ancak bulduğumuz HoloTC referans aralığı, yine bulduğumuz Vitamin B12 referans aralığı ile güçlü bir pozitif korelasyon göstermiş ($r=0,780$) olması toplumumuzda HoloTC referans aralığının düşük olabileceği düşüncesini akla getirmektedir.

6. SONUÇ

Vitamin B12 eksikliği dünyada ve ülkemizde çok sık rastlanılan ve genellikle yaşlılarda değişik semptomlarla ortaya çıkan (makrositer anemi, nörodejeneratif değişiklikler vb.) ve yaşlılık hastalığı olarak bilinen bir durumdur. Ancak, gözlemlerimiz bu durumun genç-orta yaştan itibaren bir problem olarak ortaya çıktığını, başarı beklentilerinin en yüksek, akademik sürecin en yoğun olduğu dönem olan genç-orta yaş döneminde Vitamin B12 eksikliğinin semptom vermeye başladığı yönündedir (138).

Bu nedenle Türkiye’de ilk defa Vitamin B12 ile ilişkili belirteçlerin tümünün bulunduğu bir referans aralık çalışması yapılması gerekliliğini görerek bu çalışmayı yaptık. Çalışmamız ayrıca Vitamin B12 ile ilişkili belirteçler olan plazma MMA ve HoloTC ye yönelik ülkemizdeki ilk referans aralık çalışmasıdır.

Yaptığımız çalışmada Vitamin B12 nin toplumumuzdaki referans aralığı 139-583,7 pg/mL olarak bulunmuştur. Bu referans aralığının uluslararası birçok çalışmaya göre düşük olmasına rağmen, ülkemizdeki çalışmaların bir kısmı ile uyumluluk göstermektedir. Özellikle yaş grupları göz önüne alındığında en düşük değerlerin genç-orta yaş grubunda olduğu görülmektedir.

Yine Folat referans aralığının çalışmamızda 3-13,6 ng/ml olarak bulunması değerlendirildiğinde bu değer uluslararası yayınlarda elde edilen verilere göre düşük olduğu gözlemlenmiştir. Folatın da özellikle en genç grup olan 18-25 yaş grubunda düşük olması yine bu vitaminin özellikle bu yaş gruplarında desteklenmesi gerektiği sonucunu ortaya çıkarmaktadır.

Vitamin B12 düşüklüğünün kesin tanısı koymakta kullanılan diğer parametreler olan plazma Homosistein düzeyi ile Vitamin B12 arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur ($r = -0,478$). Yine Folat ile Homosistein arasında da negatif korelasyon bulunmuştur ($r = -0,206$). Bu korelasyonların bulunması metabolik açıdan anlamlıdır. Homosistein referans aralığının uluslararası yayınlardan daha yüksek bulunmasının Vitamin B12 ve Folat referans aralıklarının çalışmamızda düşük bulunması nedeniyle ortaya çıkan bir sonuç olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca Homosistein düzeyinin ölçülmesinde farklı ölçüm yöntemlerinin kullanılıyor olması

referans aralık düzeylerinin belirlenmesinde karşımıza çıkan en büyük problem olarak görülmektedir.

Çalışmamızda genç-orta yaş grubu olan bireylerde, özellikle 18-35 yaş arasında Vitamin B12 ve Folat değerlerinin referans aralığında bulunması nedeniyle Homosistein düzeyinin bu yaş grubunda anlamlı olarak yükselmediği görülmüştür. Bu yaş grubunda Homosistein düzeyinin Vitamin B12 eksikliğini göstermede total Vitamin B12 ile birlikte kullanılmasının, Vitamin B12 düzeyinin değerlendirilmesine katkı sağlamayacağını düşünmekteyiz. Ülkemizde Vitamin B12 belirteçlerinin referans aralık çalışmalarının kısıtlı olduğu göz önüne alındığında, bizim çalışmamızda referans aralığının alt sınırına yakın bulunan genç-orta yaş bireylerde Vitamin B12 ve Folat düşük bulunmuştur. Homosisteinin pahalı ve teknik yönden standardizasyon problemlerinin bulunması nedeniyle, Vitamin B12 eksikliği tanısında bu testlere eklenmesinin gerekli olmadığı çalışmamızdan çıkarılabilecek sonuçlardan biridir.

Araştırmamız ayrıca ülkemizde LC-MS/MS yöntemiyle ölçülmüş olan Plazma MMA in ilk referans aralık çalışmasıdır. Plazma MMA düzeyinin Vitamin B12 eksikliğinde tanı değeri tartışmaya yer vermeyecek şekilde kanıtlanmış bir bilimsel gerçektir. Ancak Plazma MMA referans aralığı olarak bulduğumuz 0-0,8 µmol/L uluslararası yayınlarda verilen ve kullandığımız kitin üretici firması tarafından önerilen 0-0,4 mmol/l değerinin çok üzerindedir.

Çalışmamızda Plazma MMA düzeyi ile Vitamin B12 düzeyi arasında negatif korelasyon vardır ($r = -0,263$). Plazma MMA referans aralığının kitin üretici firmasının verdiği referans değerden daha yüksek bulunması, Vitamin B12 nin referans aralığının, kullandığımız kitin üretici firmasının önerdiği referans aralığından daha düşük bulunması nedeniyle ortaya çıkan bir sonuç olduğunu düşünmekteyiz.

