

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

B₁₂ VİTAMİNİ EKSİKLİĞİ OLAN ÇOCUKLARDA
SERUM S100B PROTEİN DÜZEYİNİN ÇALIŞILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. Veysi ALMAZ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet KOÇ

ŞANLIURFA
2012

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

B₁₂ VİTAMİNİ EKSİKLİĞİ OLAN ÇOCUKLARDA
SERUM S100B PROTEİN DÜZEYİNİN ÇALIŞILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Veysi ALMAZ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ahmet KOÇ

Bu tez, Harran Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 2011/1117 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA

2012

TEŞEKKÜR

Tez konusunun belirlenmesinde, çalışmaların planlanması ve yürütülmesi esnasında destek ve yardımlarını gördüğüm değerli tez hocam Prof. Dr. Ahmet KOÇ'a teşekkürlerimi sunarım.

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniğindeki uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde büyük emeği geçen, her konuda desteğini esirgemeyen, tecrübe ve deneyimlerinden çok şey kazandığım değerli hocalarım; Prof. Dr. Akın İŞCAN, Doç. Dr. C. Dost ZEYREK, Doç. Dr. Kabil SHERMATOV, Doç. Dr. Alpay ÇAKMAK, Doç. Dr. Ali ATAŞ, Doç. Dr. Ali AYÇİÇEK, Yrd. Doç. Dr. Mahmut ABUHANDAN, Yrd. Doç. Dr. Bülent KOCA ve Yrd. Doç. Dr. Mustafa SORAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımdaki yardım ve desteklerinden dolayı Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki sevgili hocam Prof. Dr. Nurten AKSOY, Öğretim Görevlisi Abdullah TAŞKIN, Araşt. Gör. Dr. Murat ÜSTÜNEL ve laboratuvar çalışmaları esnasında yardımlarından dolayı Biyokimya A.D. çalışanlarına gönülden teşekkür ederim.

Asistanlık eğitimim süresince klinikteki çalışmalarımda ve tezimde yardımlarını esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, sıkıntılı ve güzel günleri paylaştığım değerli arkadaşlarım başta Dr. Hasan KAPAKLI olmak üzere tüm Çocuk Kliniği asistanlarına, hemşirelerine ve personeline ayrıca teşekkür ederim.

Eğitim süresince maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili eşim Semra'ya, canım kızlarım Büşra ve Cemre'ye, destek ve dualarını hiçbir zaman eksik etmeyen anneme, babama ve diğer aile fertlerine teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Dr. Veysi ALMAZ

Şanlıurfa 2012

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Anemi	4
2.1.1. Megaloblastik anemi	4
2.2. B₁₂ Vitamini	4
2.2.1. B₁₂ Vitaminin Tanımı, Tarihi ve Yapısı	4
2.2.2. B₁₂ Vitaminin Fizyolojik Önemi ve Fonksiyonu	7
2.2.3. B₁₂ Vitamininin Biyokimyasal Özellikleri	8
2.2.4. Homosistein ve Metabolizması	10
2.2.5. Metil Malonik Asid	11
2.2.6. B₁₂ Vitaminin Emilimi, Taşınması ve Metabolizması	11
2.2.7. Kobalamin Bağlayıcı Proteinler	15
2.2.8. B₁₂ Vitaminin Besinsel Kaynakları	15
2.2.9. B₁₂ Vitaminin Gereksinimi	16
2.2.11. Yenidoğanda ve Süt Çocuklarında B₁₂ Vitamini Eksikliği	17
2.2.10. B₁₂ Vitamini Eksikliğinin Nedenleri	18
2.2.12. B₁₂ Vitamini Eksikliğinin Bulguları	19
2.2.13. B₁₂ Vitamini Eksikliğinde Nöron Gelişimini Etkileyen Mekanizmalar	20
2.2.14. B₁₂ Vitamini Eksikliği Anemisinde Laboratuvar / Tanı	23
2.2.15. B₁₂ Vitamini Eksikliğinin Tedavisi	24

3. S100 PROTEİNİ	26
3.1. S100 Proteinin Tarihçesi	26
3.2. S100 Proteininin Yapısı ve Biyokimyasal Özellikleri	26
3.3. S100B	27
3.3.1. S100B Proteininin Klinik Kullanımı ile İlgili Çalışmalar	30
4. MATERYAL VE METOD	32
5. İSTATİSTİK	35
6. BULGULAR	36
7. TARTIŞMA	40
8. KAYNAKLAR	45

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo I. B₁₂ vitamini için önerilen günlük ihtiyaç miktarları	16
Tablo II: Çocukluk çağında B₁₂ vitamini eksikliği sebepleri	18
Tablo III. Hasta ve kontrol grubundaki yaş ortalaması ve cinsiyet oranları	36
Tablo IV: Grup I ve II'deki çocukların ortalama hematolojik ve Serum S100B parametrelerinin karşılaştırması	37
Tablo V: Serum S100B düzeyinin ve B₁₂ vitamini düzeyinin tedavi ile değişimleri	37
Tablo VI: Nörolojik olarak etkilenmiş hasta ile nörolojik olarak etkilenmemiş hastaların biyokimyasal parametrelerinin karşılaştırılması	39

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1. Korrin halka yapısı	5
Şekil 2. B ₁₂ Vitaminin yapısı	6
Şekil 3. B ₁₂ Vitaminine Bağımlı Metiyonin Sentaz Enzimiyle Metiyonin ve TH4-Folat Oluşumu	9
Şekil 4. B ₁₂ Vitaminin ince barsaktan emilim mekanizması	13
Şekil 5. TCII-Vitamin B ₁₂ kompleksinin lizozomlara alınması	14
Şekil 6. S100 Proteinlerinin sekonder yapısı. Kalsiyum bağlama bölgeleri (L1-L2) ve tersiyer yapıda katlanacak olan heliksler	27
Şekil 7. Serebral ve ekstraserebral S100B salınımı ve üriner atılımı	27
Şekil 8. S100B proteinin ekstraselüler alanda etkileri	28
Şekil 9. S100B'nin ekstraselüler alandaki konsatrasyona bağlı olarak nöronlardaki etki mekanizmasının şematik görünümü	29
Şekil 10: Serum S100B düzeyinin tedavi ile değişimi ve kontrol grubu ile karşılaştırılması	38

KISALTMALAR

AdoCbl: Adenozilkobalamin

AGTETP: Ankara Gelişim Tarama Envanteri Test Puanı

CNCbl : Siyanokobalamin

DEA : Demir Eksikliği Anemisi

GSHPx: Glutasyon Peroksidaz

Hb : Hemoglobin

Hct : Hematokrit

MCHC: Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu

MCV : Ortalama Eritrosit Volümü

MeCbl: Metilkobalamin

OHCbl: Hidroksikobalamin

RDW : Eritrosit Dağılım Genişliği

RES : Retikülo Endotelyal Sistem

BBT: Bilgisayarlı Beyin Tomografisi

Bcl-2: B cell leukemia-2

BMI: Body Mass Index (Vucut Kitle İndeksi)

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

Ca: Kalsiyum

CSF: Serebro Spinal Sıvı

CDR: Clinical Dementia Rating

DHFR: Dihidro Folat Redüktaz

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

DSO: Dünya Sağlık Örgütü

EDTA: Etilen Diamin Tetraasetik asit

EGF: Epidermal Growth Faktür

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

H-MRS: Proton MR Spektroskopisi

HİE: Hipoksik İskemik Ensefalopati

IFN: İnterferon

IG: İmmunglobulin

IL: İnterlökin

İVH: İntra Ventriküller Hemoraji

MAPK: Mitojenlerle Aktifleşen Protein Kinaz

MMA: Metil Malonik Asit

MRG: Manyetik Rezonans Görüntüleme

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

NO: Nitrik Oksit

iNO: İyonize Nitrik Oksit

PEM: Protein Enerji Malnütrisyonu

RNA: Ribonükleik Asit

RAGE: İleri Glikolizasyon Son Ürünleri İçin Reseptör

SAM: S-Adenozil Metyonin

SAH: S-Adenozil Hidroksil

SCDSC: Spinal Kordun Subakut Kombine Dejenerasyonu

SD: Standart Deviasyon

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

THF: Tetra Hidro Folat

TNF: Tümör nekrozis faktör

Vit: Vitamin

ÖZET

B₁₂ VİTAMİNİ EKSİKLİĞİ OLAN ÇOCUKLARDA SERUM S100B PROTEİN DÜZEYİNİN ÇALIŞILMASI

**Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları
Uzmanlık Eğitimi Bitirme Tezi
Dr.Veysi ALMAZ**

Giriş ve Amaç: B₁₂ vitamininin en önemli fonksiyonu, hücrelerin bölünmesi ve çoğalması için gerekli olan DNA sentezini sağlamaktır. Eksikliği megaloblastik anemi yanında, psikiyatrik ve hematolojik bozukluk ile fiziksel ve nöro-motor gelişme geriliğine de neden olur. Özellikle demiyelinizasyon etkisi nedeniyle, beyin ve sinir sistemi gelişimi önemli derecede etkilenir. Hastalığın tanısı ve tedavisi kolay olmakla birlikte, geç tanı konan vakalarda sinir sistemindeki bozukluğun düzelmesi tam olmayabilmekte ve kalıcı nörolojik bozukluklar görülebilmektedir.

S100B esas olarak astrositlerce üretilen, nöronlar ve glia üzerinde parakrin ve otokrin etki gösteren Ca bağlayıcı peptittir. S100B bir asidik protein olup sinirsel gelişim, farklılaşım ve beynin onarımında önemli bir faktördür. Sekrete edilmiş glial S100B'ler düşük (Nanomolar) konsantrasyonlarda nöronun fazla gelişimini uyarır. Aksine, ekstraselüler S100B'nin yüksek (mikromolar) seviyelerinde ise, proinflamatuvar stokinlerin ekspresyonunu uyarır ve apoptozu indükler. Bu çalışmada çocuk hastalardaki B₁₂ vitamini eksikliğinin serum S100B proteini düzeyi ile ilişkisi araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışmaya yaşları 1-24 ay arasında olan B₁₂ vitamini eksikliği tanısı konulmuş 48 hasta ve 47 sağlıklı çocuk kontrol grubu olarak alındı. Tam kan sayımı otomatik kan sayım cihazı (celldyn 3700) ile yapıldı. B₁₂ vitamini ve ferritin tayini rutin biyokimya kitiyle elektrokemiluminisans yöntemiyle (ECLIA) ölçüldü. Serum S100B ölçümü ELISA kitleri ile ölçüldü. Çalışmada SPSS 17.0 kullanılarak istatistiksel analizler yapıldı ve p<0,05 olması anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular: Hasta grubunun ortalama B₁₂ vitamin düzeyi, Hemoglobin (Hgb) değeri, ve S100B düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu. Hasta grubunun MCV değeri ise anlamlı derecede yüksek bulundu (P değerleri sırayla; p<0.001, p<0.001, p<0.001 ve p=0,01). Hasta olgularımızda kobalamin tedavisine başladıktan 7. gün ve 3 ay

sonraki bakılan serum S100B düzeyleri tedavi öncesi serum S100B düzeyine göre 7. gündeki artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ancak 3. Aydaki serum S100B düzeyi hem tedavi öncesine göre hem de tedavinin 7. gününe göre istatistiksel olarak anlamlı artış vardı. (P değerleri sırasıyla; $p = 0.38$, $p < 0.001$, $p = 0.002$). (tablo5).

Sonuç: Sonuç olarak B₁₂ vitamin eksikliği olan çocuklarda düşük serum S100B düzeyi görülmektedir. B₁₂ vitamini tedavisi ile serum S100B düzeyi giderek artmakta; ancak serum S100B düzeyi tedavinin 3. ayında bile kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük kalmaktadır. B₁₂ vitamin eksikliği olan hastalarda serum S100B düzeyinin fizyolojik sınırın altında olmasının bu hasta grubunda bulunan nörolojik gelişim geriliğine katkıda bulunduğunu düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: Çocuk, B₁₂ vitamin eksikliği, Nörolojik gelişim ve S100B

ABSTRACT

STUDY OF SERUM S100B PROTEIN LEVELS AT CHILDREN WITH B12 VITAMIN DEFICIENCY

Introduction and Objective: The most important function of vitamin B12 is to provide DNA synthesis which is required for the proliferation and division of the cells . B12 deficiency causes megaloblastic anemia, as well as psychiatric and hematological disorders and physical and neuro-motor developmental retardation. Especially, due to the impact on myelination (demyelination), the development of the brain and nervous system is significantly influenced. Although the disease is easily diagnosed and treated, in late-diagnosed cases, full recovery of the nervous system disorder may not be seen and permanent neurological disorders can be seen.

S100B is a Ca-binding peptide that is mainly produced by astrocytes, and acting on neurons and glia as autocrine and paracrine. S100B is an acidic protein, and an important factor in neuronal development and differentiation, at repair of the brain. Glial secreted S100B stimulates the neuronal development at nanomolar (low) concentrations. In contrast, micromolar (high) levels of extracellular S100B stimulates the expression of proinflammatory cytokines and induces apoptosis. In this study we aimed to investigate, the relationship between vitamin B12 and serum S100B protein level. In children who were diagnosed as vitamin B12 deficiency.

Methods: This study included 48 patients who have vitamin B12 deficiency between ages 1-24 months and 47 healthy children as a control group. Complete blood counts were made by using automated blood count device (Celldyn 3700). Vitamin B12 and ferritin levels were determined using electrochemiluminescence kit "ECLIA". Serum S100B levels were measured by ELISA kits. Statistical analysis was performed using SPSS 17.0 and "p" value below 0.05 was considered as significant.

Results: In patient group, vitamin B12, hemoglobin (Hgb), and S100B levels were significantly lower than the control group. MCV values were significantly higher in

patients group (P values, respectively, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$ and $p = 0.01$). (P values respectively, $p < 0.001$, $p < 0.001$). In patient group S100B serum value at 7 days after initiation of therapy was higher compared to pretreatment value of serum S100B; after 3 months of treatment, value of serum S100B has found statistically significantly higher than both pretreatment and 7 days' value (P values respectively, $p < 0.001$, $p < 0.001$).

Conclusion: In conclusion, low serum levels of S100B is seen in children with vitamin B12 deficiency. Treatment with vitamin B12 increases serum S100B level. However, serum S100B levels were significantly lower than the control group even 3 months of treatment. We think that serum S100B levels which below the physiological limits contributes neurological development retardation in vitamin B12 deficiency patients.

Keywords: Child, vitamin B12 deficiency, neurological development and S100B

1. GİRİŞ ve AMAÇ

B₁₂ vitamini Suda eriyebilen bir vitamindir. B₁₂ vitamini İnsan kalın bağırsağında bakteriler tarafından sentez edilebilir ancak emilen miktar çok az ve yetersizdir. İnsanlar için B₁₂ vitamininin en önemli kaynakları karaciğer, kırmızı et, yumurta, peynir ve süt gibi hayvansal gıdalardır. B₁₂ vitamini hayvansal gıdaların çoğunda yeterli miktarda bulunduğundan, normal beslenenlerde diyetle bağlı eksiklik nadirdir. Ancak diyetle yetersiz alımı B₁₂ vitamini eksikliğinin önemli bir sebebidir [1].

B₁₂ vitamininin en önemli fonksiyonu, hücrelerin bölünmesi ve çoğalması için gerekli olan DNA sentezini sağlamaktır. Eksikliği megaloblastik anemi yanında, psikiyatrik ve hematolojik bozukluk ile fiziksel ve nöro-motor gelişme geriliğine de neden olur. Özellikle demiyelinizasyon etkisi nedeniyle, beyin ve sinir sistemi gelişimi önemli derecede etkilenir. Hastalığın tanısı ve tedavisi kolay olmakla birlikte, geç tanı konan vakalarda sinir sistemindeki bozukluğun düzelmesi tam olmayabilmekte ve kalıcı nörolojik bozukluklar görülebilmektedir. Bu nörolojik bozulmalar özellikle 1 yaşın altındaki çocuklarda daha belirgindir. B₁₂ vitamini eksikliği olan çocuklarda baş tutma, oturma, yürüme, konuşma gibi tüm fonksiyonlar gecikebilir. Hatta uzun süre B₁₂ eksikliğine maruz kalınması geri dönüşümsüz hasarlara neden olabilir. Nörolojik etkilerinin yanında, Alzheimer hastalığı, miyelodisplastik sendrom, nöral tüp defekti ve sipina bifida gibi bir çok hastalığın etiyolojisinde suçlanması konunun önemini daha da artırmaktadır [2, 3].

Bebeklik dönemindeki megaloblastik aneminin en önemli nedeni annelerdeki B₁₂ vitamini eksikliğidir. B₁₂ vitamini eksikliği olan annelerden doğan bebeklerde, özellikle yalnız anne sütüyle besleniyorsa, hem doğum öncesinde plasenta yoluyla, hem de doğum sonrası anne sütüyle B₁₂ vitamini alımı yetersiz olduğundan, ağır derecede B₁₂ vitamini eksikliği görülebilir [1,4,5]. Ülke genelinde görülme sıklığı tam bilinmemekle birlikte, sosyoekonomik düzeyi düşük olan ve paraziter enfeksiyonların sık olduğu ilimiz Şanlıurfa'da B₁₂ vitamini eksikliği görülme insidansı yüksektir [6,7]. Bölgemizde yapılan bir çalışmada, B₁₂ vitamini eksikliği sıklığı doğumdan hemen önceki günlerde gebe kadınlarda %72,38 ve yenidoğan bebeklerde %41,24 olarak bulunmuş, ayrıca anne ve bebek serum B₁₂ vitamini düzeyi arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır [7]. Demir ve

arkadaşlarının Şanlıurfa bölgesinde yaptığı bir çalışmada B₁₂ vitamini eksikliği tanısıyla hastanede yatırılan ve yaşları 6-24 ay arası olan 30 hasta çocuğun 25'inin (%83,33) sadece anne sütü ile beslendikleri ve bu bebeklerin %77'sinin anne B₁₂ vitamini düzeyinin de düşük olduğu tespit edilmiştir [6].