Yine çalışmamız esnasında -80°C lik derin dondurucu şartlarında bulunan örneklerimiz testin teknik şartları nedeniyle 3 parti olarak çalışılmıştır. Farklı dönemlerde çalışılan plazma MMA değerleri içerisinde çok aşırı uç değerler olduğu tespit edilmiş ve bu değerler çalışmamızın ortalamasında ileri derecede sapmaya yol açmış, uç ve uyumsuz değerler çalışma dışı bırakılmıştır. Bu sebeple MMA

analizleri yapılması esnasında kullanılacak teknik, preanalitik hata kaynakları, tekniğin analitik hata kaynakları olasılığı nedeniyle plazma MMA ölçüm tekniklerinin değerlendirilerek ideal metod ile standardize edilmesi gerektiği düşünmekteyiz.

Ayrıca Plazma MMA ölçümünde, LC-MS/MS ve GC-MS/MS yöntemlerinin zorluğu ve pahalılığı plazma MMA kullanımının önündeki en büyük problem olarak görünmektedir. Yine çalışmamızda plazma MMA düzeylerinin referans aralıkları incelendiğinde yaş gruplarına göre Vitamin B12 referans aralığı değişkenlik gösterirken, plazma MMA değerlerinin bu yaş gruplarında önemli bir değişiklik göstermemesi, bu kadar zor ve pahalı bir yöntemle ölçülen bu testin Vitamin B12 tanısındaki kullanımını bizce zorlaştırmaktadır.

HoloTC Vitamin B12 eksikliğinin tanısında kullanılan en yeni parametre olarak öne sürülmektedir. Bizim çalışmamızda HoloTC referans aralığı 10,6-101,6 pmol/L olarak bulunmuştur. Bu değer aynı Vitamin B12 de olduğu gibi kit üretici firmanın verdiği referans aralığından daha düşük bir değerdir. Ayrıca Vitamin B12 ile ilişkisi incelendiğinde HoloTC ile çok güçlü pozitif korelasyonu görünmektedir. ($r=0,780$). Bu durum HoloTC'nin Vitamin B12 ile birlikte kullanılmasının Vitamin B12 düzeyinin ve eksikliğinin belirlenmesinde kullanılabilir en iyi iki test olabileceğini göstermektedir. Yaş grupları incelendiğinde HoloTC değerlerinin tıpkı Vitamin B12 gibi yaş ile arttığı görülmektedir.

HoloTC ile ilgili çalışmalar hala devam etmektedir. Bizim çalışmamız Vitamin B12 değerinin gösterilmesinde HoloTC nin kıymetli bir belirteç olduğunu kanıtlamaktadır.

Tüm dünyada Vitamin B12 eksikliğinin yaşlılık dönemine ait bir problem olduğu öne sürülmektedir. Oysa bizim çalışmamız genç yaş grubunda Vitamin B12, Folat ve HoloTC düzeylerinin düşük olduğunu, Homosistein ve MMA düzeylerinde önemli bir değişiklik olmadığını ve genç-orta yaş bireylerde özellikle 36 yaşından sonra Vitamin B12 düzeylerinde büyük bir değişiklik olmadığını göstermiştir. Özellikle genç yaş grubunu etkileyen Subklinik Kobalamin Eksikliği anemi bulguları olmaksızın nörokognitif fonksiyon bozuklukları ile ortaya çıkan bir

hastalıktır. Subklinik kobalamin eksikliğinin nörolojik ve hematolojik bulgu vermeksizin ortaya çıktığı bilinmektedir. (126).

Yaşlıların bir problemi olarak görölen Vitamin B12 eksikliğinin, özellikle genç yaş grubunu etkileyen ve ciddiye alınması gereken bir durum olduğu bir çok yazar tarafından ifade edilmiştir (5,7,126). Çalışmamızda, özellikle 18-25 ve 26-35 yaş gruplarında Vitamin B12 değerlerinin çok düşük bulunmuş olması bu düşünceyi kanıtlar niteliktedir. Subklinik kobalamin eksikliği ile ilgili çalışmaların ölkemizde yetersiz olması nedeniyle, en kısa zamanda bu yönde bir çalışma yapılması gereği çalışmamızla ortaya çıkan diğer bir sonuçtur.

Referans aralığına ait en düşük değerlerin 18-25 yaş arasında bulunması bizlere 18 yaş altı Vitamin B12 ve belirteçlerinin durumunun ne olduğu sorusunu sormaya yöneltmektedir. Vitamin B12 ve belirteçlerinin uluslararası referans değerlerden daha düşük saptanmış olması en kısa zamanda bebeklik, çocukluk ve adölesan dönemlerdeki Vitamin B12 düzeylerinin ayrı ayrı belirlenmesi gerektiğini göstermektedir. Benzer şekilde Vitamin B12 nin özellikle yaşla pozitif bir korelasyon göstermiş olması (Tablo 10) ve 18-25 yaşını kapsayan çalışma grubumuzda en düşük değerlerin görülmesi (Mean±SD: 287,7±114,8) ölkemizde 18 yaş altı popölyasyonda mutlaka Vitamin B12 ilişkili parametrelerin tamamını kapsayan bir referans aralık çalışmasının gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

Yaptığımız çalışmanın sonuçlarını maddeler halinde özetlersek;

1. Araştırmamız ölkemizdeki Vitamin B12 ile ilişkili belirteçler olan Vitamin B12, HoloTC, Homosistein, Folat ve plazma MMA yı içeren ilk referans aralık çalışması olma özelliğine sahiptir.
2. Çalışmamız Abbott *i* 2000 cihazında Kemilüminesan Mikropartikül İmmun Assay (CMIA) yöntemiyle ölçölen HoloTC testinin ölkemizdeki ilk referans aralık çalışmasıdır.
3. Çalışmamız LC-MS/MS yöntemiyle ölçölmüş olan plazma MMA testinin ölkemizdeki ilk referans aralık çalışmasıdır.
4. Yaptığımız araştırmada Vitamin B12 referans aralığı 139-583,7 (300,5±117,2) pg/mL olarak, Folat referans aralığı 3-13,6 (6,5±2,8)

ng/mL olarak, Homosistein referans aralığı 5,6-17,6 (10,9±3,4) µmol/L olarak, HoloTC referans aralığı 10,3-101,1 (46,6±25,9) pmol/L ve plazma MMA referans aralığı 0-0,8 (0,2±0,2) µmol/L olarak bulunmuştur.