B₁₂ Vitamini, metil tetrahidrofolatın (metil TH₄-folat), TH₄ – folat'a ve homosistenin metiyonine dönüştüğü ve "metiyonin sentaz" enziminin rol aldığı reaksiyon sonucunda metiyonin (metilasyon reaksiyonları) ve timidilat (nükleik asit sentezi) oluşumu gibi kritik bir görevde kofaktör olarak rol alır. İkinci bir reaksiyon da Adenozilkobalamin; metilmalonil CoA'nın süksinil CoA'ya dönüşümde gereklidir. Yetersiz dönüşümde tek zincirli yağ asid sentezi için gerekli olan Propiyonil CoA (üç karbonlu molekül) ve metilmalonil CoA'nın (üç karbonlu molekül) birikmesi ile sonuçlanır. B₁₂ vitamini eksikliğine bağlı bu iki reaksiyon aksadığında oluşan nörolojik hasar çeşitli teorilerle açıklanmıştır.

Klinik ve laboratuvar bulguları olmadan da serum B₁₂ vitamini seviyelerindeki düşüklüğün oldukça sık görülmesi, gerek çocukluk çağında, gerekse erişkin yaşlarda oluşabilecek sağlık sorunları açısından bizi bu konuda çalışma yapmaya teşvik etmektedir. [1, 8,9,10,11].

S100 proteini, omurgalılarda bulunan kalsiyum-modüle proteinlerden olup EF-eL tipi ve multijenik bir ailedir. S100B esas olarak astrositlerce üretilen, nöronlar ve glia üzerinde parakrin ve otokrin etki gösteren Ca bağlayıcı peptittir. S100B bir asidik protein olup sinirsel gelişim, farklılaşım ve beyin onarımında önemli bir faktördür. Salgılanmış glial S100B düşük (Nanomolar) konsantrasyonlarda nöronun fazla gelişimini uyarır. Aksine, ekstraselüler S100B yüksek (mikromolar) düzeylerde ise, proinflamatuvar stokinlerin ekspresyonunu uyarır ve apoptozu indükler. S100B ölçümü beyin hasar indeksini göstermede önemlidir. Henüz klinik muayene ve kraniyal USG ile bulguların saptanamadığı dönemde S100B serumda yükselir; erken tanı belirteci olarak anlamlıdır. Gazaalo ve arkadaşları ventrikül içi kanaması (IVH) olan prematür bebeklerde veya hipoksik-iskemik ensefalopatili (HIE) matür bebeklerde serum S100B'nin klinik ve USG bulgularından 48-72 saat önce arttığını tespit etmişlerdir. Beyin travması ve iskemi, muhtemel astrosit hasarına bağlı olarak artmış S100B konsantrasyonu ile ilişkilidir. Beyin hasarında S100B proteini, beyin omurilik sıvısına (BOS) ve daha sonra kana geçerek seviyesi artmaktadır. S100B proteinin plazmadaki değerleri özellikle malign melanom ve

kardiyak cerrahiye maruz kalan pediatrik hastaların takibinde önemli bir belirteçdir [12,13,14]. Alzheimer hastalarında da yapılan çalışmada serum S100B proteini seviyesi anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Bu çalışmaların çoğunda S100B proteini beyin hasarlarında kolay ölçülebilen ve erken prognostik değere sahip bir biyolojik belirleyici olarak ortaya çıkmaktadır [15,16,17].

Literatürde daha önce B₁₂ vitamini eksikliği tanısı alan hastalarda serum S100-B düzeyi ile ilgili yapılmış çalışma bulunmamakta ve bu hastalarının nörolojik bulgularla korelasyon gösteren herhangi bir laboratuvar parametresi kullanılmamaktadır. Beyin travması, hipoksik iskemik beyin hasarı, nörodejeneratif hastalıklarda düzeyinde artış saptanan serum S100B proteininin B₁₂ vitamini eksikliği tanısı alan hastalarda da nörolojik gelişimi değerlendirmede bilgi verebileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Anemi

Eritrosit kitlesinin veya hemoglobin (Hb) düzeyinin yaşa ve cinse göre normal değerlerin alt sınırlarının altına düşmesi anemi olarak tanımlanır.[1]

2.1.1. Megaloblastik anemi

Megaloblastik anemiler deoksiribonükleik asit (DNA) sentezinde bozulma sonucu ortaya çıkan, periferik kanda makrositik anemi, kemik iliğinde inefektif hematopoez ve megaloblastik değişikliklerle karakterize bir grup hastalıktır. Çekirdek olgunlaşmasında ve hücre bölünmesinde gecikme nedeniyle vücut genelinde, özellikle hızlı büyüyen ve hücre yenilenmesi hızlı olan dokular etkilenir. Hematolojik bozukluklar (makrositik anemi, nötropeni, trombositopeni), sindirim sistemi mukozası bozuklukları, nörolojik bozukluklar ve büyüme – gelişme geriliğine yol açabilir.

Çocukluk çağındaki megaloblastik anemilerin %95'ten fazlası B₁₂ vitamini, folik asit veya ikisinin birlikte eksikliğine bağlıdır. Bu iki vitamin birlikte homosisteinin metioninine dönüştürülmesi, protein biyosentezi, metilasyon reaksiyonları ve nukleoproteinlerin sentezi için gerekli olan kofaktörlerdir. Eksiklikleri DNA sentezinde bozulmaya neden olur [18].

2.2.B₁₂ Vitamini

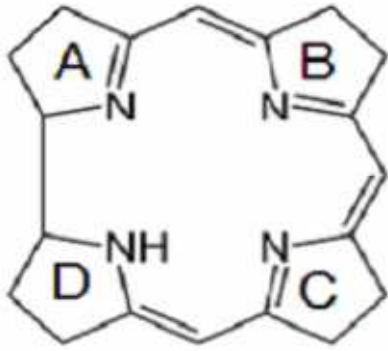
2.2.1. B₁₂ Vitaminin Tanımı, Tarihçesi ve Yapısı

B₁₂ vitamini suda eriyen, 1355.42 dalton moleküller ağırlığı olan, başlıca mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilen kırmızı renkli ve çeşitli türevleri bulunan bir vitamindir. Yapısında korrin halkası ve merkezde kobalt iyonu vardır. Tüm vitaminler

içerisinde en büyük ve kompleks yapıya sahip olmaktadır. Çok düşük dozlarda bile etki yapması yönünden en güçlü etkinlik gösteren vitamin olarak kabul edilir [19,20]

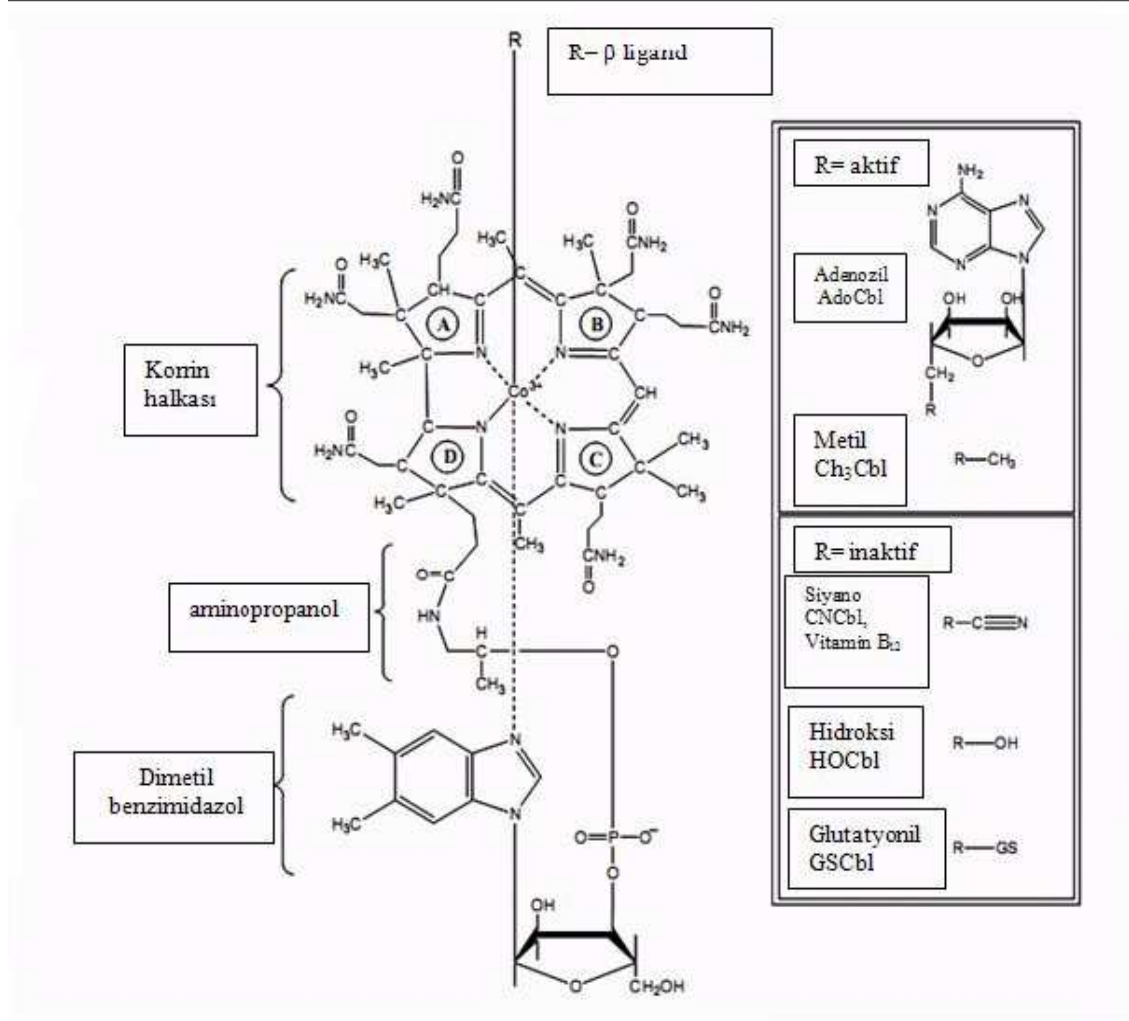
B₁₂ Vitamini suda çözünen B grubu vitamininden birisi olup ayrıca yapısında metal atomu ihtiva eden tek vitamindir [7,21]. B12 vitamini jenerik ismini taşıyan, bir grup fizyolojik olarak aktif bileşik kobalt atomu içermesinden dolayı kimyasal olarak kobalamin veya korrinoidler olarak sınıflandırılırlar [22,23].

B₁₂ vitamini merkezde yer alan kobalt atomunu çevreleyen tetrapireol (A,B,C,D) halkalarından ve kobalt atomuna bağlı yan zincirlerden oluşmuştur [24,25,26]. Kobalt ve diğer yan zincirler olmadan kobalamin tetrapireol halkasına korrin halkası adı verilir (Şekil 1) [27,28]. Kobalt, korrin halka sistemiyle yapıya bağlanmıştır.



Şekil 1. Korrin halka yapısı

Korrin halkası düzleminin altında kalan yani kobalt atomunun α -ligandına 5,6 dimetilbenzimidazol ribozid bağlanır, fakat bazen 5 hidroksibenzimidazol, adenin veya benzer gruplar da bağlanabilir [28,29]. α -ligand yapısının kesin olarak işlevi bilinmemekle beraber 2000 yılından sonra yapılan çalışmalar ile α -ligandın koenzim bağlanmasında ve kataliz görevleri olduğu ileri sürülmüştür [29].



Şekil 2. B₁₂ Vitaminin yapısı.

AdoCbl: Adenozilkobalamin, CH₃Cbl: Metilkobalamin, CNCbl: Siyanokobalamin, OHCbl: Hidroksikobalamin, GSCbl: Glutatyonilkobalamin.

Korin halkası düzleminin üstünde kalan kısma [(β ligandına) (altıncı koordinasyon pozisyonu)]; şekil 2’de görüldüğü gibi R grubuna değişik grupların bağlanması ile B₁₂ vitamin’inin değişik formları oluşur. Metil (-CH₃) grubu bağlanırsa metilkobalamin, 5’deoksiadenozin grubu bağlanırsa deoksiadenozilkobalamin, hidroksil (-OH-) grubu bağlanırsa hidroksikobalamin, su (-H₂O) bağlanırsa aquakobalamin, glutatyonil (-GS) grubu bağlanırsa glutatyonilkobalamin, siyanid (-CN) grubu bağlanırsa siyanokobalamin olarak adlandırılırlar [25,27,28,30,31]. Hematolojik bir terim olarak kobalamin ve B₁₂ vitamini birbirlerinin yerine kullanılabilir [4]. Siyanokobalamin, hidroksikobalamin ve glutatyonilkobalamin biyolojik olarak aktif olan metilkobalamin ve

adenozilkobalamin için prekürsör görevi görürler [30,31,32]. Bu aktif koenzimler metabolik reaksiyonlara katılırlar. Siyanokobalamin bu grupta bulunan bileşikler içinde en dayanıklı formdur ve genellikle ticari olarak satılan B₁₂ vitamin preparatları da bu bileşiği içermektedir [23,25,29,32,33]. Siyanokobalamin; ışığa, alkaliye ve redüksiyon ajanlarına karşı hassastır¹. Plazmada majör olarak metilkobalamin bulunurken (%60-80) dokularda ise majör olarak 5'deoksiadenozil kobalamin bulunmaktadır [24,25,34,35].

2.2.2. B₁₂ Vitamininin Fizyolojik Önemi ve Fonksiyonu

B₁₂ vitamininin en önemli fonksiyonu hücrelerin bölünmesi için gerekli olan DNA yapımını sağlamaktır. DNA yapımı üzerine etkisi TH₄-folat üzerinden olur. Bu nedenle B₁₂ vitamini eksikliğine en duyarlı olan sistemler hücre çoğalma hızının en yüksek olduğu hematopoetik ve gastrointestinal sistemleridir. İkinci önemli etkisi, santral sinir sistemi ve periferik sinir sistemindeki bazı nöronların normal yapı ve fonksiyonlarını sürdürmelerini sağlamasıdır. Hematolojik ve nörolojik etkilerin birbirinden bağımsız olduğu düşünülmektedir. Bunu destekleyen başlıca bulgular [20];

1. Pernisiyöz anemi ve B₁₂ vitamini eksikliğine bağlı megaloblastik anemi olgularında anemi ile birlikte her zaman nörolojik bozukluk bulunmaz. Nörolojik sendrom bazen belirgin hematolojik bozukluk olmadan da meydana gelebilir.
2. İki tür bozukluğun birlikte bulunduğu olgularda bunların şiddeti arasında genellikle bir paralellik yoktur.
3. Folik asit verildiğinde, B₁₂ vitamini eksikliğine bağlı anemilerde hematolojik bozukluk düzeldiği halde nörolojik bozukluk genellikle düzelmez, hatta bazen kötüleşebilir.

Folik asidin etkin şekli olan tetrahidrofolattan (THF) hücre içinde sentez edilen THF türevleri, DNA sentezi ve purin ve pirimidin bazlarının sentezi için gerekli tek karbon ekleme reaksiyonlarını gerçekleştirirler. Bu türevlerin sentezi, B₁₂ vitamininin aktif koenzim şekli olan MCbl aracılığı ile yapılır. Folat kofaktörleri belirli bir düzene göre (folat kofaktörleri siklusu) birbirlerine ve sonunda THF'a dönüşürler. Bu siklus, DNA

yapımı için gerekli timidilatın sentezi, DNA purin ve pirimidin bazlarının sentezi ve serinden gilisinin oluşumu reaksiyonlarına kenetlenmiş bir şekilde sürdürülür [1,20,36].

B₁₂ vitamini eksikliğinde, folatın etkin formu olan THF hücre içinde azalırken, tetrahidrofolatın metilkobalamin tarafından metillenmesiyle oluşan ve yaşamsal önemi olan folat kofaktörlerine dönüşmeyen metiltetrahidrofolat formu ise hücre içinde birikir. Bu olaya “*metilfolat tuzagi*” adı verilir [20,37] (Sekil 2). Bunun sonucu folat kofaktörleri siklusu ve ona kenetli DNA sentezine yönelik reaksiyonlar yavaşlar veya durur. Bu durum kemik iliğindeki megaloblastik değişikliğin temelini teşkil eder. Eritrosit prekürsörü ana hücrelerde çekirdeklerin bölünmesi yavaşlarsa da sitoplazmanın olgunlaşma hızı bozulmaz. Sonuçta anormal yapılı büyük hücreler oluşur ve normoblastların yerini alır (megaloblastik eritropoez). Bu arada bazı hücreler parçalanır ve ölür (inefektif eritropoez) [20,37]. B₁₂ Vitamin eksikliği sonucunda metil TH₄ – metilen TH₄ dönüşümü olmaması sonucu dUMP nin dTMP ye dönüşümü gerçekleşmemektedir. Bu da folat eksikliğinde olduğu gibi DNA içinde urasil birikimine ve yanlış yapılanmaya neden olmaktadır [38]. Bunun sonucunda kromozom hasarı oluşmaktadır. Oluşan kromozom hasarının homosistein yüksekliği ile bağıntılı olduğu gösterilmiştir [39,40]. Her iki vitamin eksikliğinde ise sinerjik olarak hasar artmaktadır [41].

2.2.3. B₁₂ Vitamininin Biyokimyasal Özellikleri

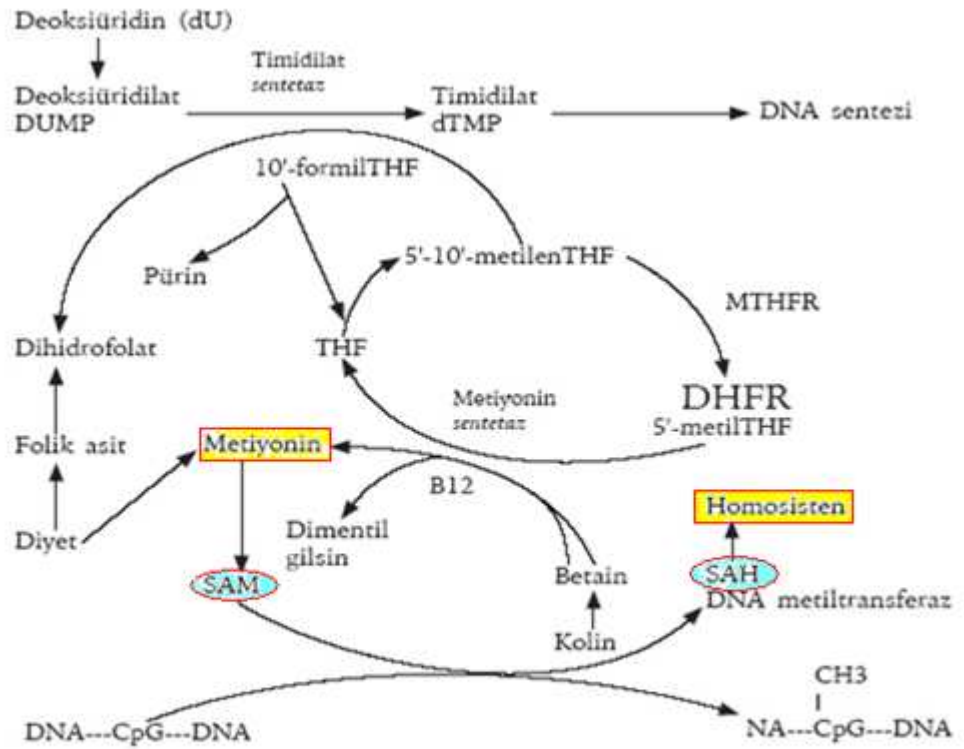
Koenzim olarak fonksiyon gösteren kobalamin bileşiklerinin hücre içinde sentezi için birkaç enzimatik reaksiyon gereklidir [42]. Plazmadaki kobalamin bileşiklerinde kobalt atomu +3 değerlik durumunda ve stabildir. Kobalaminler aktif koenzim haline gelmeden önce labil olan +2 veya +1 değerlik durumuna indirgenmelidir. Bu intraselüler değişimin konjenital defektleri homosisteinüri ve metilmalonik asidüri ye yol açar [43]. (şekil 4)

İnsanda B₁₂ vitamini iki önemli metabolik reaksiyonda koenzim olarak kullanılır.

I. Reaksiyon: “*Metionin sentaz*” enzimi aracılığıyla homosisteinden metionin aminoasiti sentez edilir. Sitoplazmada gerçekleşen bu reaksiyon için koenzim olarak MeCbl gereklidir. Bu reaksiyonda aynı zamanda folat koenzimi 5- metiltetrahidrofolat da gereklidir (Sekil 5). Bu reaksiyon insanlarda metioninin tekrar sentezi için ana yoldur.

Hem folat hem de kobalamin eksikliğinde bu reaksiyon kesintiye uğradığından megaloblastik anemi ile sonuçlanabilecek ciddi bozukluklar ortaya çıkar [1,43,24].

Plazmadaki metionin membran transport sistemi aracılığıyla hücre içine ve serebrospinal sıvıya geçer. Hücresel metionin “*Metionin ATP-L-metionin S adenosiltransferaz*” enzimi aracılığıyla adenosinlenir ve S-adenozilmetionin (SAM) meydana gelir [4]. S-adenozilmetionin, Bir çok reaksiyonda metil grup vericisidir. Fosfatidilkolin, myelin, melatonin, katekolaminler, DNA ve RNA sentezinde fonksiyon görür. Metil grubu bırakıldıktan sonra S-adenozilhomosistein (SAH) oluşur [1]. Sadenozilhomosistein, “*S-adenozilhomosistein hidrolaz*” enzimi tarafından homosistein ve adenosine hidrolize edilir. Daha sonra homosistein; metionin sentaz enzimi tarafından tekrar metionine dönüştürülebilir (remetilasyon). Metionin sentaz enzim aktivitesi için bir koenzim olarak enzime bağlanan MeCbl gereklidir [1] (şekil 3).



Şekil 3. B12 Vitaminine Bağlı Metiyonin Sentaz Enzimiyle Metiyonin ve TH4-Folat Oluşumu. (THF: Tetrahydro folat, SAM: S-Adenosil Metyonin, SAH: S-Adenosil Hidroksil, DHFR: Dihidro folat redüktaz, DNA: Deoksi ribonükleik asit)

II. Reaksiyon: Propiyonat katabolizmasında bir basamaktır. Burada metilmalonil CoA'nın süksinil CoA'ya dönüşümü gerçekleşir. Bu reaksiyonu “*metilmalonil CoA mutaz*” enzimi katalize eder ve sadece 5-deoksi AdoCbl koenzim olarak gereklidir. Bu reaksiyon mitokondride gerçekleşir [45,46]. Kobalamin eksikliğine bağlı bu yolun hasarlanması ile plazmada ve idrarda metilmalonik asit (MMA) seviyeleri artar. MMA artışı B₁₂ eksikliği için hassas ve özgül bir belirleyicidir [47,48] (Sekil 3 ve 5).

Kobalamin bağımlı her iki reaksiyon iki tane toksik materyalin plazma seviyelerini düşürür [4,18]. Bunlar:

1. Homosistein
2. Metilmalonil CoA dır.

2.2.4. Homosistein ve Metabolizması.

Homosistein, metiyonin metabolizması sırasında oluşan ve sülfür içeren bir aminoasittir [49]. Metiyonin yeni sentezlenen proteinlerin yapısına katıldığı gibi ATP yardımı ile enzimatik olarak bir sülfonium bileşiği olan S-adenozil metiyonin'e de dönüşebilir (SAM) [50,51]. SAM'ın metil grubu “*DNA metiltransferaz*” aracılığıyla koparılarak, S-adenozil homosisteine dönüşür. Bunun adenozil kısmının hidrolitik olarak parçalanmasıyla da homosistein oluşur [51,52] (Sekil 5).

Vücuttaki homosistein transsülfürasyon veya yeniden metilasyon (remetilasyon) yollarından birini kullanarak metabolize olur [53,54,55] (Sekil 5). Transsülfürasyon yolunda B6 vitamin bağımlı bir enzim olan “*sistatyonin-sentetaz*” (CBS) enzimi görev yapar [50,53,56]. Remetilasyon yolunda homosisteinden metiyoninin yeniden sentezi (remetilasyon) iki farklı yolla gerçekleşir [1,57,58].

Hiperhomosisteinemi sonucunda birçok patolojik durumun olduğu gösterilmiştir. Bunlardan bazıları apopitos artışı, serebrovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar, arteriol damarlarda intima kalınlaşması, aterotrombotik ve endotel fonksiyon bozuklukları ve oksidatif hasardır [50,53,59,60]. Bir çalışmada artan homosistein konsantrasyonunun

psikoz, ataksi, nöropati ve demanslı hastalarda güç farkedilen B₁₂ vitamin eksikliğinin önemli bir göstergesi olduğu ileri sürülmüştür [61].

2.2.5. Metil Malonik Asid;

MMA, propiyonik asitten suksinik asit oluşumunda bir ara metabolittir [62,63]. Serum, plasma ve idrardaki MMA deriveleri D-metilmalonil CoA'nın hidrolizi sonucu oluşur ve ölçülebilir. İdrar MMA seviyelerinin > 0,4 µmol/L (3,2 mmol/mol kreatinin) olması erken B₁₂ vitamin eksikliği için belirleyicidir [62,63,64,65]. Serum MMA seviyeleri böbrek yetmezliği, tiroit hastalıkları, kısa bağırsak sendromu ve hemokonsantrasyon durumlarında yalancı yüksek değerler verebileceğinden daha az değerlidir. O nedenle idrar MMA bakılması daha doğru sonuç verecektir [63,66,67]. MMA B₁₂ eksikliğinin teşhisinde belirleyici olmakla beraber klinik sorunların etyopatogenezindeki önemi belirsizdir. [47,48,68].

Erişkinlerde yapılan bir çalışmada B₁₂ vitamin eksikliği ve buna bağlı MMA yüksekliğinin, diğer biyomarkırlara göre düşümsel ve kognitif bozukluklara daha çok yol açtığı ileri sürülmüştür [69,70]. Çocukluk yaş grubunda sınırlı sayıda çalışma olmakla beraber yenidoğanlarda yapılan bir araştırmada apne periyotları esnasında MMA seviyeleri yüksek bulunmuş, bu durum doku hipoksisi ve solunumsal asidoz zemininde MMA-CoA katabolizmasındaki inhibisyona bağlanmıştır [63,71]. MMA seviyeleri kobalamin tedavisinden birkaç gün veya hafta sonra normal sınırlara döner [1].

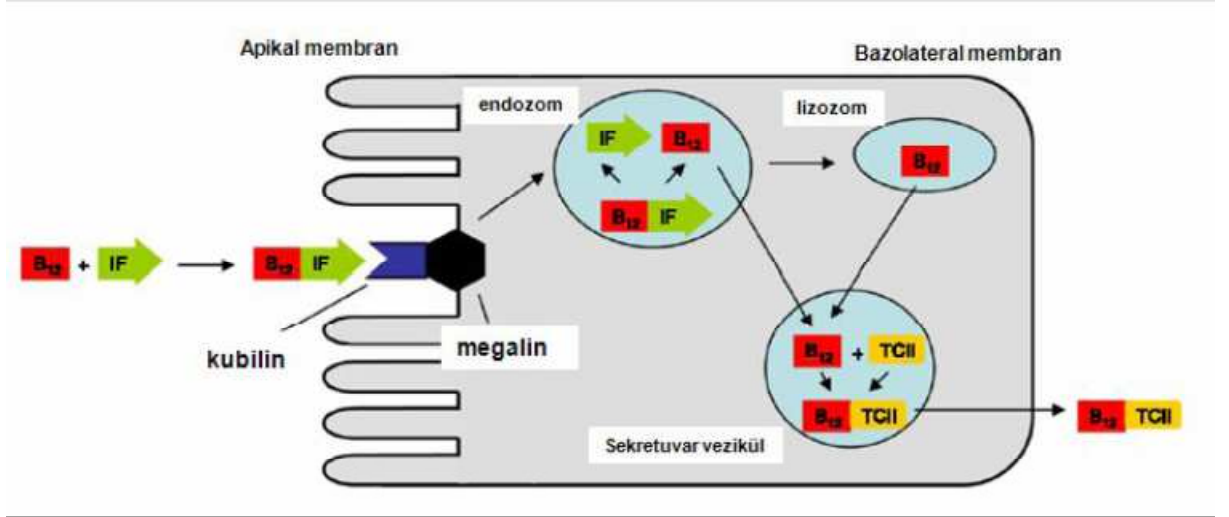
2.2.6. B₁₂ Vitaminin Emilimi, Taşınması ve Metabolizması

İnsan ince bağırsağında bakteriler tarafından bir miktar B₁₂ vitamini sentez edilir ve emilebilir. Ancak sentez edilen ve emilen miktar çok az ve yetersizdir. Kolonda bulunan bakteriler tarafından da sentez edilirse de burada üretilen B₁₂ vitamini hem emilim alanının distalinde gerçekleşmesi açısından hem de yetersiz miktarlarda sentezlenmesi nedeniyle vücudun ihtiyaç duyduğu miktarları karşılayamaz [28,32]. Bu nedenle insanlar vitamin B₁₂ prekürsörlerini gıdalarla almak zorundadırlar [29,32].

Normal bir diyet günde ortalama 5-15 µg kadar B₁₂ vitamini içermektedir. İnsanlarda ortalama olarak depo edilen B₁₂ vitamini miktarı yaklaşık 2 mg kadar olup bunun önemli kısmı karaciğerde depo edilmektedir, 1 mg kadarına yakını da kas, kemik, böbrek, kalp, beyin ve dalak gibi organlarda depo edilir [23,28]. Günlük kayıp ise depo edilen miktarın %0.1'i kadardır [32].

B₁₂ Vitaminin emiliminde aktif ve pasif olmak üzere iki mekanizma vardır. İnce bağırsaklara fizyolojik miktardan fazla (>500 µg/gün) vitamin B₁₂ ulaştığında direkt olarak jejunum ve ileumdan pasif emilim gerçekleşir. Oral alımın yaklaşık %1 kadarı bu yolla gerçekleşmektedir [23,34]. B₁₂ vitaminin majör emilim yolu olan aktif mekanizma ise, hayvansal gıdalarda bulunan B₁₂ vitaminin proteinlere bağlı olarak mideye alınması ile başlar. Midedeki hidroklorik asit ve bir proteolitik enzim olan pepsin ile proteine bağlı olan B₁₂ vitamini, protein kısmından ayrılarak midede serbest hale geçer [23,26,30]. Serbest haldeki B₁₂ vitaminin büyük bir kısmı, tükürük ve midenin parietal hücrelerinden salgılanan kobalofiline (R-proteinlerine) bağlanır ve geriye kalan az miktar ise IF'e bağlanır [28]. R proteini, glikoprotein yapısındadır. R proteini kendisine bağlı olan B₁₂ vitamininin intestinal bakteriler tarafından kullanımını engelleyerek aynı zamanda immün sistem savunmasında da rol oynarlar. Duedonumda, R proteinine bağlı diyet kaynaklı kobalamine, safradan salınan kobalamin-R protein kompleksi de katılır [72]. Kobalamin pankreatik proteazların yardımıyla intestinal lümende serbest hale gelir. Serbest haldeki kobalamin, pankreatik sıvıda bulunan bikarbonatın pH değerini değiştirmesinin de etkisiyle IF'e bağlanır [23,28]. Duedanal pH'da IF, R proteininden daha yüksek bir affinite ile B₁₂ vitaminini bağlar. Bu yüzden pankreasın bikarbonat salgılanmasını etkileyen durumlar, B₁₂ vitamin eksikliğinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır [28].

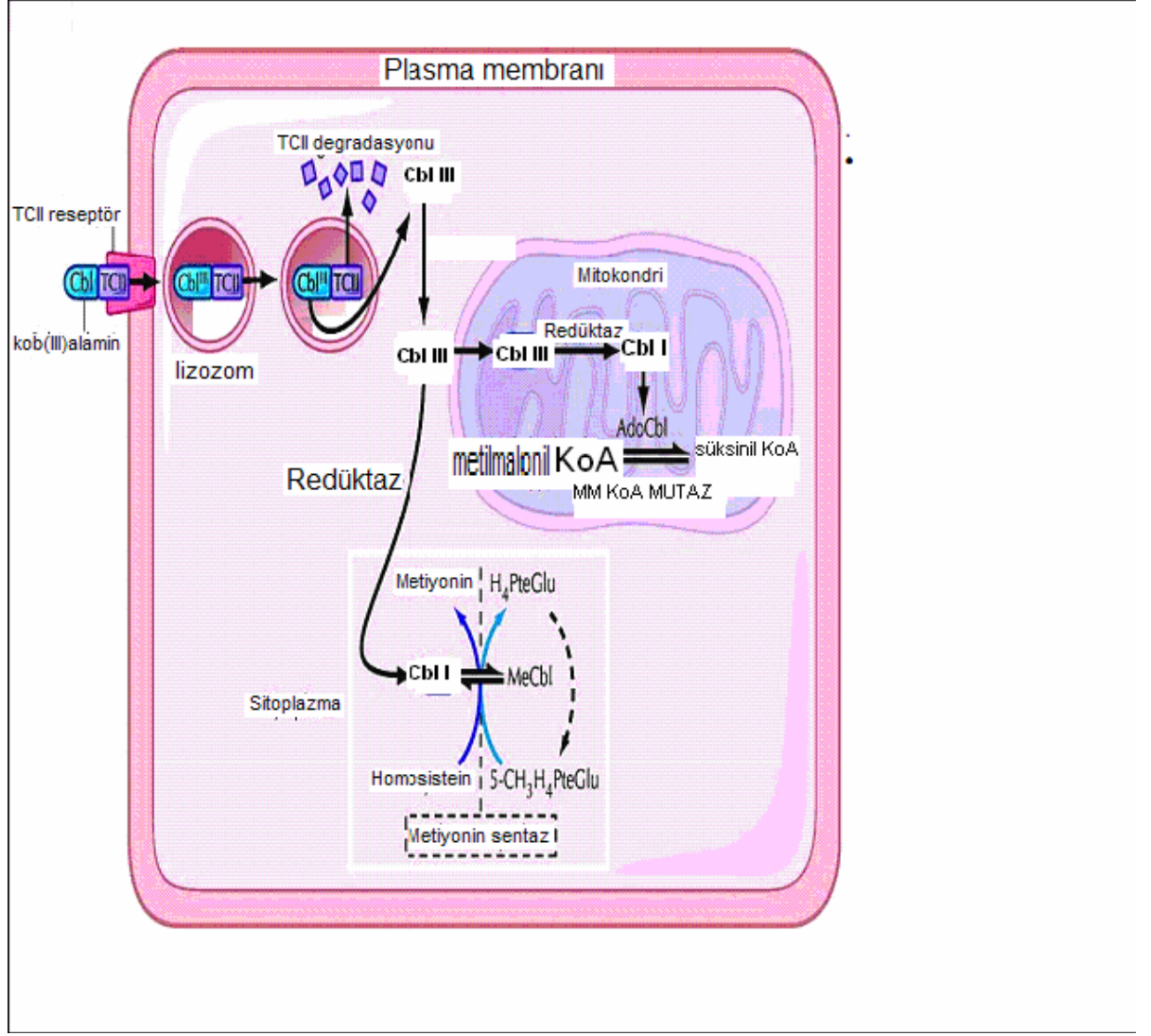
B₁₂ Vitamini - IF kompleksi proteolitik sindirime dirençlidir. B₁₂ Vitamini - IF kompleksi ileumun distal 80 cm'lik kısmına kadar parçalanmadan gelir. Distal ileuma geldiğinde ise B₁₂ vitamini mukoza epitel hücrelerinin yüzeyinde bulunan kubilin adı verilen spesifik reseptörüne bağlanır [72,73].(şekil 4)



Şekil 4. B₁₂ Vitaminin ince barsaktan emilim mekanizması

IF: İntrensik faktör, TC-II: Transkobalamin II.