5. Bulduğumuz Vitamin B12, Folat ve HoloTC referans aralık değerleri üretici firmanın rapor ettiği referans aralık değerlerine göre çok daha düşük bulunmuştur.
6. Çalışmamızda Homosistein referans aralığı üretici firma referans aralığıyla uyumlu olarak bulunmuştur.
7. Plazma MMA referans aralığı üretici firma referans aralığından yüksek olarak bulunmuştur.
8. Referans aralıkları yaş gruplarına göre incelendiğinde Vitamin B12 ve Folat değerleri en düşük 18-25 yaş arası en genç nüfusta olduğu ve yaşlı popülasyonla genç popülasyon arasında anlamlı fark olduğu görülmüştür.
9. Homosistein değerlerinin HPLC metodundan farklı olarak nispeten yeni bir yöntem olan CMIA yöntemiyle çalışılmış olması çalışmamızdaki diğer bir özelliktir.
10. Yaş grupları göz önüne alınarak incelendiğinde Homosistein düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Vitamin B12 ve Folat'ın anlamlı farklılık gösterdiği yaş gruplarında Homosisteinin anlamlı farklılık göstermemesi Vitamin B12 eksikliği düşünülen bireylerde tanısal testlere Homosistein testinin eklenmesinin gerekli olmadığını düşündürmektedir.
11. Dünyada ve ülkemizde Vitamin B12 eksikliği yaşlılığın getirdiği bir problem olarak düşünülmektedir. Oysa çalışmamızda, özellikle akademik performans ve doğurganlığın en yüksek olduğu 18-25 yaş aralığında Vitamin B12 düzeyleri düşük olarak bulunmuştur. Vitamin B12 düzeylerinin genç bireylerde bu kadar düşük bulunmuş olması

toplum sağlığı açısından, özellikle subklinik kobalamin eksikliğinin ciddiye alınması gereken bir durum olduğunu göstermektedir.

13. Tüm testler incelendiğinde Vitamin B12 ile metabolik olarak en uyumlu testin HoloTC olduğu görülmüştür.
14. Yukarıda bahsedilen nedenlerle, genç–orta yaş bireylerde (18-65 yaş) yapılmış olan bu çalışma, lkemizde bir ilk olma özelliğine sahiptir. Ancak ocukluk çağına ait veriler literatürde son derece yetersizdir. Bu nedenle lkemizde, 18 yaş altı grupta mutlaka Vitamin B12 ve onunla ilişkili belirteçlerin tamamını içeren geniş kapsamlı bir referans aralık çalışmasına ihtiyaç olduğu bu çalışma ile ortaya konmuştur.

7. ÖZET

Amaç: Bu çalışmada Vitamin B12 ilişkili belirteçlerin genç orta yaş sağlıklı donörlerde normal referans aralıklarının belirlenmesi hedeflenmiştir.

Materyal Metod: IFCC-NCCLS C28-A3 formlarına uygun olarak belirlenen 541 sağlıklı gönüllüden Vitamin B12 ve Folik asit, 416 gönüllüden Homosistein ve HoloTC Abbott Architect i2000 cihazı Kemilüminesan Mikropartikül İmmuno Assay (CMIA) yöntemiyle ayrıca 404 gönüllüden plazma MMA düzeyi LC-MS/MS yöntemi kullanılarak çalışıldı. İstatistiksel analizler SPSS 21 ile Referans aralıklar Reference Value Advisor v2.0 kullanılarak hesaplandı.

Bulgular: Yaptığımız çalışma sonunda Vitamin B12 ve ilişkili belirteçler düşünüldüğünde kadın-erkek referans aralıkları arasında anlamlı farklılık bulunmadı. Serum Vitamin B12 139-583,7 pg/ml, serum Folat düzeyi 3-13,6 ng/ml, plazma Homosistein düzeyi 5,6-17,6 µmol/L serum HoloTC düzeyi 10,3-101,1 pmol/L ve plazma MMA düzeyi 0-0,8 µmol/L olarak bulundu. Referans aralık çalışmasına katılan gönüllülerin yaşları ile tüm parametreler arası korelasyon olduğu görüldüğünden, gönüllüler yaş gruplarına ayrıldı. Yaş grupları incelendiğinde en büyük farkların genç yaş grubumuz olan 18-25 yaş ile en yaşlı yaş grubumuz olan 56-65 yaş arasında olduğu görüldü.

Sonuç: Yaptığımız çalışma sonucu Homosistein ve plazma MMA hariç tüm referans aralıkların üretici firmaların önerdiği referans aralıklarından farklı olarak düşük bulunulmuştur. Ayrıca plazma Homosistein referans aralığının üretici firma referans aralığına çok yakın fakat plazma MMA referans aralığının üretici firmanın verdiği referans aralığından çok yüksek olduğu bulunmuştur. Tüm belirteçler içerisinde HoloTC nin Vitamin B12 eksikliğini göstermede total Vitamin B12 ile birlikte kullanılabilir en iyi test olduğu çalışmamızda bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: Vitamin B12, Folat, HoloTC, plazma MMA,Plazma Homosistein, referans aralık,genç- orta yaş

8. SUMMARY

Objective: This study in young middle age of B12-related markers in healthy donors aimed to determine the normal reference range

Material Method: IFCC-NCCLS C28-A3 form determined in accordance with 541 healthy volunteers from Vitamin B12 and Folic acid, 416 volunteers Homocysteine and holotc than Abbott Architect immune chemiluminescence using the i2000 device assay (CMIA) procedure with further. 404 volunteers from plasma MMA levels It was studied using the method LC-MS / MS. Reference intervals were calculated using the Reference Value Advisor v2.0.