IF-vitamin B₁₂ kompleksinin kubilin reseptörüne bağlanabilmesi için Ca²⁺ iyonu ve pH'nın 5.5-7.5 arasında olması gerekmektedir [28,73,74,75,76]. B₁₂ vitamini, IF - B₁₂ vitamin kompleksinden reseptozom adı verilen asidik veziküllerde ayrılarak TC-II'ye bağlanır. TCII - B₁₂ vitamini kompleksi dolaşıma salınır (şekil 3). Reseptör aracılığıyla gerçekleşen endositoz, TCII-vitamin B₁₂ kompleksi özellikle karaciğer, kemik iliği ve diğer dokuların plazma membranında bulunan TC-II reseptörleri tarafından hücre içine alınır [72]. Hücre içine alınan TCII - B₁₂ vitamin kompleksi lizozomlarda parçalanarak kobalamin serbest hale gelir [30,31] (şekil 5).



Şekil 5. TCII-Vitamin B12 kompleksinin lizozomlara alınması.

Cbl: Kobalamin, TC-II: Transkobalamin II, AdoCbl: Adenozilkobalamin, MeCbl: Metilkobalamin, Metilmalonil KoA: Metilmalonil koenzim A, Süksinil KoA: Süksinil koenzim A, MM-KoA mutaz: Metilmalonil koenzim A mutaz, H4PteGlu: Tetrahidrofolat, 5-CH3H4PteGlu: 5-metil tetrahidrofolat.

B₁₂ Vitamini enterohepatik dolaşımı IF'e bağlıdır. IF yokluğunda B₁₂ vitaminin tamamı feçesle atılır. Pernisiyoz anemili kişilerde B₁₂ vitamini eksikliğinin gelişimi hızlıdır (1-3 yıl). Fekal vitamin B₁₂'nin kaynağı; gıda ve safradan absorbe edilmemiş vitamin B₁₂, dökülmüş hücreler, gastrik ve intestinal sekresyonlar ve intestinal bakteriler tarafından sentezlenen B₁₂ vitaminidir [27]. Farmakolojik yüksek doz alınmadığı süreçte idrarla atılımı çok düşüktür. İnsanda böbrek ve safra ile kayıp total vücut deposunun % 0.1-0.2'dir. Bu miktar günlük diyet ile karşılanmaktadır [27].

2.2.7. Kobalamin Bağlayıcı Proteinler

1. İntrinsik Faktör: İntrinsik faktör (IF) insan mide fundus mukozasının pariyetal hücrelerinde sentez edilen, ısıya dayanaksız ve alkali ortamda stabil olan bir glikoproteindir. IF'in her 1 mg'ı yaklaşık 30 µg kobalamin bağlar. Cbl-IF kompleksi ince bağırsak lümeninde emilir [1,43].

2. Transkobalamin-II: İnce bağırsak hücrelerinden veya depolardan B12 vitamini alıp, kullanan dokulara taşımada hizmet eder [43]. B12 vitamini aktivitesi olmayan korrin analogları için afinitesi çok düşüktür. Plazmada TCII'ye hem MeCbl hem de AdCbl bağlanırken, TCI'e sadece MeCbl bağlanır [1,77,78].

3. Haptocorrinler: TCO, TCI, TCIII, R-bağlayıcı protein ve kobalofilin olarak da adlandırılırlar. Haptocorrinler, farklı derecelerde glikozile olmuş, benzer yapıları glikoproteinlerdir [1,43,79]. Plazmada kobalaminlerin %70-90'ı haptocorrinlere bağlanır. Haptocorrinler kobalamin bağlayıcı proteinlerin tamamı arasında kobalamine en büyük afinitiyi gösterir. [1,40,80].

2.2.8. B₁₂ Vitaminin Besinsel Kaynakları

İnsan ince bağırsağında bakteriler tarafından bir miktar B₁₂ vitamini sentez edilir ve emilebilir ancak İnsanda kalın bağırsakta bakteriler tarafından sentezlenen B₁₂ vitamini emilimi çok az ve yetersizdir. İnsanlar için B₁₂ vitamininin en önemli kaynakları karaciğer, kırmızı et, yumurta, peynir ve süt gibi hayvansal gıdalardır. Gıdalarda B₁₂ vitamini konsantrasyonu en fazla karaciğer ve böbrekte bulunur, her birinin 100 gramı 100 µg B₁₂ vitamini ihtiva eder. Ayrıca deniz ürünlerinde de B₁₂ vitamini bulunmaktadır. Bitkisel besinlerde normal olarak B₁₂ vitamini genellikle bulunmaz. Ancak Baklagil türü bitkilerde kök kısmında simbiyotik olarak yaşayan bazı mikroorganizmalar tarafından B₁₂ vitamini sentez edilir, daha sonra baklagiller tarafından tanelerin içine alınır [19,81,82]. B₁₂ vitamini, nötral ve asidik ortamda ısıya dayanıklıdır ve besinin ısıtılması sonucu fazla kaybolmaz. İlaç olarak kullanılan B₁₂ vitamini "Streptomyces griseus" türü mantar kültürlerinden izolasyon yoluyla elde edilir [1,82,83].

Anne serumu ile anne sütündeki B₁₂ vitamini düzeyleri arasında güçlü bir korelasyon vardır. Anne sütünde ortalama 0.2–1.0 µg/l B₁₂ vitamini bulunur. MeCbl anne sütünde en fazla bulunan temel kobalamindir. İnek sütünde en çok AdoCbl bulunur [84,85]. İnsan için gerekli olan B₁₂ vitamininin hepsi hayvansal gıdalardan sağlandığından, diyetle yetersiz B₁₂ vitamini alımı kobalamin eksikliğinin önemli bir sebebidir. [1,86].

2.2.9. B₁₂ Vitamini Gereksinimi

B₁₂ vitamini için alınması gereken günlük miktarlar yaş gruplarına göre değişmektedir Tablo 1. [87].

Tablo I. B₁₂ vitamini için önerilen günlük ihtiyaç miktarları

Yaş grupları	Yaş	(mcg/gün)
Bebek	0 – 6 ay	0,4
	7 – 12 ay	0,5
Çocuk	1 – 3 yaş	0,9
	4 – 8 yaş	1,2
	9 – 13 yaş	1,8
Adolesan	14 – 18 yaş	2,4
Yetişkin	19 – 50 yaş	2,4
	> 50 yaş	2,4
Hamilelerde	Tüm yaşlar	2,6
Emzirenlerde	Tüm yaşlar	2,8

Komplike pernisiyöz anemisi olmayan hastalara, B₁₂ vitamininin 0,1 µg/gün kadar çok az miktarı bile parenteral verildiğinde minimal hematopoetik cevap oluşacaktır. Bu miktar eksikliğin bütün bulgu ve semptomlarını önler ve normal sınırlar içinde B₁₂ vitamini serum seviyelerinin devamını sağlar. Enteral tedavide 0,1µg'ın emilimini garanti altına almak için daha fazla B₁₂ vitamini alımı gereklidir [88].

2.2.11. Yenidoğanda ve Süt Çocuklarında B₁₂ Vitamini Eksikliği

Yetişkinlerde normalde 2-3 mg B₁₂ vitamini deposu vardır. Normal B₁₂ vitamini deposuna sahip annenin yenidoğan bebeği yaklaşık 25 µg B₁₂ vitamini deposuna sahipken, B₁₂ vitamin eksikliği mevcut anneden doğan bebegın B₁₂ vitamini deposu yaklaşık 3-5 µg'dır. Kolostrum ve/veya yaşamın ilk hafta sütü daha sonraki sütlerden çok daha fazla miktarda B₁₂ vitamini ihtiva eder. Anne sütündeki B₁₂ vitamini miktarı, annedeki serum B₁₂ vitamini ile doğru orantılıdır. Doğumda yenidoğan bebeğın B₁₂ vitamini depoları eksik olsa da, yaşamın en az birkaç haftası için yeterlidir [89,90]. Yeterli B₁₂ vitamini deposu ile doğan sağlıklı süt çocuklarında serum B₁₂ vitamini seviyeleri 4- 6. aya doğru azalır ve ek gıda almaya başladıktan sonra serum B₁₂ vitamini seviyeleri tekrar artar. Fakat ek gıda alımı gecikirse veya başlanmaz ise 6. aydan sonra B₁₂ vitamini eksikliğının oluşma riski artar [7]. Beyin gelişiminin ve myelinizasyonunun en hızlı olduğu dönem doğumdan önceki son üç ay ve doğumdan sonraki ilk 3-6 aydır. Eğer annede B₁₂ vitamini yetersiz ise bebekte B₁₂ vitamini eksikliği daha erken gelişir. Kobalamin eksikliği olan anne bebeğının son trimesterdeki miyelinizasyonu yavaş olacağından doğumda serebral atrofi veya hipoplazi olabilir. Doğumu takip eden ilk bir yıl miyelinizasyon oldukça hızlıdır. B₁₂ vitamini deposu eksik olarak doğanlarda bu miyelinizasyon yavaşlamaktadır [6,7]. B₁₂ vitamini eksikliği erken dönemde teşhis edilip, tedavi edilmez ise süt çocuklarında kalıcı nörolojik hasara neden olabilir [91,92].

B₁₂ vitamini deposu yetersiz olan çocukların doğumu takip eden ilk 1 aydaki gelişimleri normaldir. Bulguların %70'i 3-6 ay arasında ortaya çıkar. En sık semptomu letarji ve hipotonidir. Bazen koma tablosu görülebilir. Tedaviyi takip eden ilk 3-4 ayda nörolojik bulgular düzelebilir, devam edebilir veya önceki nörolojik bulgular kötüleşebilir. Hastalarda beyin atrofisi veya hipoplazisi görülebilir. Vakaların bir çoğunda miyelinizasyon tedaviden 12-13 ay sonra tamamlanmaktadır, fakat kranial magnetik rezonans görüntüleme (MRI) ile demiyelinizasyon bulgularının 3 yıla kadar devam edebildiği gösterilmiştir. Erken tanı ve tedavi önemlidir [6,93]. Kemik iliğında belirgin megaloblastik değişiklikler görülmeyebilir. [1].

2.2.10. B₁₂ Vitamini Eksikliği Nedenleri

B₁₂ vitamini eksikliği sebepleri üç ana başlık altında incelenebilir (Tablo II) [1,7,19].

Tablo II. Çocukluk çağında B₁₂ vitamini eksikliği sebepleri

A. Yetersiz B₁₂ vitamini alımı

Yeterli hayvansal gıda almama, vejeteryan beslenme alışkanlıkları

B₁₂ vitamini içeriği düşük gıdaların seçilmesi

Özel diyet mamalarıyla beslenme (fenilketonüri gibi)

Gebelik ve süt verme dönemlerinde annelerdeki eksiklik

B. Emilim defektleri

İntrensek Faktör yokluğu veya anormalliği

Midenin cerrahi olarak çıkarılması

Pernisivöz anemi

Konienital İF yokluğu veya anormalliği

Otoimmün poliglanduler sendrom tip I

B₁₂ vitamininin besinlerden salınımında yetersizlik

Mide asit salgısı eksikliği: Asit salgısını engelleyen ilaçların kullanımı.

Pankreas yetersizliği: Pankreatik proteazların eksikliklerinde B₁₂ vitamininin ince bağırsakta haptokorrinlerden serbestleşmesi gerçekleşemez.

Bağırsak parazitleri (*Difilobotrium latum*, *Giardia intestinalis*, *Himenolepis nana*): konakla yarışma veya inflamasyonla eksikliğe yol açarlar

İnce bağırsaklarda bakteriyel aşırı çoğalma: konakla yarışma yoluyla eksikliğe yol açarlar

B₁₂ vitamini emilimini azaltan ilaçların alınması (Metformin, simetidin, kolestiremin, kolşisin)

Bağırsak mukozası bozuklukları (Chron hastalığı, gluten enteropatisi, tropikal sprue)

İleumun bir parçasının cerrahi olarak çıkarılması

İmerslund-Grasbeck sendromu

C. B₁₂ vitamini taşınma ve metabolizmasında doğuştan bozukluklar

Taşınma defektleri:

Transkobalamin II eksikliği.

Haptokorrinlerin eksikliği.

Hücrel kobalamin kullanım defektleri:

Adenosil kobalamin sentezindeki bozukluklar (CblA ve CblB hastalığı).

Metilkobalamin sentezindeki bozukluklar (CblE ve CblG hastalığı).

Her iki kofaktörün sentezinde bozukluklar (CblC, CblD ve CblF hastalığı).

2.2.12. B₁₂ Vitamini Eksikliğinin Bulguları

Çocuklarda B₁₂ vitamini eksikliği halsizlik, yorgunluk, stomatit, gelişme geriliği veya irritabilite gibi spesifik olmayan klinik bulgular ile ortaya çıkar. En fazla etkilenen dokular, hızlı proliferen olan hematolojik ve intestinal sistemlerdir. Ayrıca nörolojik semptomlar da sık görülür [1].

Hematolojik bulgular: Genellikle nötropeni ve trombositopeninin eslik ettiği siddetli makrositik anemi oluşur. Ortalama eritrosit hacmi (OEH = MCV) ve ortalama eritrosit hemoglobini (MCH) artmıştır, periferik yaymada hipersegmente nötrofiller ve oval makrositler mevcut olup, kemik iliği hiperselülerdir. Aneminin başlangıcı gizli ve yavaştır. Çoğunlukla halsizlik, zayıflama ve istahsızlık dışında asemptomatikdirler. Anemiye bağlı kalp yetmezliği ortaya çıkabilir [1,44].

Gastrointestinal bulgular: Bazı hastalarda anemi ve nörolojik semptomlar oldukça hafiftir ve ana semptomlar gastrointestinal bulgulardır. Bu semptomlar istahsızlık (%14-65), hafif kilo kaybı (%5-10), bulantı, kabızlık, periyodik ishal (%7-50), glossit ve pamukçukdan oluşur. Değişik yayınlarda pernisiyöz anemili hastaların yaklaşık %50'sinde kırmızı, ağrılı anormal dil olduğu ve anemi olmasa da bu semptomların oluşabildiği bildirilmiştir [1,4,94].

Nörolojik bulgular: Sinir sistemi tutulumu derecesi ile aneminin şiddeti arasında bir ilişki yoktur. Anemi olmadan kobalamin eksikliği tespit edilen hastaların %25'inden daha fazlasında nörolojik bulgular saptanmıştır [94]. Nörolojik semptom ve bulguların ana nedeni sinir hücrelerindeki ilerleyici demiyelinizasyondur [19].

Yetişkinlerde görülen kobalamin eksikliğinin nörolojik sendromu, spinal kordun subakut kombine dejenerasyonu (SCDSC) olarak bilinir. Bu sendrom, spinal kordun posterior ve lateral kolonlarının dejenerasyonu ve alt ekstremitelerde üst ekstremitelerden daha siddetli olan periferik sinir hasarı ile oluşur. Demiyelinizasyon aksonal dejenerasyona sekonder olabilir. Azalmış vibrasyon ve pozisyon duyusu genellikle SCDSC'nin ilk objektif bulgusudur. Daha sonra, piramidal yol bulguları gözlemlenir. Aynı zamanda serebral semptomlar ve optik sinir dejenerasyonu oluşur [1].

Süt çocuklarında diffüz serebral atrofi görülebilir. Beyinde miyelinizasyonun en hızlı olduğu dönem son trimester ve yaşamın ilk bir yılıdır. Bu dönem aynı zamanda beyin volüm ve ağırlığının hızlı artma zamanıdır. İnfantil B₁₂ vitamini eksikliği, glial hücrelerin çoğalmasında azalma ve olağan olmayan uzun zincirli yağ asitlerinin artmasına bağlı olarak miyelin sentez ve bütünlüğünün bozulması ile sonuçlanır. Sonuçta süt çocuklarında B₁₂ vitamini eksikliğinin sinir sistemindeki patolojik değişkenleri olan demiyelinizasyon, aksonal dejenerasyon ve nöronal ölüm sırasıyla gerçekleşerek sinir fonksiyonlarının bozulmasına yol açar. Bu durum letarjiye, kooperasyon bozukluğuna, anormal visüel evoket potensiyel (VEP), vibrasyon ve pozisyon duyu bozukluğuna, mental ve motor gelişme geriliğine, bas tutma, gülümseme, konuşma, oturma ve yürüme gibi kazanılmış mental ve motor fonksiyonların kaybına, konvülsiyona ve ileri dönemde komaya neden olur [95,96,97]. Hastaların çoğunda serum kobalamin düzeyi düşüktür. Buna rağmen anemisi olmayan ve temel nörolojik bulguları olan hastalar normal sınırlarda serum kobalamin seviyesine sahip olabilirler. Bu nedenle nörolojik problemleri olan hastalarda kobalamin eksikliğinin tanısı sadece serum kobalamin seviyesi ile değil aynı zamanda dokudaki kobalamin seviyesini yansıtan ve daha spesifik olan serum homosistein ve metilmalonik asit düzeylerine bakılarak konulmalıdır [1]. Eğer B₁₂ vitamini eksikliği tedavi edilmez ise nörolojik hastalık ilerleyicidir ve kliniğinin şiddeti semptomların süresi ile doğrudan ilişkilidir [94]. Metionin yetersizliği sonucu nörolojik semptomların oluştuğu düşünülmektedir. Metionin desteği yapılıncaya hastaların bir kısmında nörolojik bulguların düzeldiği görülmüştür [1].

2.2.13. B₁₂ Vitamini Eksikliğinde Nöron Gelişimini Etkileyen Mekanizmalar

B₁₂ vitamini eksikliğine bağlı nörolojik hasar dört ana teoriyle açıklanmıştır. Bunlar;

1- Gecikmiş miyelinizasyon veya dismiyelinizasyon

Uzun süreli B₁₂ vitamini eksikliğinin beyin ve spinal kordda yetersiz miyelinizasyona veya dismiyelinizasyona neden olduğu kanıtlanmıştır [98,99,100]. Miyelin sinir hücrelerini çevreler, korur ve sinir iletimini kolaylaştırır. Bu nedenle miyelin bütünlüğünün bozulması nöral fonksiyonu bozar ayrıca miyelin kılıfta başlayan hasarı aksonal dejenerasyon takip eder [100,101].

Adenozilkobalamin ve metil kobalamin şeklindeki B₁₂ vitamini miyelin formasyonu etkileyen iki enzimatik reaksiyonda kofaktördür. Adenozilkobalamin; metilmalonil CoA'nın süksinil CoA'ya dönüşümde gereklidir. Yetersiz dönüşümde tek zincirli yağ asid sentezi için gerekli olan Propiyonil CoA (üç karbonlu molekül) ve metilmalonil CoA'nın (üç karbonlu molekül) birikmesi ile sonuçlanır. Metilmalonil CoA yağ asidi sentezinde malonil CoA'nın kompetitif inhibitörüdür. Yağ asitleri normal olarak numaralanmış karbon molekülüne ikişer karbon eklenerek meydana gelir. Yağ asidi sentezinde malonil CoA yerine metilmalonil CoA geçtiğinde yani üç karbonlu moleküllerin eklenmesiyle olağan olmayan 15 veya 17 karbonlu aşırı miktarda anormal dallı zincirli yağ asitleri sentezlenir ve bu anormal yağ asitleri sinir hücrelerinin zarında yapısal değişikliklere neden olur [97,100].

Metilkobalamin, homosisteinin metyonine dönüşümünde metyonin sentaz enziminin kofaktürüdür. Metyonin daha sonra SAM'a dönüşür. SAM, fosfatidiletanolaminin fosfatidilkoline dönüşümünde metil donörü olarak gereklidir. Bu lipitler santral sinir sistemindeki lipitlerin sırasıyla % 14 ve %11'ini oluşturmaktadır. Fosfatidilkolinin hücre membranlarının mikroviskositesini artırarak sinir iletimini geliştirdiğine inanılır [100,102]. Fosfatidiletanolamin fosfatidil koline yetersiz dönüşümünde miyelinizasyon zarar görür ve demiyelinizasyona neden olabilir. Horstman ve arkadaşları yetersiz alıma bağlı B₁₂ eksikliği olan 6 aylık infantta Proton magnetic resonance spectroscopy kullanılarak kolin içeren bileşenlerin intraserebral düzeylerinin düştüğünü göstermişlerdir [100,103,104,105].

2- Bozulmuş olan S- adenozilaminin (SAM) S- adenozilhomosisteine (SAH) oranı

B₁₂ vitamini eksikliğinin sinirsel gelişimde olumsuz etkilerini açıklayan diğer bir mekanizma SAM / SAH oranındaki değişimdir. Metilkobalamin, homosisteinin metyonine dönüşümünde metyonin sentaz enziminin kofaktürüdür. Bu reaksiyonda S-metiltetrahidrofolat homosisteine bir metil grubu transfer eder. Metyonin SAM' e dönüşür, bu da bir metil grubunu vererek SAH'e dönüşür. SAH hidrolize olduğunda homosistein yeniden oluşur. B₁₂ vitamini eksikliğinde folat tetrahidrofolat olarak tuzakta kalır. SAH ve homosistein düzeyi yükselirken SAM düzeyi düşer.

SAM/ SAH oranındaki azalma protein lipid ve nörotransmitterlerin sentezi için gerekli olan metilasyon reaksiyonlarını bozar [100,106,107]. Ayrıca homosistein yüksekliği muhtemelen N- asetil D-aspartat reseptörlerinin aşırı uyarılmasının nörolojik etkisi sonucu nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilidir. SAM/SAH oranındaki azalma ayrıca DNA sentezinin ve hücre bölünmesinin azalması anlamına gelir [100,108].

3-TNF- α ve Epidermal Growth Faktör(EGF) dengesizliği

B₁₂ Vitamini eksikliğinin patofizyolojisinde yeni bir teori scalabrino tarafından ileri sürülmüştür [109]. Santral sinir sistemin'in glial hücreleri çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinleri sentezler. TNF- α gibi bazı sitokinler demiyelinizasyon ile karakterize bazı SSS hastalıklarında nörotoksin olarak davranırlar. EGF gibi bazıları da nörotroftiktir. B₁₂ vitamini eksikliği olan yetişkin hastalarda B₁₂ tedavisi ile düzelen TNF- α 'nın yüksek serum konsantrasyonları ve EGF'nin düşük konsantrasyonlarından oluşan düzensizlik vardır [100,110]. Aynı sitokin düzensizliğe subakut kombine dejenerasyon (SCD) olan yetişkin hastaların BOS'larında da rastlanmıştır [111]. B₁₂ eksikliğinde metiyonin sentaz aktivitesinin bozulmasına bağlı olarak SAM'ın kullanılabilirliğinin azalması SSS'de TNF- α sentezini artırabilir [112]. Bu lipopolisakarit ile stimüle edilen ratlarda SAM'nın TNF- α düzeyini düşürdüğü ve TNF- α gen ekspresyonunu makrofajlarda azalması sonucuna dayandırılmıştır [113]. B₁₂ vitamin eksikliği ile oluşan nörolojik düzensizliklere nedensel olarak bağlantı kurulamamıştır, ancak artmış TNF- α ve azalmış EGF B₁₂'nin eksikliğinin hematolojik ve nörolojik bulguları ile ilişkisi olduğu için bebeklerde beyin gelişimini etkileyen nöral bütünlüğünün kaybına katkıda bulunabilir [100].

4- Laktat birikimi

Alım yetersizliğine bağlı B₁₂ vitamini eksiliği olan 6 aylık infantın sunulduğu bir olguda proton MRS'de beyin gri ve beyaz maddesini gösteren beyin hücrelerinin oksidatif enerji metabolizmasının bozulmasını yansıtan laktat birikimi gösterilmiştir. Mekanizması anlaşılamamıştır ancak bu glikoliz artışına bağlı olabileceği ileri sürülmüştür. B₁₂ vitamini tedavisi sonrası B₁₂ vitamin eksikliğinin klinik belirtilerinde serebral aerobik enerji metabolizmasının düzeltilmesi sonucu ile hızlı düzelme görülür [100,105].

2.2.14. B₁₂ Vitamini Eksikliği Anemisinde Laboratuvar / Tanı

Tam kan sayımı: Genellikle makrositik anemiye nötropeni ve trombositopeni eşlik eder. MCV ve MCH artmıştır. B₁₂ vitamini eksikliği ile birlikte demir eksikliği anemisi, kronik inflamatuvar hastalık anemisi veya talasemi hastalığı mevcut ise MCV'deki artma maskelenebilir [19,43].

Periferik yayma ve kemik iliği: Anizositoz, poikilositoz ve fragmantasyonlu oval makrositik eritrositler ve hipersegmente nötrofiller görülür. Kemik iliği hiperselülerdir ve genellikle her üç seri elemanlarında megaloblastik değişiklikler görülür [81].

Biyokimyasal bulgular: B₁₂ vitamini normal serum düzeyi aralığı genellikle 200-900 pg/ml'dir [19,81]. İnefektif eritropoezin yansıması olarak artmış transferin saturasyonu, laktat dehidrogenaz, bilirubin ve demir seviyeleri tespit edilir. Hücre içine alımı ve kullanımı bozulduğundan serum folik asit ve ferritin düzeyleri yüksekliği bulunabilir [43].

Homosistein ve MMA düzeyleri;

Hastaların bir kısmında (%5) anemi ve serum kobalamin seviyesinde düşüklük olmadan fonksiyonel kobalamin eksikliği gelişebilir. Kobalamin yetersizliğinin tanısı fonksiyonel kobalamin yetersizliğinin kanıtı olan artmış serum MMA ve total homosistein seviyeleri ile doğrulanabilir. B₁₂ vitamini emilimi olmayan hastalarda total serum kobalamin düzeyinin azalmasından önce kobalamin bağlayan TCII seviyelerinde azalma görülür. Azalmış TCII-Cbl kompleksi B₁₂ vitamininin emilim yetersizliğinin bir isareti olabilir [1].

Schilling Testi: B₁₂ vitamini emilim testleri arasında en standardize olanıdır. B₁₂ vitamininin emilim defektini tespit etmede kullanılır. Radyoaktif işaretli B₁₂ vitamininin 24 saatlik idrardaki miktar ölçümüne dayanır. İşaretli B₁₂ vitamini ile intrinsik faktörün beraber verilmesi sonucundaki idrar B₁₂ vitamini değerlendirmesi ile intrinsik faktöre bağlı defektler de gösterilebilir [1,19].

Gıda Schilling Testi: Atrofik gastritli veya gastrik peptik aktivitesi yetersiz hastalarda kullanılmaktadır [1].

2.2.15. B₁₂ Vitamini Eksikliğinin Tedavisi

Şiddetli anemisi olan çocuklarda kalp yetmezliği bulunabileceğinden, hasta öncelikle stabilize edilmelidir. Gerekirse, oksijen ve diüretik verilebilir. Tedaviye genellikle 72 saat içinde hematolojik cevap alındığından, eritrosit transfüzyonu (5-10 mL/kg, yavaş şekilde) sadece anemi çok ağır olduğunda, ya da çocuk ağır hasta olduğunda kullanılır. Hızlı ve fazla miktarda transfüzyon kardiyak yetersizliğe sebep olabilir veya mevcut yetmezliği kötülestirebilir. [1,19,94]. Transfüzyonu takiben birkaç saat içinde kemik iliginde, eritroid seride hiperplazi azalacağından ve hücre morfolojisi deđiŖeceđinden megaloblastik aneminin mevcudiyetini göstermek için kemik ilgi incelemesi erken dönemde yapılmalıdır. Serum kobalamin değerinde transfüzyona bağlı önemli bir değisiklik olmasa da transfüzyon islemi yapılmadan önce bazal tetkikler için kan alınmalıdır. Acil şartlarda yüksek dozda B₁₂ vitamini verilmesi gereksiz olup bazen yaŖamı tehdit eden yan etkilere yol açabilir Siyanokobalamin 10 µg/gün dozunda iki gün verilmesi artmış serum LDH ve demir seviyelerinin normale dönmesi ve tedavinin baŖlangıcından 5-7 gün sonra retikülosit sayısını maksimum seviyeye ulaŖtırmak için yeterlidir [1,6]. Çocuklarda B₁₂ vitamini eksikliğinin tedavi Ŗekli çok iyi belirlenmemiŖtir. Klinikimizde uygulanan tedavi Ŗekli; ilk iki - üç gün, 10 µg/gün CNCbl, SC veya İM önerilir. Sonra 1-2 gün 100 µg/gün verilir, ardından 1000 µg/gün dozunda 2-7 gün ara ile en az 5 doz daha verilerek kobalamin depoları doldurulur. Hafif vakalarda 100 µg/gün dozunda baŖlanabilir. Eğer nörolojik bozukluklar varsa en az iki hafta süreyle günde 1 mg parenteral verilmesi önerilir. Kobalamin eksikliği kanıtlanmış ve B₁₂ vitamini emilimi olmayan hastalarda ise, eksikliğin tekrarlanmaması için CNCbl'nın ömür boyu aylık 100-1000 µg'lık enjeksiyon şeklinde uygulanması gereklidir. Benzer şekilde depoların korunması ve dolması OHCbl'nin her üç ayda bir 1000 µg veya her 6-12 ayda bir 1-2 hafta süresince 1000 µg/gün subkutan enjeksiyonu ile de sağlanabilir. OHCbl verilen hastaların az bir kısmında TCII-Cbl kompleksine karşı antikor gelir bu durum tedaviye toleransın gelişmesine yol açar [1,94]. Konjenital kobalamin metabolizması defekti olan çocuklarda OHCbl haftada 2-3 kez 1000 µg enjeksiyon şeklinde kullanılmalıdır. Bu gibi vakalarda tedavinin etkinliği total homosistein, MMA, metioninin ve belki ilave metabolitlerinin serum seviyelerinin ölçülmesi ile izlenebilir [1].

Ağır anemisi olan hastalarda yüksek doz kobalamin kullanımı sonucu büyük olasılıkla siddetli hipokalemi olur. Potasyumun ekstraselüler kompartmandan intraselüler kompartmana geçisi ve renal potasyumun korunmasında (tutulmasında) gecikme ile birlikte, intraselüler potasyum birikmesiyle hipokalemi gelir. Kobalamin baslangıta 10 µg/gün 2-3 gün SC verilirse dahi hipokalemi olasılığına karsı dikkatli olunmalı ve potasyum desteği sağlanmalıdır [1,19,43]. B₁₂ vitamini eksikliğinde prognoz eksikliğin siddetine ve süresine bağlıdır. Bu nedenle olabildiğince erken tanı konulup tedaviye başlanmalıdır [1,19,92,94,114].

3. S100 PROTEİNİ

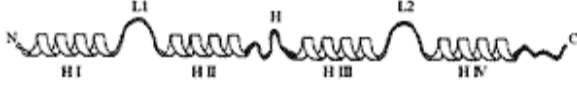
3.1. S100 Proteinlerinin Tarihçesi

Beyine özgü proteinler olup ilk olarak 1965 yılında Moore ve McGregor tarafından tanımlanmıştır [115]. Araştırmacılar sığır, fare, tavşan ve maymunların beyin ve karaciğer dokularında yaptıkları protein saflaştırma çalışmaları sırasında iki proteinin beyin fraksiyonlarında yüksek konsantrasyonda olduğunu ancak karaciğer fraksiyonlarında bulunmadığını saptamışlardır. Kromatografik ve elektroforetik ayrılma özelliklerine göre bu proteinleri 14-3-2 ve 14-3-3 olarak adlandırmışlar. Bundan 13 yıl sonra bu faktörün S100 α ve S100 β olarak adlandırılan aslında iki farklı protein olduğu bulunmuştur. 1995’de S100 proteinlerinin kromozomsal lokalizasyonu belirlendikten sonra isimlendirme S100 α - S100A1 olarak S100 β - S100B olarak, değiştirilmiştir [116]. Sonraki yıllarda deneysel araştırmalar S100B’nin özel fonksiyonları üzerine yoğunlaşırken, klinik ortamlarda da S100B daha sıklıkla ölçülür hale gelmiştir.

3.2. S100 Proteinlerinin Yapısı ve Biyokimyasal Özellikleri

S100 protein ailesi küçük (9-13 kDa) ve asidik proteinlerden oluşur. S100 proteini omurgalılarda kalsiyum bağlayıcı proteinler ailesinin en geniş alt grubunu oluşturur [117]. Şimdiye kadar saptanan 25 üyesi vardır: S100A1-A18, profilagrin, trikohiyalin, repetin, S100P, S100Z, S100B ve S100G’dir. Bunlar (S100G hariç) homodimerik yapı oluştururlar ve dimerizasyon biyolojik aktiviteleri için önemlidir.

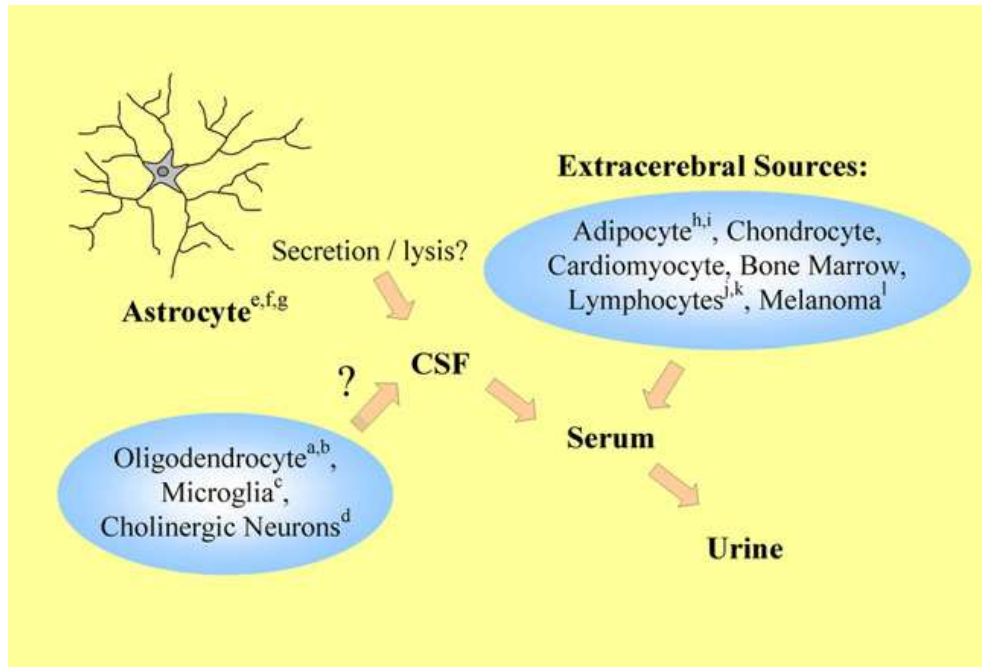
Bu protein ailesi, Amonyum Sülfatta %100 çözünmeleri sebebiyle S-100 olarak adlandırılmıştır. Yapılan analizler sonucu S100B ve S100A1’in EF- el tipi olan kalsiyum bağlayıcı proteinler olduğu gösterilmiştir [118]. S100B’nin belirlenebilir bir karbonhidrat, yağ, nükleik asit yada fosfat içeriği yoktur. Aminoasit dizilimi açısından oldukça korunmuş bir yapısı vardır [119]. S100 proteinleri hücrelerde dimerler şeklinde bulunurlar. İki kalsiyum bağlama bölgelerine sahiptirler (şekil 6). Kalsiyum bu bölgelere farklı afinitelerle bağlanır. Karboksil ucundaki bölgenin kalsiyuma afinitesi diğerinden 100 kat daha yüksektir [120]. Aynı zamanda 4 bölgesinde bakır, 6 ya da 8 bölgesinde de çinko bağlayarak Ca⁺² bağlama kapasitesi değişebilmektedir [121,122,123,124].