Results: At the end of our study, Vitamin B12 and related markers were no significant differences between men and women considered the reference range. Serum Vitamin B12 from 139 to 583.7 pg / mL, serum Folate levels of 3 to 13.6 ng / mL, plasma Homocysteine levels 5.6 to 17.6 mmol / L serum holotc level of 10.3 to 101.1 pmol / L and plasma MMA levels from 0 to 0.8 mmol / L, respectively. With the age of the volunteers who participated in the reference range studies that have found that the correlation between all parameters, volunteers were divided into age groups. When the age groups studied, our young age group that most of us the biggest difference is between 18-25 years old age group and 56-65 age was seen.

Conclusion: The results of our research plasma Homocysteine and plasma MMA was made lower than the reference range as different manufacturers' suggested by excluding all reference range. In addition, plasma Homocysteine reference range from very close to the reference range of manufacturers, but manufacturers of plasma MMA reference range given by the reference range was found to be too high. In all markers to show the HoloTC the Vitamin B12 deficiency that can be used with total Vitamin B12 was found in our study is the best test.

Key words: Vitamin B12, Folate, HoloTC plasma MMA, plasma Homocysteine, reference range, young-middle aged people

9. KAYNAKLAR

1. Bor MV; Vitamin B12 Eksikliğinin Laboratuvar tanısında yeni yaklaşımlar; Antalya 2009 Ekim; 7-10
2. Bor MV, Lydeking-Olsen E, Moller J, Nexo E. A daily intake of approximately 6 microg vitamin B-12 appear sto saturate all the vitamin B-12-related variables in Danish postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2006;83:52-8.)
3. Minot GR, Murphy LP: Treatment of pernicious anemia by a special diet. *J Am Med* 1926; 87:470
4. Yetley EA¹, Pfeiffer CM, Phinney KW, Bailey RL, Blackmore S, Bock JL, Brody LC, Carmel R, Curtin LR, Durazo-Arvizu RA, Eckfeldt JH, Green R, Gregory JF 3rd, Hoofnagle AN, Jacobsen DW, Jacques PF, Lacher DA, Molloy AM, Massaro J, Mills JL, Nexo E, Rader JI, Selhub J, Sempos C, Shane B, Stabler S, Stover P, Tamura T, Tedstone A, Thorpe SJ, Coates PM, Johnson CL, Picciano MF; Biomarkers of vitamin B-12 status in NHANES: a roundtable summary. *Am J Clin Nutr*. 2011 Jul;94(1):313S-321S. doi: 10.3945/ajcn.111.013243
5. Carmel R, Sarrai M. Diagnosis and management of clinical and sub-clinical cobalamin deficiency: advances and controversies. *Curr Hematol Rep* 2006;5:23–33
6. Heaton EB, Savage DG, Brust JCM, et al: Neurologic aspects of cobalamin deficiency. *Medicine* 1991; 70:229-245
7. Nexo E, Hoffmann-Lücke E; Holotranscobalamin, a marker of vitamin B-12 status: analytical aspects and clinical utility; *Am J Clin Nutr*. 2011 Jul;94(1):359S-365S. doi: 10.3945/ajcn.111.013458
8. Wahlin A, Bäckman Lars, Hultdin J, Adolfsson R, Nilsson L-G. Reference values for serum levels of vitamin B12 and folic acid in a population-based sample of adults between 35 and 80 years of age. *Public Health Nutr* 2001;5:505–11
9. Coşkun T. B12 Vitamini, *Katkı Pediatri Dergisi*. 2003;25:419-33

10. Smith EL, Fantes KH, Ball S, Waller JG, Emery WB, Anslow WK, et al. B12 vitamins (cobalamins). I. Vitamins B12c and B12d. *Biochem J.* 1952 Nov;52(3):389-95
11. Kaplan L.A, Pesce A.J, Kazmierczak S.C. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation.* Fourth Edition.2003; 744-749
12. Lee GR, Herbert V. Nutritional factors in the production and function of erythrocytes. In:Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM, editors.*Wintrobe'sClinical Hematology.* Baltimore:Williams&Wilkins, 1999:228-66
13. Klee GG. Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B(12) and folate. *Clin Chem.* 2000 Aug;46(8 Pt2):1277-83
14. Smith C, Marks AD, Lieberman M. *Mark's Temel Tıbbi Biyokimyası Klinik Yaklaşım.* 2. baskı. (Çeviri editörleri, Ünal ME, Atik U, Aksoy N, Hasimi A) Ankara: Günes Tıp Kitabevleri Yayınları; 2007
15. Babior B, Bunn HF. Megaloblastic Anemias. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine.* Fifteenth Edition. New York 2001;1:675
16. 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
17. Babior B, Bunn HF. Megaloblastic Anemias. Kurt JI, Eugene B, Jean DW et al (eds.).In: *Harrison's Principles of Internal Medicine.* Thirteenth Edition. New York 1996:1726-32
18. Babior B. Folate, cobalamin and megaloblastic anemias. Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT. (eds.). In: *Williams Hematology.* Seventh edition. New York. 2006; 477-509
19. Aranceta J, Perez Rodrigo C, Eguileor I, Marzana I, Gonzalez de Galdeano L, Saenz de Buruaga J. Food consumption patterns in the adult population of the Basque Country (EINUT-I). *Public Health Nutr.* 1998 Sep;1(3):185-
20. Chanarin I. *The megaloblastic anemias.* 3rd edition. London: Blackwell Scientific Publications; 1990