Sekil 6. S100 Proteinlerinin sekonder yapısı. Kalsiyum bağlama bölgeleri (L1-L2) ve tersiyer yapıda katlanacak olan heliksler

3.3. S100B

S100B 10.5 kDa ağırlığında bir S100 proteini üyesi olup EF- el tipi kalsiyum bağlayıcı proteinler olduğu gösterilmiştir. Hücre içi proteindir. S100B 21. Kromozomun 22,3 lokusu üzerinden kodlanır (Bu yüzden Down Sendromunda S100B ekspresyonu artar) [125]. Alfa-beta ile beta-beta heterodimerleri S100B proteini olarak tanımlanır ve sinir dokusu için (alfa-beta izoformu gliyal hücrelerde, beta-beta izoformu beyin astrosit ve Schwann hücrelerinde yer alır) yüksek oranda özgüdür. S-100 proteinleri Schwann hücreleri, melanositler, gliyal hücreler, kondrositler, adipositler, myoepitelyal hücreler, makrofajlar, Langerhans hücreleri, dendritik hücreler ve keratinositlerde bulunur. Ancak en çok beyinde astrositlerden eksprese edilir (şekil 7) [126].

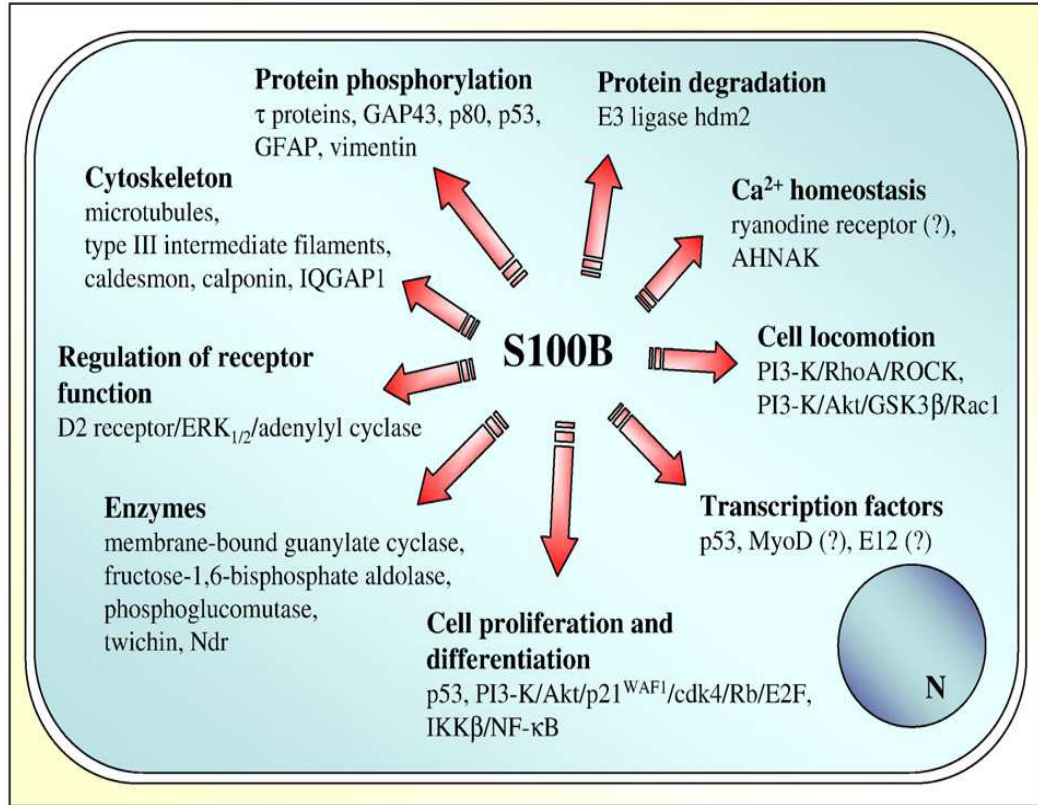


Şekil 7* . Serebral ve ekstraserebral S100B salınımı ve üriner atılımı.

CSF: Serebro spinal sıvı

*: Biochimica et Biophysica Acta dergisinden alınmıştır. 2009;1793:1008-22

S100B hücre içinde (intraselüller) kinazların aktivasyonunu engelleyerek protein fosforilasyonunu inhibe ederler; enzimlerin aktivasyonu veya inhibisyonunda rol alırlar; ara filamentler (IF), miyozin ve tropomiyozin ile etkileşerek hücre iskelet oluşumunda önemlidirler; ayrıca hücre büyümesi ve farklılaşması, hücre döngüsü, transkripsiyon, sinyal iletimi ve kalsiyum homeostazının düzenlenmesinde görev yaparlar (şekil 8) [126].



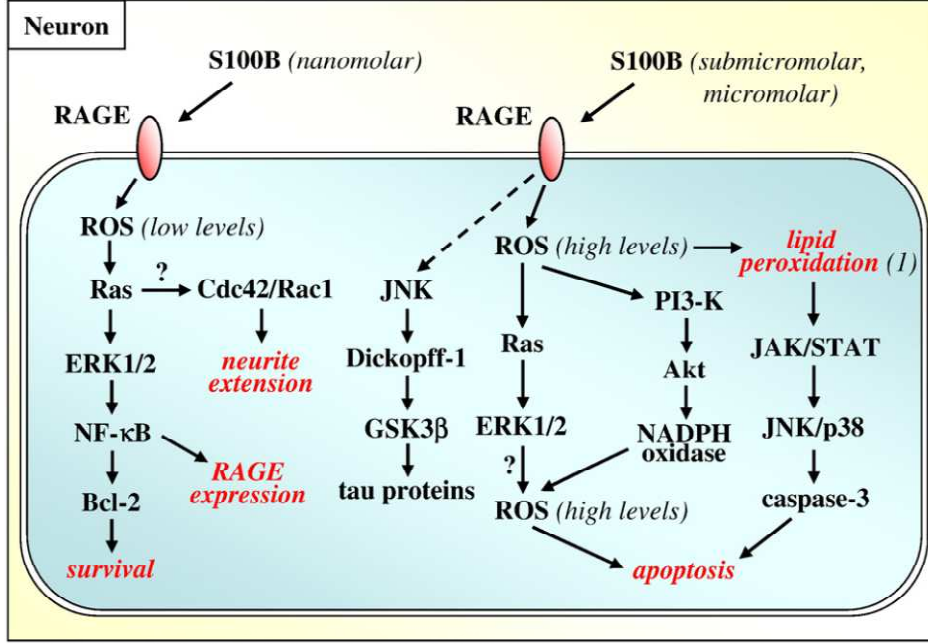
Şekil 8*. S100B proteinin ekstraselüller alanda etkileri.

GFAP: ileri glikolizasyon ürünleri reseptörü

*: Biochimica et Biophysica Acta dergisinden alınmıştır. 2009;1793:1008-22

S100B Hücreler arası (ekstraselüller) alanda nöronlar, astrositler, mikroglialar, inflamasyon hücreleri, epitel ve endotel hücreleri üzerinde konsantrasyona bağlı olarak tropik ya da toksik etkileri vardır. Hücreler arası alanda düşük (nanomolar) konsantrasyonlarda S100B, nöron büyümesi ve astrosit proliferasyonunu uyarır (şekil 9). Ancak yüksek (mikromolar) konsantrasyonlarda, invitro şartlarda nörotoksik etkisi mevcuttur [127,128]. S100B'nin mikromolar konsantrasyonları glikolizasyon ürünleri reseptörü (RAGE) ile etkileşime girerek reaktif oksijen radikallerinin artmasına yol açar

bu da sitokrom-C salınımını gerçekleştirip caspas kaskatını aktifleyerek apoptotik nöronal ölümü gerçekleştirir [126,129]. Bir başka literatür bilgisinde S100B'nin, L tipi kalsiyum kanallarının geçirgenliğini artırarak [128] ve bir dizi apoptoz genini (c-fos, c-jun, bax, bcl-x, p15 ve p25) up-regüle ederek apoptozu indüklediği belirtilmektedir [126,130]. (şekil 9).



Şekil 9*. S100B'nin ekstraselüller alandaki konsantrasyonuna bağlı olarak nöronlardaki etki mekanizmasının şematik görünümü.

RAGE: ileri glikolizasyon ürünleri reseptörü

*: Biochimica et Biophysica Acta dergisinden alınmıştır. 2009;1793:1008-22

S100B'nin yüksek (mikromolar) konsantrasyonları mikroglia hücre kültürlerinde NO sekresyonu stimülasyonunda lipit A ve İnterferon-gama ile beraber çalışır. Bu da bize, s100B'nin nörodejenerasyon ve inflamatuvar beyin hastalıklarındaki nöropatolojik değişikliklerle ilişkili olduğunu gösterir [131].

S100B glial hücreler ve glial hücrelerle nöronlar arasındaki etkileşimi düzenleyen sitokin benzeri aktiviteler gösteren sekretuar bir proteindir. Bu etkileri için RAGE gerekliliği bilinmektedir. Astrositlerden S100B salınımı (serum, oksijen ve glikoz yokluğu) metabolik stres altında olur [132,133].

S100B, öğrenme ve hafızanın modülasyonunda görev alır [134,135]. Ayrıca transgenik farelerde yapılan çalışmalarda hipokampus dentritlerinde S100B'nin yüksek dansitede olduğu ve özellikle ilk bir yıllık dönemde, nörofibriller ağların oluşması için gerekli olduğu bildirilmiştir [136]. GAP-43 (nöromodulin) ve S100B proteini, nöronal gelişim açısından ve plastisite açısından önemlidir [137].

3.3.1.S100B Proteininin Klinik Kullanımı ile İlgili Çalışmalar

S-100B proteini bir Ca^{++} - bağımlı protein olup nörotrofik (nöron besleyici) ve nöroprotektif (nöron koruyucu) özelliğe sahip olup yapımı iskemide artar [15,138].

S100B protein yüksekliği öncelikle travmatik beyin hasarında serum ve beyin omurilik sıvısında yüksek olarak bulunmuştur. Daha sonra serebral iskemide kolay ölçülebilen ve prognozu öngörebilen bir belirteç olarak düşünülerek çalışılmaya başlanılmıştır. Beyin omurilik sıvısında S100B seviyelerinin, serebrovasküler olay ya da enfarktın klinik derecesi ve büyüklüğü ile bağıntılı olarak arttığı gösterilmiştir [139,140,141].

Akut iskemik inme sonrası S100B artışı, olaydan sonra 2-3 gün içerisinde en yüksek seviyeye ulaşır. Kardiyak arrest sonrası gelişen hipoksik beyin hasarında S100B'nin, 2-24 saat içerisinde en yüksek seviyeye ulaştığı rapor edilmiştir. Hemorajik serebrovasküler olayların iskemik inmelere göre daha yüksek S100B düzeylerine yol açtığı düşünülmektedir [139].

Birçok araştırmacı S100B konsantrasyonu ile enfarkt hacmi ve klinik bulgular arasında bir bağlantı olduğunu ortaya koymuştur. Kardiyak arestten sonra meydana gelen hipokside de komanın klinik derecesi ile S100B konsantrasyonları arasında bir ilişki mevcuttur [138].

Özellikle de kalp cerrahları, S100B'yi kardiyopulmoner bypass ve ekstrakorporal sirkülasyon sırasında oluşan serebral iskemik hasarı saptayabilen biyolojik bir marker olarak kabul etmektedirler. S100B düzeylerinin dolaşımsal arrest veya bypass zamanı süresiyle bağlantılı olduğu rapor edilmiştir. Buna ek olarak, nörolojik komplikasyonların sayısı ve S100B arasında da bir bağlantı vardır. Kardiyak cerrahide tespit edilen S100B kaynağının beyinden mi yoksa vücudun başka bir yerinden mi kaynaklandığına dair

süregelen bir tartışma vardır. Kasların ve diğer yumuşak dokuların S100B monomerleri içerdiği onaylandığına göre açıkça görülüyor ki; kardiyak cerrahide, toraks boşluğuna sızan kan dolaşıma geri dönmesi için genellikle kardiyotomi aspiratörleri tarafından toplandığından, mediastinum ve kalp kası S100B kaynakları olarak değerlendirilmelidir. Bu durum herhangi bir beyin hasarı görülmezsizin S100B konsantrasyonunu arttırabilir. S100B ve nöropsikolojik problemler arasında da korelasyon bulunmuştur. Alzheimer hastalığı, Down sendromu, Amyotrofik Lateral Skleroz, Multipl Skleroz, Şizofreni ve depresyonda, kan ve BOS S100B seviyelerinin artışı gözlenmiştir [115,138,142,143].

Beyine özgü proteinlerden özellikle S100B ölçümü beyin hasar indeksini göstermede önemlidir. Henüz klinik muayene ve kraniyal USG ile bulguların saptanamadığı dönemde S100B serumda yükselir; erken tanı belirteci olarak anlamlıdır. Gazaalo ve arkadaşları ventrikül içi kanaması (IVH) olan prematür bebeklerde veya hipoksik-iskemik ensefalopati (HIE) matür bebeklerde serum S100B'nin klinik ve USG bulgularından 48-72 saat önce arttığını tespit etmişlerdir [144]. Hipoksik iskemik ensefalopati veya doğum asfiksisine maruz kalan term bebeklerde kord kanında yüksek S100B düzeyleri saptanmıştır. Doğum sonrası ikinci saatte HIE için S100B düzeyinin pozitif prediktif değeri (7 µg/L cut-off için) %71, negatif prediktif değeri %90, duyarlılığı %71 ve özgüllüğü %90 bulunmuştur [145]. Kord kanı S100B konsantrasyonları anormal serebral hemodinamik yapı ve hemorajinin yaygınlığı ile orantılıdır [144,146]. Şiddetli asfiksili bebeklerde ve kanama sonrası ventrikül dilatasyonu oluşan bebeklerde BOS S100B konsantrasyonları beyin lezyonunun genişliği ile uyumludur [147]. İntrauterin gelişme geriliği (IUGR) gibi yüksek riskli gebeliklerde kord kanında saptanan yüksek S100B düzeyleri fetoplental perfüzyon yetersizliğine bağlı beyin hasarını gösterir [148,149]. Amniyon sıvısındaki S100B düzeyleri sağlıklı gebeliklerde gestasyonel yaş ile uyumludur, ancak trizomi 21 gebeliklerinde sağlıklı gebeliklere göre 1.5 kat daha yüksek olduğu saptanmıştır [150,151]. Bu nedenle S100B yüksek konsantrasyonları trizomi 21 erken tanısında kullanılabilir [152]. İdrarlarında yüksek S100B konsantrasyonu saptanan prematür bebeklerde daha sonra serebral kanama ve beyin hasarı geliştiği gözlenmiştir [153]. Ventrikül içi kanaması olan bebeklerde idrar S100B düzeyleri ilerleyici artış gösterir ve doğumdan sonra 72. saatte pik yapar. Doğum sonrası ikinci saatte idrar S100B konsantrasyonunun (0.7 µg/L cut-off için) pozitif prediktif değeri %80, negatif prediktif değeri %100, duyarlılığı %80 ve özgüllüğü %100 bulunmuştur [149].

4. MATERYAL ve METOD

4.1. ÇALIŞMA GRUBU

Bu çalışmaya kasım 2010 ile kasım 2011 tarihleri arasında Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı poliklinik ve servisinde B₁₂ vitamini eksikliği tanısı konulup hastaneye yatırılarak yada ayaktan tedavi edilen 48 çocuk hasta alındı (I. Grup). Şanlıurfa Harran Kapı Sağlık Ocağı, Üniversite polikliniği ile Şanlıurfa Çocuk Hastanesi polikliniğine aşı veya sağlıklı çocuk muayenesi için getirilen, hastalıklarla ilgili yakınması olmayan, B₁₂ vitamini eksikliği olmayan ve ailelerinden gerekli yazılı izin alınan, yaşları 1-24 ay arasında olan 47 çocuk sağlıklı kontrol grubunu (II. Grup) oluşturdu.

Çalışma için Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurulunun 27.07.2010 tarihli 3 nolu oturum 11 sayılı kararı ile onay alındı. Hasta yakınlarına B₁₂ vitamin eksikliği ile ilgili ve çalışmanın içeriği hakkında bilgi verildi. Çalışmaya alınan her çocuk için yasal velilerinden “bilgilendirilmiş olur formu” alındı. Serum B₁₂ vitamin seviyesinin 200 pg/ml’nin altında olması eksiklik olarak kabul edildi ancak 160pg/ml’nin altında olanlar çalışmaya dahil edildi.