21. Seetharam B, Alpers DH. Absorption and transport of cobalamin (vitamin B12). *Annu Rev Nutr* 1982;2:343-369.3
22. 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
23. Hardlei TF, Nexo E. A new principle for measurement of cobalamin and corrinoids, used for studies of cobalamin analogs on serum haptocorrin. *Clin Chem* 2009;55:1002–10
24. Nasreddine L, Hwalla N, Sibai A, Hamze M, Parent-Massin D. Food consumption patterns in an adult urban population in Beirut, Lebanon. *Public Health Nutr.* 2006 Apr;9(2):194-203
25. Murray R.K, Bender D.A, Botham K.M, Kennelly P.J, Rodwell V.W, Weil P.A. Harper's Illustrated Biochemistry. Twenty-Eight Edition. 2009, 476-478
26. Gumurdulu Y, Serin E, Ozer B, Kayaselcuk F, Kul K, Pata C, et al. Predictors of vitamin B12 deficiency: age and Helicobacter pylori load of antral mucosa. *Turk J Gastroenterol.* 2003 Mar;14(1):44-9
27. Kayaalp SO: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji; Antianemik ilaçlar II: Megaloblastik anemilere karşı kullanılan ilaçlar. Sekizinci basım, Hacettepe –Taş Kitabevi, 2.cilt, Ankara, 1998; s:1580-1588
28. Sonja AR, Paul MF, Kelley SS: Vitamin B12 deficiency in children and adolescents. *J Pediatr* 2001; 138:10–17
29. Whitehead VM, Rosenblatt DS, Cooper BA: Megaloblastic anemia. In: Nathan DG, Orkin SH, Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. (15th ed) W.B.Saunders Co: Philadelphia 1998, pp 385–415
30. 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
31. Herbert V. Vitamin B12. In: Ziegler EE, Filer IF, (Eds). Present knowledge in nutrition. Washington DC: International Life Science Institute Press; 1996. 191–205

32. Snow CF. Laboratory diagnosis of vitamin B12 and folate deficiency: a guide for the primary care physician. *Arch Intern Med* 1999;159:1289–98
33. Wolters M, Ströhle A, Hahn A. Cobalamin: a critical vitamin in the elderly. *Preventive Medicine* 2004;39:1256–66
34. Baik HW, Russell RM. Vitamin B12 deficiency in the elderly. *Annu Rev Nutr* 1999;19:357–77, 55–57
35. Carmel R. Cobalamin, the stomach, and aging. *Am J Clin Nutr* 1997;66:750–9
36. Russell RM. The aging process as a modifier of metabolism. *Am J Clin Nutr* 2000;72(2 suppl):529S–32S
37. Russell RM. Factors in aging that effect the bioavailability of nutrients. *J Nutr* 2001;131(4 suppl):1359S–61S
38. 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
39. 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
40. Bradford GS, Taylor CT. Omeprazole and vitamin B12 deficiency. *Ann Pharmacother* 1999;33:641–3
41. Saltzman JR, Russell RM. Nutritional consequences of intestinal bacterial overgrowth. *Compr Ther* 1994;20:523–30
42. Peterson WL. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. *N Engl J Med* 1991;324:1043–8
43. Logan RP, Walker MM. ABC of upper gastrointestinal tract:epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *BMJ* 2001;323:920–2
44. Özden A, Dumlu Ş, Dönderici Ö, Çetinkaya H, Soylu K, Özkan H, Balcı M, Sarıoğlu M, Uzunalimoğlu Ö. *Helicobacter pylori* infeksiyonunun ülkemizde seroepidemiolojisi. *Gastroen teroloji* 1992; 4: 665–8

45. Karaaslan H, Bektaş M, Soykan İ, Bozka ya H, Bahar K, Özden A. Türkiye’de gönüllü kan donörlerinde Helicobacter pylori seroprevalansı. Turk J Gastroenterol 2003; 14(suppl 1) : SB03/1
46. Güzelcan Y, Loon P; Vitamin B12 status in patients of Turkish and Dutch descent with depression: a comparative cross-sectional study Annals of General Psychiatry 2009, 8:18 doi:10.1186/1744-859X-8-18
47. Stabler SP, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J. Clinical spectrum and diagnosis of cobalamin deficiency. Blood 1990;76:871–81
48. Lindenbaum J, Heaton 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
49. Herbert V. Vitamin B12: plant sources, requirements, and assay. Am J Clin Nutr 1988;48:852–8
50. Dwyer JT. Nutritional consequences of vegetarianism. Annu Rev Nutr 1991;11:61–91
51. 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
52. 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
53. 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
54. Green R. Metabolite assays in cobalamin and folate deficiency. Baillieres Clin Haematol 1995;8:533–66
55. Andres E, Vidal-Alaball J, Loukili NH, Zimmer J, Kaltenbach G. B12 deficiency: A look beyond pernicious anemia. J Fam Pract 2007;56:537-42.27