Araştırma için özel hazırlanmış formlara, çocukların ayrıntılı anamnezleri (gelişikayetleri, tanı konulmuş bir hastalığı ya da sürekli kullandığı bir ilaç olup olmadığı, özellikle çocuğun ve annenin beslenme şekli vb.) sorgulanıp kaydedildi. Ayrıntılı fizik muayeneleri yapıp özellikle B₁₂ vitamin eksikliğinin klinik bulguları olabilecek büyüme ve gelişme değerlendirilmesi, PEM varlığı, seyrek ve cılız saç tipi, atrofik glossid, periferik hiperpigmentasyon, organomegali varlığı değerlendirilip kaydedildi. Hastaların ilave hastalık ve bulguları da kaydedilip gerekli tedavi ve yönlendirmelerde bulunuldu ve takip edildi.

B₁₂ vitamini eksikliği olan hastalara B₁₂ vitamini türevi siyanokobalamin (Dodex ampul) ilk 3 gün 10 mcg/gün, takip eden 2 gün 100 mcg/gün ve tedavinin 5. Gününden itibaren gün aşırı 5 doz 1000 mcg/gün intramusküler yapıldı. Kobalamin tedavisi başlanan hastalara, tedavinin 7. günü serum elektrolit düzeyi, B₁₂ vitamini düzeyi, tam kan sayımı ve retikülosit düzeyi çalışıldı. Bu hastalar 3 ay sonra kontrole çağrılıp tam kan sayımı, serum B₁₂ vitamin düzeyi ve retikülosit düzeyi testleri tekrarlandı.

Çalışmaya alınan çocukların gelişme durumları Olcay Neyzi ve arkadaşlarının geliştirdikleri ağırlık, boy ve baş çevresi pörsentil çizelgeleri kullanılarak değerlendirildi [154]. Neyzi ve arkadaşlarının belirttikleri zaman diliminde baş boyun kontrolü, kendini çevirme, desteksiz oturma, yürümenin olmaması ve anne ile bilinçli ilişki kurmama gibi nöro motor gelişimi geriliği gösteren bulgular veya daha önce kazanılmış becerilerin kaybı durumunda nörolojik olarak etkilenmiş olarak kabul edildi [154].

Konjenital anomalisi olanlar, anamnezinde doğum eylemi ve sonrası dönemde asfiksi öyküsü, konvulzyonu olanlar, daha önce merkezi sinir sistemi enfeksiyonu geçirenler, metabolik hastalığı olanlar, dejeneratif ve demiyelinizan hastalık tanısı alanlar çalışmaya alınmadı. Kontrollere gelmeyen hastalar çalışma grubundan çıkarıldı.

4.2. ARAÇ, GEREÇLER ve KİMYASALLAR

- Biyokimya Otoanalizörü (Abbott Architect c4000, USA)
- Roche marka Elecsys E170 otoanalizörü
- Otomatik kan sayım cihazı (celldyn 3700)
- Derin Dondurucu (Uğur, Türkiye)
- Buzdolabı (Profilo, Germany)
- Spektrofotometre (Jasco V-530, Japan)
- Santrifüj (Hettich, Universal 30 RF, Germany)
- Otomatik multipipetler (Gilson, Germany)
- Hassas Terazı (Sartorius, Germany)
- Vorteks (Nüve, NM 110 model, Türkiye)
- Mekanik homojenizatör (CAT, Germany)
- Benmari (NÜVE, Türkiye)

4.3. YÖNTEMLER

Çalışmaya alınan çocuklardan EDTA'lı ve jelli biyokimya tüplerine venöz kan örnekleri alındı. Tedavi öncesi; EDTA'lı kan örneklerinde Harran Üniversitesi Araştırma Hastanesi Biyokimya laboratuvarındaki otomatik kan sayım cihazı (celldyn 3700) ile tam kan sayımı ve retikülosit tayini yapıldı. Biyokimya tüplerine alınan serum örneklerinde; B12 vitamini ve ferritin tayini rutin biyokimya kitiyle elektrokemiluminisans "ECLIA" yöntemiyle (Roche marka Elecsys E170 otoanalizöründe yine Roche marka Vitamin B12 ticari kitler kullanılarak) ölçüldü. Sonuçlar pg/ml olarak ifade edilmiştir.

Değerlendirme sonrası kalan serumlar epan dof tüplere konulup serum S100B çalışılmak üzere -80 °C'de saklandı. Serum S100B ölçümü BioVendor marka (Cat. No.: RD192090100R) ELISA kitleri ile ölçülmüştür. Tedavi sonrası; 7. Gün ile 90' nıncı gün aynı işlemler tekrar edildi. Sonuçlar pg/ml olarak ifade edilmiştir.

5. İSTATİSTİK

Çalışma grubu ile kontrol grubunun sonuçlarının gruplar arası karşılaştırması bağımsız gruplar için t testi (Independent Samples Testi) ile, korelasyon analizleri ise Pearson korelasyon testi ile değerlendirildi. I. grubun tedavi öncesi, tedaviden 7 gün ve 3 ay sonraki değerlerinin karşılaştırması ise çift örnekli grup için t testi (Paired Samples Testi) ile yapıldı. Grup içi karşılaştırma ise McNemar testi ile yapıldı. Hastaların nörolojik olarak etkilenenler ile etkilenemeyenler arasındaki karşılaştırma hasta sayıları dengeli olmadığı için nonparametrik Mann-Whitney U testi ile analiz yapıldı. Hesaplamalar SPSS 17.0 Windows İstatistik programı kullanılarak bilgisayar ortamında yapıldı.

6. BULGULAR

Çalışmaya 27'si erkek, 21'i kız toplam 48 hasta alındı. Erkek/Kız oranı 1,28:1 olarak bulundu. Kontrol grubu 28'i erkek, 19'u kız olmak üzere toplam 47 sağlıklı bireyden oluştu. Erkek/kız oranı 1,47:1 di. Hasta ve kontrol grubu arasında cinsiyet dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p = 0,836$) (Tablo III).

Hasta grubunda yaş ortalaması ay olarak 11,3, kontrol grubunda yaş ortalaması 10,9 olarak bulundu. Yaş ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,692$) (Tablo III).

Tablo III. Hasta ve kontrol grubundaki yaş ortalaması ve cinsiyet oranları

		GRUP		P değeri
		Hasta n: 48	Kontrol n: 47	
Cinsiyet	Erkek	27	28	= 0.836
	Kız	21	19	
Yaş ortalaması (ay)		11.3	10.9	= 0.692

Hastaların tedavi öncesi ortalama B₁₂ vitamini, Hgb ve S100B düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük saptandı. (P değerleri sırasıyla; $p < 0.001$, $p < 0.001$ ve $p < 0.001$). Kontrol grubuna göre ilk MCV değeri ise ($p = 0,006$) hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptandı (Tablo IV).

Tablo IV. Grup I ve II'deki çocukların ortalama hematolojik ve Serum S100B parametrelerinin karşılaştırması

	Hasta Grubu ortalama. (n:48)	Kontrol grubu ortalama. (n:47)	P değeri
Yaş (ay)	11.3	10.9	= 0.692
İlk B ₁₂ (pg/ml)	92.1	420.5	< 0.001
İlk S100B (pg/ml)	75.9	119.6	< 0.001
İlk LDH	356.8	332	= 0.248
İlk HGB (gr/dl)	8.7	11.3	< 0.001
İlk MCV (fl)	82.2	75	= 0.004

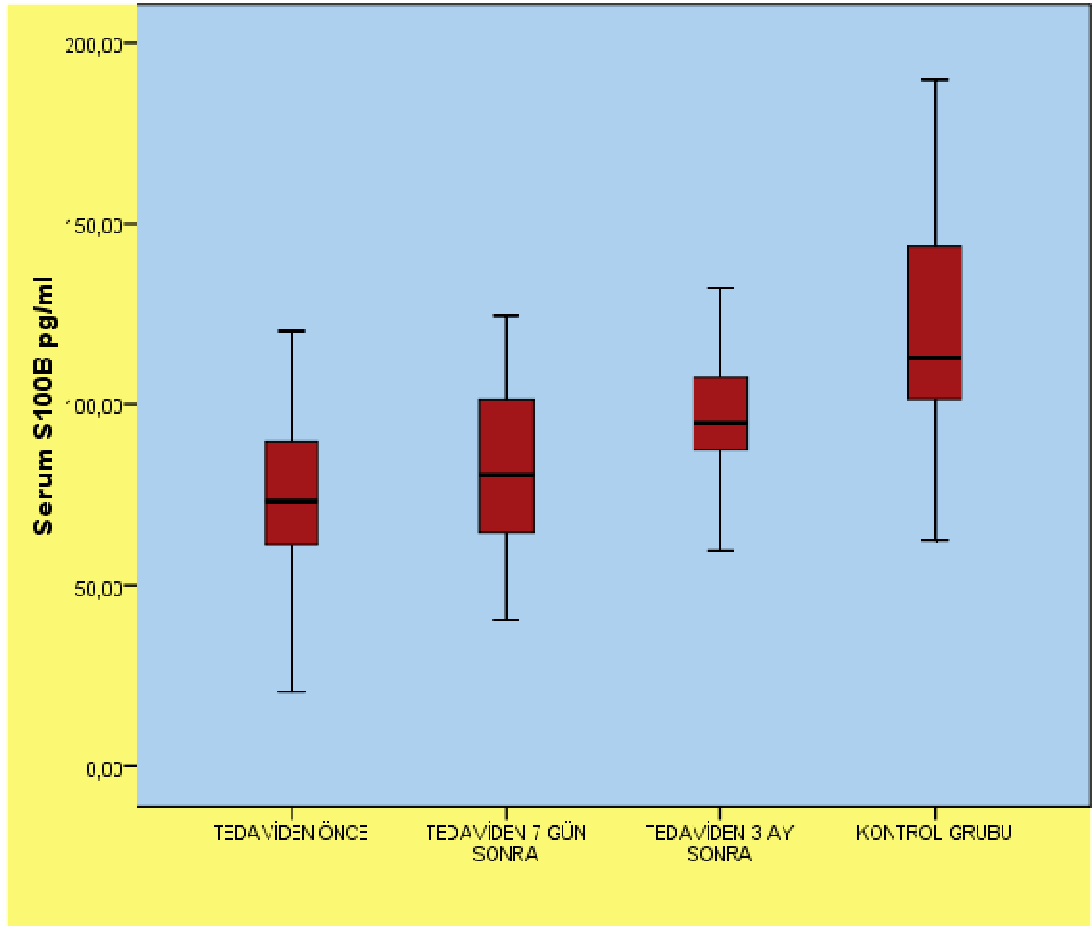
Hasta olgularımızda kobalamin tedavisine başladıktan 7. gün ve 3 ay sonraki bakılan B₁₂ vitamini değerlerinde tedavi öncesi B₁₂ vitamini düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış mevcuttu (P değerleri sırasıyla; p < 0.001, p < 0.001). Aynı zamanda kobalamin tedavisine başladıktan 7. gün ve 3 ay sonraki bakılan serum S100B düzeyleri tedavi öncesi serum S100B düzeyine göre 7. gündeki artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ancak 3. Aydaki serum S100B düzeyi hem tedavi öncesine göre hem de tedavinin 7. gününe göre istatistiksel olarak anlamlı artış vardı. (P değerleri sırasıyla; p = 0.38, p < 0.001, p = 0.002). (tablo V).

Tablo V. Serum S100B düzeyinin ve B₁₂ vitamini düzeyinin tedavi ile değişimleri

	Tedavi öncesi	Tedavinin 7. Günü Ortalama	Tedavinin 3. Ayı ortalama	P değeri
B ₁₂ Vitamini (pg/ml)	92.1	1464.7		< 0.001
	92.1		333.7	< 0.001
		1464.7	333.7	< 0.001
S100B (pg/ml)	75.9	81.8		= 0.38
	75.9		96.6	< 0.001
		81.8	96.6	= 0.002

Her iki grupta B₁₂ vitamini ile hematolojik değerler arasındaki korelasyona bakıldığında ortalama B₁₂ vitamini ile MCV, MCH değerleri arasında negatif bir korelasyon varken, Hgb ile pozitif korelasyon mevcuttu. Tedavi öncesi ortalama B₁₂ vitamini ile tedavi öncesi Hgb değeri ve tedavi öncesi S100B arasında pozitif korelasyon mevcuttu. Diğer parametreler arasında korelasyon bulunmadı.

B₁₂ vitamini eksikliği grubunun ortalama serum S100B düzeyi kontrol grubundaki ortalama serum S100B düzeyinden istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0.001$). Serum S100B düzeyinin tedavi ile değişimi ve kontrol grubu ile karşılaştırılması Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 10: Serum S100B düzeyinin tedavi ile değişimi ve kontrol grubu ile karşılaştırılması

Tedavi öncesi ortalama serum S100B düzeyi: 75.9 pg/ml

Tedaviden 7 gün sonra ortalama serum S100B düzeyi: 81.8 pg/ml

Tedaviden 3 ay sonra ortalama serum S100B düzeyi: 96.6 pg/ml

Kontrol grubu ortalama serum S100B düzeyi: 119.6 pg/ml

Tedavi öncesi hasta grubu ile kontrol grubu arasında gelişme geriliği açısından yapılan değerlendirmeye göre boy, baş çevresi ve ağırlık açısından istatistiksel fark yoktu, hasta grubunda sadece bir hastanın ağırlığı 3 persentilin altındaydı. Hasta grubunda anamnez ve fizik muayene dayalı olarak nöro motor gelişimi geriliği düşünülen 12 hasta nörolojik olarak etkilenmiş olarak kabul edildi (B₁₂ vitamini eksikliği tanısı alan hastaların % 25'i). Nörolojik etkilenmenin Hgb değeri, B₁₂ vitamini düzeyi ve serum S100B düzeyi ile ilişkisine bakıldı. Her üç parametre de nörolojik olarak etkilenmiş grupta nörolojik olarak etkilenmemiş B₁₂ vitamini eksikliği olan hastalara göre daha düşük düzeylerde idi, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi (P değerleri sırasıyla; p = 0.092, p = 0.341 ve p = 0.924)

Tablo VI. Nörolojik olarak etkilenmiş hasta ile nörolojik olarak etkilenmemiş hastaların biyokimyasal parametrelerinin karşılaştırılması

	Hasta sayısı (n)	Hgb ortalama (gr/dl)	B ₁₂ vitamini ortalama (pg/ml)	MCV ortalama (fl)	S100B ortalama (pg/ml)
Nörolojik olarak Etkilenmiş Grup	12	7.7	87.5	85.6	74.6
Nörolojik olarak Etkilenmemiş Grup	36	9.1	96.1	81	76.3
P değeri		= 0.092	= 0.341	= 0.305	= 0.924

B₁₂ vitamini eksikliği grubundaki çocukların MCV ortalamaları kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmakla birlikte, çoğu hastalarının MCV değerleri makrositik düzeyde değildi. Ortalama MCV değeri nöromotor olarak etkilenmiş grupta, nörolojik olarak etkilenmemiş gruba göre daha yüksek ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (tablo VI).

7. TARTIŞMA

Miyelin; santral sinir sisteminde sinir hücrelerini çevreler, korur ve sinir iletimini kolaylaştırır. Bu nedenle miyelin bütünlüğünün bozulması nöral fonksiyonu bozar. Beyinde miyelinizasyonun en hızlı olduğu dönem son trimester ve yaşamın ilk bir yılıdır. Bu dönem aynı zamanda beyin volüm ve ağırlığının en hızlı artma zamanıdır. Uzun süreli B₁₂ vitamini eksikliğinin beyin ve spinal kordda myelinizasyon yavaşlar; demiyelinizasyon, aksonal dejenerasyon ve nöronal ölüm gerçekleşerek sinir fonksiyonlarının bozulmasına yol açar. Beyin atrofi oluşur. Sonuçta mental ve nöromotor gelişme geriliği meydana gelir. [1,114,155-163,164,165].

Schneck ve arkadaşları [114] literatürde B₁₂ vitamini eksikliği tanısıyla farklı zamanlarda yayınlanan toplam 26 vakayı tek seride toplamış ve bu seride 24 (%92.3) vakada fiziksel, mental ve motor gelişme geriliği olduğunu, tedavi sonrası 16 (%66.7) vakada tam düzelme olduğunu, altı vakada (%25) ise fiziksel gelişimleri normal olmasına rağmen, geç tanı konulduğundan dolayı nörolojik düzelmenin tam olmadığını bildirmiştir [159]. Daha önce Demir [6] tarafından yapılan bir çalışmada, B₁₂ vitamini eksikliği nedeniyle hastaneye yatırılarak tedavi edilen ve yaşları 6-24 ay arasında olan 30 hasta çocuğun tamamında AGTETP düşük bulunmuş, B₁₂ vitamini eksikliğinin çocukların mental ve motor gelişiminde geriliğe yol açtığı ve geç tanı konularında tedaviden üç ay sonraki kontrollerde düzelmenin tam olmadığı bildirilmiştir [159]. Demir'in bulduğu sonuç Schneck ve arkadaşlarının yaptıkları yorum ile uyumaktadır. Bizim çalışmamızda 12 vakada (%25) fiziksel, mental ve motor gelişme geriliği olduğunu, tedavi sonrası 3. ayda 5 vakada nörolojik düzelmenin tam olmadığı görüldü. Bu etkilenen vakaların %41.6 kadardı.

Miyelin formasyonu etkileyen enzimatik reaksiyonlarda kofaktör olan B₁₂ vitaminin eksikliğinde Fosfatidil etanolamin'nin fosfatidil koline dönüşümü yetersiz olup miyelinizasyon zarar görür ve demiyelinizasyona neden olabilir [1,155,156]. Horstman ve arkadaşları yetersiz alıma bağlı B₁₂ eksikliği olan 6 aylık infantta kolin içeren bileşenlerin intraserebral düzeylerinin düştüğü göstermişlerdir [5].