56. Wu K, Helzlsouer KJ, Comstock GW, Hoffman SC, Nadeau MR, Selhub J. A prospective study on folate, B12, and pyridoxal 5'-phosphate (B6) and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999 Mar;8(3):209-17
57. 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 Oct;17(5):435-41
58. Kocer A, Ince N, Canbulat CE, Sargin M. Serum vitamin B12 and folic Acid levels in acute cerebral atherothrombotic infarction. *Tohoku J Exp Med.* 2004 Oct;204(2):155-61
59. Verhaar MC, Stroes E, Rabelink TJ. Folates and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Jan;22(1):6-13
60. Oh R, Brown DL. Vitamin B12 deficiency. *Am Fam Physician.* 2003 Mar 1;67(5):979-86
61. Andres E, Noel E, Abdelghani MB. Vitamin B(12) deficiency associated with chronic acid suppression therapy. *Ann Pharmacother.* 2003 Nov;37(11):1730 Donaldson MS. Metabolic vitamin B12 status on a mostly raw vegan diet with follow-up using tablets, nutritional yeast, or probiotic supplements. *Ann Nutr Metab.* 2000;44(5-6):229-34
62. Andres E, Loukili NH, Noel E, Kaltenbach G, Abdelgheni MB, Perrin AE, et al. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *CMAJ.* 2004 Aug 3;171(3):251-9
63. The Water-Soluble Vitamins, Folic Acide. Sareen S. Gropper, Jack L. Smith, James L. Groff. (eds.). In: *Advanced Nutrition And Human Metabolism*, Fourth edition. 2005; 301-9
64. Roy M. Pitkin. Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington, DC: National Academy Press, 1998, pp. 196-305
65. Budak N. Folik Asitin Kadın ve Çocuk Sağlığında Önemi. *Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal)* 24(4) 209-214, 2002

66. Krishnaswamy K, Madhavan Nair K. Importance of folate in human nutrition. *Br J Nutr.* 2001 May;85 Suppl 2:S115-24
67. Wolters M, Strohle A, Hahn A. [Age-associated changes in the metabolism of vitamin B(12) and folic acid: prevalence, aetiopathogenesis and pathophysiological consequences]. *Z Gerontol Geriatr.* 2004 Apr;37(2):109-35
68. Challem J, Doldy V. Homocysteine the secret killer. Keats Publishing, Inc. New Canaan.1997:165-168
69. Aubard Y, Darodes N, Cantaloube M. Hyperhomocysteinemia and pregnancy: review of our present understanding and therapeutic implications. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000;93:157–65
70. Dikmen M. Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enziminin moleküler biyolojisi ve hastalıklarla ilişkisi. *Kocatepe Tıp Dergisi.* 2004;5:9-16
71. Burtis C.A,Ashwood E.R. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry.*Third Edition 1999;460-461,473-474
72. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA.* 1993;270:2693-8
73. McCully KS. Homocysteine and vascular disease. *Nat Med.* 1996; 2: 386-9
74. Fodinger M, Horl WH, Sunder-Plassmann G. Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *J Nephrol.* 2000;13:660–4
75. Faraci FM and Lentz SR. Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction. *Stroke.* 2004;35:345-347
76. Böger RH, Lentz SR, Bode-Böger SM, Knapp HR and Haynes WG. Elevation of asymmetric dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. *Clin Sci.* 2001;100:161–167.105-111
77. Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway:role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation.* 2001;104:2569-75

78. Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello PM. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation*. 2001;103:2717-23
79. Mansoor MA, Bergmark C, Svardal AM. Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with early-onset peripheral vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:232-40
80. Kanani PM, Sinkey CA, Browning RL. Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. *Circulation*. 1999;100:1161-8
81. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest*. 1993;91
82. Nappo F, De Rosa N, Marfella R. Impairment of endothelial functions by acute hyperhomocysteinemia and reversal by antioxidant vitamins. *JAMA*. 1999;281:2113-8
83. Lentz SR, Sadler JE. Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest*. 1991;88:1906-14
84. Nexø E, Andersen J. Unsaturated and cobalamin saturated transcobalamin I and II in normal human plasma. *Scand J Clin Lab Invest* 1977;37: 723–8
85. 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
86. Björkstén KS, Thorell LH, Nexø 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
87. Nexø 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
88. Carmel R. R-binder deficiency. A clinically benign cause of cobalamin pseudodeficiency. *JAMA* 1983;250:1886–90

89. Morkbak AL, Pedersen JF, Nexo E. Glycosylation independent measurement of the cobalamin binding protein haptocorrin. *Clin Chim Acta* 2005;356:184–90
90. Refsum H, Johnston C, Guttormsen AB, Nexo E. Holotranscobalamin and total transcobalamin in human plasma: determination, determinants, and reference values in healthy adults. *Clin Chem* 2006;52:129–37
91. Carmel R, Herbert V. Deficiency of vitamin B12-binding alpha globulin in two brothers. *Blood* 1969;33:1–12
92. 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
93. Hall CA. Congenital disorders of vitamin B12 transport and their contributions to concepts. II. *Yale J Biol Med* 1981;54:485–95
94. Li N, Rosenblatt DS, Seetharam B. Nonsense mutations in human transcobalamin II deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;204:1111–18
95. Nexo E, Christensen AL, Hvas AM, Petersen TE, Fedosov SN. Quantification of holotranscobalamin, a marker of vitamin B12 deficiency. *Clin Chem* 2002;48:561–2
96. Ulleland M, Eilertsen I, Quadros EV, et al. Direct assay for cobalamin bound to transcobalamin (holo-transcobalamin) in serum. *Clin Chem* 2002;48:526–32
97. Brady J, Wilson L, McGregor L, Valente E, Orning L. Active B12: a rapid, automated assay for holotranscobalamin on the Abbott AxSYM analyzer. *Clin Chem* 2008;54:567–73,
98. Loikas S, Loppönnen M, Suominen P, et al. RIA for serum holotranscobalamin: method evaluation in the clinical laboratory and reference interval. *Clin Chem* 2003;49:455–62
99. Holmberg CG et al; methylmalonic acid excretion and serum vitamin B12 *Scand J Heamat* 3: 399, 1966

100. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper Biyokimya. 25. baskı. (Çeviri Editörleri, Dikmen N, Özgünen T) Dstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Yayınları; 2004
101. Solberg HE. Establishment and Use of Reference Values. In: Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook Of Clinical Chemistry. 3thed. Philadelphia: Saunders,1999: 336-356
102. Boyd JC, Lacher DA. The Multivariate Reference Range: An Alternative İnterpretation of Multi Test Profiles. Clin Chem 1982; 259-265
103. Balcı Y. Laboratuvar Hasta Verileri Kullanılarak Biyokimya Testlerinde Referans Aralıkları Belirlenmesi. Uzmanlık Tezi. İstanbul, 2006:1-57
104. Solberg HE. Using A Hospitalized Population to Establish Reference Intervals: Pros And Cons. Clin Chem 1994; 40(12): 2205-2206
105. Murphy EA. The Normal andthe Perils of The Syleptic Argument. Perspect Biol Med 1972; 15: 566-582
106. Aslan D. Referans Aralıkların Hesaplanması. In: Gezer S, Güner G,Tuncel P. Klinik Laboratuvarlarda Yöntem Seçimi Değerlendirilmesi ve Laboratuvara Uygulanması. Kurs Kitabı. İzmir; 2000: 80-119
107. Laleli Y, Akbay A.Referans Aralık Analizi. In: Taga Y, Aslan D, Güner G, Kutay Fz. Tıbbi Laboratuvarlarda Standardizasyon ve Kalite Yönetimi. Ankara; 2000:124-137
108. Arpacı A. Referans Aralık Analizi. In: Aksoy K, Tuli A, İnal TC ve ark. Klinik Laboratuvarlarda Standardizasyon ve Kalite Güvencesi Eğitim Ve Uygulama Toplantısı-III. Adana,2000:108-115
109. Haris EK. Effects of intra and interindividual variation on the appropriate use of normal ranges. Clin chem 1974; 20: 1535-1542
110. Solberg HE, Grasbeck R. Reference Values. Adv Clin Chem 1989; 27: 1-79
111. Toprakçı M. Hastane Laboratuvar Test Verileri Kullanılarak Klinik Testlerin Referans Aralıklarınının Saptanması. Uzmanlık Tezi. İstanbul,2000:1-110

112. Reed AH, Henry RJ, Mason WB. Influence of Statistical Method Use on the Resulting Estimate of Normal Range. Clin Chem 1971; 17: 275-284
113. Martin HF, Hologgites JV. Reference Values Based on Populations Accessible to Hospitals. In: Reference Values in Laboratory Medicine Chichester: Wiley. 1981; 233-262.
114. Werner M, Tolls RE. Influence of Sex and Age of Eleven Serum Constituents. J Clin Chem Clin Biochem 1990; 8: 105-115
115. Ash KO, Clark SJ. The Influence of Sample Distribution and Age on Reference Intervals for Adult Males. Am A J Clin Pathol 1983; 79: 574-581
116. Horn PS. A Robust Approach to Reference Interval Estimation and Evaluation. Clin Chem 1998; 44: 622-631
117. CLSI. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline. Third ed. Wayne, PA: CLSI, 2008
118. Enli Y. Denizli'de Yaşayan 18-40 Yaş Arası Bireylerde Farklı Yöntemlerle Referans Aralıkların Saptanması. Uzmanlık Tezi. Denizli. 2001; 1-113
119. Özgünen T, Üstdal M, Hekimlikte Biyokimya: Hangi Test İstenmeli? 1. Baskı, İstanbul: Barış Kitabevi, 1997: 226-240
120. Hoffbrand AV, Weir DG. Historical Review. The History Of Folic Acid. Br J Haematol. 2001;113(3): 579-589
121. Wilk S. Statistical Prediction with Special Reference to the Problem of Tolerance Limits. Ann Math Statist 1941; 13: 400
122. Soysal T. Megaloblastik Anemiler. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Anemiler Sempozyumu. İstanbul, 2001: 33-47
123. Horn PS. A biweight prediction interval for random samples. J Am Stat Assoc 1988;83:249-256.
124. John W. Tukey. "Exploratory Data Analysis". Addison-Wesley, Reading, MA. 1977

125. McWilliams TP. A Distribution-Free Test for Symmetry Based on a Runs Statistic. *J Am Stat Assoc* 1990;85:1130-1133
126. Carmel R. Biomarkers of cobalamin (vitamin B-12) status in the epidemiologic setting: a critical overview of context, applications, and performance characteristics of cobalamin, methylmalonic acid, and holotranscobalamin II 2011 *Am J Clin Nutr* doi: 10.3945/ajcn.111.013441
127. Kushnir MM, Komaromy-Hiller G, Shushan B, Urry FM, Roberts WL; Analysis of Dicarboxylic Acids by Tandem Mass Spectrometry. High-Throughput Quantitative Measurement of Methylmalonic Acid in Serum, Plasma, and Urine; *Clin Chem*. 2001 Nov;47(11):1993-2002.
128. González-Gross M, Benser J, Breidenassel C, Albers U, Huybrechts I, Valtueña J, Spinneker A, Segoviano M, Widhalme K, Molnar D, Moreno LA, Stehle P, Pietrzikb K, behalf of the HELENA Study group; Gender and age influence blood folate, vitamin B12, vitamin B6, and homocysteine levels in European adolescents: the Helena Study; *Nutr Res*. 2012 Nov;32(11):817-26. doi: 10.1016/j.nutres.2012.09.016
129. Demirin H, Memişoğulları R, Uçgun T, Yıldırım HA, Celer A, Bulur Ş, Yanık ME, Güneş C.; Batı Karadeniz Bölgesinde yaşayan Türk erişkinlerinde demir, ferritin, B12 vitamini ve folat gibi anemi parametrelerinin referans aralıkları uygun mudur?; *Türk J Biochem*, 2012; 37 (4); 356–361
130. Önder Y, Tezcan S, Kadılar ÖH, Dağdelen LK, Madenci ÖÇ, Yücel N, Orçun A; Kartal Bölgesinde Vitamin B12 ve Folik Asit Referans Aralıklarının Belirlenmesi; *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2014; 12(3): 131-136
131. Akin F, Yavuz H, Bodur S, Kiyici A. Vitamin B12 levels of subjects aged 0-24 year(s) in Konya, Turkey; *J Health Popul Nutr*. 2014 Dec;32(4):615-22
132. Fayet-Moore F, Petocz P, Samman S; Micronutrient status in female University Students: Iron, Zinc, Copper, Selenium, vitamin B12 and Folate; *Nutrients* 2014,6, 5103-5116; doi:10.3390/nu6115103
133. Güngören MS, Mersin Bölgesinde Vitamin B12 Ve Folik Asit Düzeylerine Ait Referans Aralıklarının Belirlenmesi Mersin-2008

134. Lahiri KD, Datta H, Das HN; Reference Interval Determination of Total Plasma Homocysteine In An Indian Population; Indian J Clin Biochem (Jan-Mar 2014) 29 (1): 74-78 doi:10.1007/s12291-013-0304-5
135. Akbayır S, Balcı Fidancı Ş, Şen F, Yırtsever Bakır A, Orekici Temel G, Ünal N, Tamer Gümüş L; Mersin bölgesinde Homositein, Vitamin A, Vitamin E düzeylerine Ait Referans Aralıklarının Belirlenmesi; Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2011;4(1)
136. Ayşe Arzu Eren, Ufuk Üniversitesi Dr.Rıdvan Ege Hastanesi Polikliniklerine Başvuran Hastalarda Serum Vitamin B12 Ve Folik Asit, Homosistein Değerleri İle Nöropsikiyatrik Şikâyetlerin İlişkisi, uzmanlık Tezi, Ankara 2011;1-74
137. Magera MJ, Helgeson JK, Matern D, Rinaldo P; Methyl Malonic Acid Easured İn Plasma And Urine By Stable-Isotopr Dilution And Electrospray Tandem Mass Spectrometry; Clinical Chemistry 2000; 46:11 1804-1810
138. Obeid R, Geisel J, Herrmann W; Compaison of two methods for measuring methylmalonic acid as a marker for vitamin B12 deficiency; Diagnosis 2015;2(1) 67-72
139. Valente E, Scott JM, Ueland PM, Cunningham C, Casey M, Molly AM; Diagnostic Accuracy of Holotranscobalamin, Methylmalonic Acid, Serum Cobalamin, and Other Indicators of Tissue Vitamin B12 Status in the Elderly; Clinical Chemistry 2011; 57:6 856–86
140. Lewerin C, Nilsson-Ehle H, Jacobsson S, Karlsson MK, Ohlsson C, Mellström D; Holotranscobalamin is not influenced by decreased renal function in elderly men: the MrOS Sweden study; Ann Clin Biochem. 2013 Nov;50(Pt 6):585-94. doi: 10.1177/0004563212474939

10. EK

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırmanın Adı:Vitamin B12 İlişkili Belirteçlerin Genç Orta Yaş Sağlıklı Donörlerde Referans Aralıklarının Belirlenmesi

Araştırmanın Sorumlusu:

Prof.Dr.Selda Demirtaş

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

“Vitamin B12 İlişkili Belirteçlerin Genç Orta Yaş Sağlıklı Donörlerde Referans Aralıklarının Belirlenmesi” isimli bir çalışma yapılmaktadır.

Bu çalışmaya hastanemiz kan bankasına ve polikliniklerine başvurmuş Gönüllüler alınacaktır. Çalışmaya herhangi bir sağlık problemi olmayan, bitkisel içerikli olsa dahi son üç ay içerisinde ilaç kullanmamış, gebeliği olmayan kadın-erkek yaklaşık olarak 550 gönüllü katılacaktır. Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Eğer katılmaya karar vererseniz bu “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formunu” imzalamanız gerekmektedir.

Çalışmaya katılmakla herhangi bir parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de bir ödeme yapılmayacaktır. Ayrıca sizden çalışmamız için fazladan kan alınmayacaktır. Tetkikleriniz için vermiş olduğunuz numunelerden çalışılacaktır.

Çalışma doktorunuz size ait kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacak ancak kimlik bilgileriniz çalışma boyunca hekiminiz tarafından gizli tutulacaktır. Çalışmanın sonunda bu bilgiler hakkında bilgi istemeye hakkınız vardır. Çalışma sonuçları çalışma bitiminde tıbbi literatürde yayımlanabilecektir ancak yine kimliğiniz gizli tutulacaktır.

Çalışma ile ilgili ek bilgiye ihtiyacınız olduğunda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

Adı: Dr. Sedat ÖZDEMİR Görevi:Asistan Doktor

Telefon: 05059437265

Katılımcı/Hastanın Beyanı:

Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında Dr. Sedat ÖZDEMİR tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek, bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve yukarıdaki metni okudum. Bu bilgilerden sonra bu araştırmaya "katılımcı" olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı red edersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeksizin araştırmadan çekilebilirim.(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağını bilincindeyim.)

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum ve bana da herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Bana yapılan açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım.

Bu koşullarda söz konusu çalışmaya kendi rızamla hiç bir zorlama olmaksızın gönüllülük içinde katılmayı kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı Soyadı:

Tel:

İmza:

Tarih:

Katılımcı ile görüşen hekim: Dr. Sedat ÖZDEMİR