Literatürde B₁₂ vitamin eksikliğinin hematolojik ve nörolojik bulgularının olduğu 4 aylık infantın son olduğu bir olgu sunumunda beyinin muhtelif bölgelerinde miyelinizasyon kaybı olduğu gösterilmiştir. B₁₂ tedavisinden 5 ay sonra yapılan kontrolde

progresif miyelinizasyon ve beyin atrofisinde belirgin düzelme saptanmıştır. Başka bir olgu sunumunda ise 8. aydan itibaren gelişimsel gerileme belirtileri gösteren 10 aylık bebekte normal 4 aylık infantların bulgularına benzer oranda gecikmiş miyelinizasyon görülmüştür [155,156,166].

Sonuçta İnfantlarda B₁₂ vitamini eksikliğinin nörolojik bulguları olgu sunumları aracılığı ile iyice tanımlanmıştır. Ancak infantil B₁₂ eksikliğinde septomların biyolojik temelleri hakkında soru işaretleri vardır. Sinir hücrelerinin demiyelinizasyonu veya miyelinizasyon gecikmesi, SAM/SAH oranında bozulma, nörotoksik ve nörotrofik sitokinlerin dengesizliği ve beyin hücrelerinde laktat birikimi gibi çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür. Her bir mekanizmayı destekleyen durumlar olmasına karşın yüksek doz ile tedavi edildiğinde bazı nörolojik septomların hızla geri döner bir kısmı da aylar için de düzelir veya etkilenme zamanı ve dercesine göre hiç düzelmez. Bu yüzden bu süreçlerin tek başına katkısına yönelik şüphe uyandırmaktadır. Görünüyor ki sonuca birçok mekanizma aynı anda katkıda bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi de B₁₂ vitamini eksikliği olan hastalarda tespit ettiğimiz düşük serum S100B düzeyi olabilir.

S100B Hücreler arası (ekstraselüller) alanda nöronlar, astrositler, mikroglialar, inflamasyon hücreleri, epitel ve endotel hücreleri üzerinde konsantrasyona bağlı olarak tropik ya da toksik etkileri vardır. Hücreler arası alanda düşük (nanomolar) konsantrasyonlarda S100B, nöron büyümesi ve astrosit proliferasyonunu uyarır. Ancak S100B'nin yüksek (mikromolar) konsantrasyonlarda, invitro şartlarda nörotoksik etkisi mevcuttur. S100B'nin mikromolar konsantrasyonları apoptotik nöronal ölümü gerçekleştirir [127-129].

Yapılan çalışmalarda S100B protein düzeyi asfiksizde, çeşitli miyelinizasyon hasarı yapan hastalıklarda kardiyak hasarda ve Down sendromunda artmış olarak bulunmuştur. Ayrıca S100B proteininin karaciğer, böbrek ve barsak iskemisinde de artabileceği bildirilmiştir [127,129,145,167,168].

Transgenik farelerde yapılan çalışmalarda hipokampus dentritlerinde S100B'nin yüksek dansitede olduğu ve özellikle ilk bir yıllık dönemde, nörofibriller ağların oluşması için gerekli olduğu bildirilmiştir. S100B proteini; öğrenme ve hafızanın modülasyonunda görev aldığı ve nöronal gelişim açısından ve nöronal plastisite açısından önemli olduğu bildirilmiştir [134-137].

Literatürde B₁₂ eksikliği olan hastalarda serum S100B düzeyi ile ilgili yapılmış çalışmamızı karşılaştıracığımız benzer bir çalışma bulamadık. Bu bağlamda çalışmamız B₁₂ vitamin eksikliği olan hastalarda bir ilk özelliğini taşımaktadır. Çalışma sonucunda B₁₂ vitamini eksikliği olan hastalarda serum S100B değerleri anlamlı derecede fizyolojik sınırının altında olduğu görüldü. Serum S100B düzeyinin neden düştüğünü tam olarak anlaşılmadı. Ancak özellikle Scalabrino'nun ileri sürdüğü literatür bilgilerine göre yetişkin B₁₂ vitamin eksikliği olan hastalarda artmış TNF- α ve azalmış EGF şeklinde sitokin dengesizliği mevcut. Bu sitokin dengesizliği B₁₂ vitaminin eksikliğinin hematolojik ve nörolojik bulguları ile ilişkisi olduğu için bebeklerde beyin gelişimini etkileyen nöral bütünlüğünün kaybına katkıda bulunabileceğinin söylemiş. Bu muhtemelen bir yüksek nörotoksin olan TNF alfa ile nörotrofik olan düşük EGF düzeyi ile ilişkilendirmektedir [106,108,109,112,155]. Scalabrino'nun çalışmasının devamı niteliğinde olan yetişkin ağır B₁₂ vitamini eksikliği olan 34 hasta, saf demir eksikliği olan 12 hasta ile 34 sağlıklı hasta üzerinde Peracchi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada TNF alfa ile EGF'nin kobalamin tedavisinden nasıl etkilendiğini ve klinik ile ilişkisi için 3. ve 6. aylarda kontrol bakılmış. Görülmüşki klinik düzeldiğinde serum TNF alfa ile EGF düzeyi de normal düzeylere geliyormuş [110]. Donato ve arkadaşlarının literatüre sunduğu bilgilere göre S100B salgısını TNF alfa artırmakta ancak EGF azaltmaktadır [126]. Raponi ve arkadaşlarının yaptığı invitro çalışmada EGF'nin S100B salgısını azalttığını bulmuşlar. Literatürdeki bilgilere göre nöron hasarı durumunda serum S100B düzeyinin yükselmesi beklenir. Görülüyorki B12 vitamin eksikliğinde yüksek TNF alfa yaptığı hasara rağmen serum S100B düzeyi anlamlı derecede düşmektedir. Bu nedenle B₁₂ vitamin eksikliğinde görülen nöro motor etkilenmede yüksek TNF'nin yarattığı hasar yanında serum S100B düzeyini düşüklüğünden kaynaklanan nörotrofik etkisinin kaybı daha önemli olabilir.

Daha önce yapılan literatör çalışmalarında S100B proteinin nöronal gelişim ve plastisite açısından önemi bilinmektedir [135-137]. B₁₂ eksikliği olan hastalarda yapılan çalışmalar sonucunda hematolojik bulgu olmasa da nörolojik bulgular görülebilir [6,159]. S100B proteini fizyolojik düzeylerdeki fonksiyonları içerisinde nöroprotektif etkisi mevcut [137,159]. B₁₂ vitamin eksikliği olan hastalarda serum S100B düzeyinin anlamlı derecede fizyolojik sınırın altında olması bu hasta grubunda bulunan nörolojik gelişim geriliğine mevcut bilinen nedenlere ek olarak katkıda bulunduğunu düşünüyoruz. Ancak bunun için kanıtlanmış nörolojik geriliği olan hastalarda kontrollü geniş çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca B₁₂ vitamin eksikliğinde görülen nöromotor geriliğinin kobalamin

tedavisinden çok sonra iyileşmesi veya tam olarak iyileşmemesi tedaviden sonra bile uzun dönemde S100B'nin anlamlı derecede düşük seyretmesi ile ilişkili olabilir.

Literatürde S100B ile ilgili yapılan çalışmalarda S100B protein düzeyi asfiksida ve miyelinizasyon hasarı yapan çeşitli durumlarda düzeyi genellikle artmaktadır [126]. Serum S100B'nin azalmasıyla seyreden durumlar çok nadirdir. Holtkamp ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada anorexia nevruza hastalarında kronik açlık ile sonraki kilo kazanımının serum S100B düzeyi üzerine etkilerine bakılmış ve kronik açlıkta serum S100B düzeyi düşük bulunmuş. Kilo kaybının tedavi ile normal kiloyu yakalayan hastaların serum S100B düzeyleri normal seviyelere yükselmiş [169]. Denize İle arkadaşlarının sıçanlarda yaptığı çalışmada. Antiepileptiklere dirençli konvülziyonların ketojenik diyet ile tedavisi ve ketojenik diyetin BOS S100B üzerine etkisi bakılmış. Ketojenik diyetinin dirençli epilepsilerde etkili olduğu ve BOS S100B düzeyini düşürdüğü bulunmuş. Bu nedenle BOS S100B düzeyi dirençli nöbet bozuklukları için ketojenik diyet etkinliğinin bir göstergesi olarak teklif edilebilir olarak önermişler [170]. Steiner ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada anti psikotiklerden halloperidol ile klozapinin serum S100B düzeyinin düşürdüğünü böylece serum S100B'nin şizofreni tedavisinin takibinde kullanılabileceğini söylemişler [171]. Serum S100B düzeyini düşüren bir başka durum yüksek glukozdur. Nardin ve arkadaşlarının yaptığı in vitro çalışmalarında astrosit kültüründe yüksek glukoz düzeyinin serum S100B düzeyini azalttığını göstermişler [172]. Ancak Tramontina ve arkadaşlarının invitro primer astrositler veya C6 glioma hücreleri kültürleri kullanılarak yaptıkları çalışmada. Yüksek glukoz düzeyinin glutamin sentetazda azalma ve S100B salgılanmasında artış yaptığı görülmüş [173]. Bu durum Nardin ve arkadaşlarının sonucu ile çelişmektedir. Ayrıca yüksek glutamat düzeyi ekstraselüler serum S100B düzeyini bilinmeyen bir mekanizma ile düşürdüğü Tramontina ve arkadaşları tarafından ileri sürülmüştür [174].

Çalışmamızda B₁₂ vitamini eksikliği olan hasta grubundaki çocuklar hemoglobin ve hematokrit ortalama değerleri, B₁₂ vitamin eksikliği olmayan sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu. B₁₂ vitamini eksikliği olan grup nörolojik olarak etkilenip etkilenmemesine göre iki gruba ayrıldı. Eksiklik grubundaki çocukların MCV ortalamaları kontrol grubundan anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmakla birlikte, çoğu hastalarının MCV değerleri makrositik düzeyde değildi. Ortalama MCV değeri nöromotor olarak etkilenmiş grupta, nörolojik olarak etkilenmemiş gruba göre daha yüksek ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Aynı zamanda nörolojik etkilenmiş

grupta hemoglobin ve hematokrit ortalama deęerleri daha dūřuk saptandı ancak istatistiksel olarak anlamlı deęildi. Bu durumlar kobalamin eksiklięinin nērolojik bulgularının, makrositik eritrositler veya megaloblastik anemi geliřmesinden çok önce ortaya çıkabildięini ve anemi dercesinin nērolojik etkilenme ile ilgili olmadığını göstermektedir. B₁₂ vitaminin eksiklięi olanlar hastalarda B₁₂ vitamini eksiklięi olmayan saęlıklı kontrol gruba göre Serum S100B dūzeyi anlamlı dūzeyde dūřuktu. Kobalamin tedavisi ile Serum S100B dūzeyi artmaktadır. Bu artıř erken dönemde (tedavinin 7. Gn) istatistiksel olarak anlamlı deęil ancak 3. aydaki deęerler anlamlı dercede yüksekti. Serum S100B dūzeyi tedaviden aylar sonra bile saęlıklı kontrol grubuna göre anlamlı dūřuk (saęlıklı kontrol grubuna göre) seyretmesi B₁₂ vitamini eksiklięi olan hastalarda görülen nērolojik gerilięinin tedaviye raęmen neden geç dönemde dūzeldięi ile iliřkili olabilir.

Sonuç olarak B₁₂ vitamin eksiklięi olan çocuklarda dūřuk serum S100B dūzeyi görülmektedir. B₁₂ vitamin tedavisi ile serum S100B dūzeyi artmakta, ancak serum S100B dūzeyi tedavinin 3. ayında bile kontrol grubuna göre anlamlı dūzeyde dūřuk kalmaktadır. Dūřuk serum S100B dūzeyi nērolojik geliřim gerilięi ile iliřkili olabilir.

8. KAYNAKLAR

1. Watkins D, Whiteheat VM, Rosenblatt DS. Megaloblastic anemia. In: Orkin SH, Fisher DE, Look AT, Lux SE, Ginsburg D, Nathan DG (eds). *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood* (7th ed). Philadelphia: Saunders Elsevier, 2009: 467-521.
2. Fenech M. Chromosomal damage rate, aging, and diet. *Ann N Y Acad Sci*, 1998. 854: 23-36.
3. Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, et al. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab*, 1999. 67: 317-23.
4. Crane Mg, Sample C, Pathcett S, et al. Nutritional vitamin B12 deficiency in infants. *Am J Dis Child*, 1981. 135(566).
5. Monagle PT, Tauro G, Infantile megaloblastosis secondary to maternal vitamin B12 deficiency. *Clin Lab Hematol*, 1997. 19: 23-25.
6. Demir N. 6 - 24 ay arası çocuklarda B12 vitamini eksikliğinin nöromotor gelişim üzerindeki etkisi. *Uzmanlık tezi, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi*, 2003. Şanlıurfa
7. Koç A, Kocyigit A, Soran M, Demir N, et all. High frequency of maternal vitamin B12 deficiency as an important cause of infantile vitamin B12 deficiency in sanliurfa province of Turkey. *Eur J Nutr*, 2006; Volume 45, Number 5, 291-297
8. Fenech M, The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutat Res*, 2001. 475:57-67.
9. Ames BN. Micronutrient deficiencies. A major cause of DNA damage. *Ann N Y Acad Sci*, 1999. 889: 87-106.
10. Ames BN. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutat Res*, 2001. 475: 7-20.
11. Fenech M. Micronucleus frequency in human lymphocytes is related to plasma vitamin B12 and homocysteine. *Mutat Res*, 1999. 428: 299-304. 93
12. Nagdyman et al. Protein S-100 is present in extracerebral fluids before and after cardiac surgery. *Ann Clin Biochem*.2008; 45: 409-412
13. Kenangil G, Yalçın A.D, Haklar G, Cacina H, Forta H. Relation ofserum S-100 protein to infarkt size and clinical prognosis. *Marmara Medical Journal* 2004;17(3);105-108
14. Thorngren JK; Alling, C; Herbst, A; Amer-wahlin I; Marsal K S100 Protein in Serum as a Prognostic Marker for Cerebral Injury in Term Newborn Infants with Hypoxic Ischemic Encephalopathy *Pediatric Research: March 2004 - Volume 55 - Issue 3 - pp 406-412Articles*

15. Donato R. Intracellular and Extracellular Roles of s100 proteins *Microscopy Research and Technique* 2003; 60: 540-551
16. Rothermundt M, Peters M, Preehn JH, Arolt O, S100B in Brain Damage and neurodegeneration *Microsc Res. Tech* 2003; 60 (6): 614-32
17. Heinzmann WC, Fritt G, Schoter WB S100 Proteins: Structure, Functions and Pathology. *Frontiers in bioscience Zurich* 2002; 7: 1356: 1368.
18. Minnet C, Koç A, Aycicek A, Kocyigit A. Vitamin B₁₂ treatment reduces mononuclear DNA damage. *Pediatrics International* December 2011; Volume 53, Issue 6, pages 1023–1027
19. Coskun T. B12 vitamini. *Katkı Pediatri Dergisi*, 2003. 25: 419-433.
20. Kayaalp SO. Antianemik ilaçlar II: Megaloblastik anemilere karşı kullanılan ilaçlar. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, 1998. sekizinci basım, II. cilt(Hacettepe-tas kitapevi): 1580-1588.
21. Koç A, Koçyiğit A, Ulukanlıgil M, Demir N. Şanlıurfa yöresinde 9-12 yaş grubu çocuklarda B12 vitamini ve folik asit eksikliği sıklığı ile bağırsak solucanlarıyla ilişkisi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2005; 48: 308-315
22. Brody T. *Nutritional Biochemistry*. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1999:491-692.
23. Miller SM, Mears M. Nutritional Status Assesment. In: Anderson SC, Cockayne S. *Clinical Chemistry Concept and Applications*. New York: Mc Graw Hill, 2003: 579-611.
24. Ersöz B, Beslenme. Çeviri Editörleri: Menteş G, Ersöz B. Harper'ın *Biyokimyası*. 22. Baskıdan Çeviri. İstanbul: Barış kitapevi, 1993: 714-726.
25. McCormick DB, Greene HL. Vitamins. In: Burtis CA, Ashwood ER. *Tietz Textbook Of Clinical Chemistry*. 3th ed. Philadelphia: Saunders,1999: 999-1028.76
26. Maralcan M, Ellidokuz E. Vitamin B12 Eksikliği. *Güncel Gastroenteroloji* 2004; 8/3: 199-204.
27. <http://193.255.230.2/~fidanci/Sunular/VF-Sunular/VF-VitaminB12.pdf>. Erişim Tarihi: 04.10.2007
28. Bhavagan NV. Vitamin metabolism. In: Bhavagan NV. *Medical Biochemistry*. 4th ed. Florida: Hartcourt Academic Press. 2002:901-928.
29. Leal NA. B12 Metabolisms In Humans. Florida, University of Florida. 2004:1-
30. Aksoy A. *Beslenme Biyokimyası*, 1. Baskı, Ankara: Hatipoğlu Basım ve Yayım, 2000: 315-462
31. Seetharam B. How does cobalamin (vitamin B12) enter and traverse mammalian cells? *J Biosci*. 1987;11: 75-80.
- 32.. Soysal T. Megaloblastik Anemiler. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Anemiler Sempozyumu. İstanbul, 2001: 33-47.

33. Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E. Vitaminler. Çeviri editörleri: Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E. Lippincott's Biyokimya. 2.Baskı. İstanbul: Nobel tıp kitabevleri, 1997: 319-342.
34. Üstdal M, Karaca L, Testereci H, Kuş S, Paşaoğlu H, Türköz Y. Biyokimya, 1. Baskı, Ankara, Pelikan Yayıncılık, 2005:841-898.
35. <http://stu.inonu.edu.tr/~hcavdar/bgrubu.html>. Erişim Tarihi: 01.10.2007
36. Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology, 9th ed. Philadelphia, PA, W. B. Saunders Co, 1996: 845-847.
37. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, et al. Harper's Biochemistry, 25 th ed. Appleton & Lange, 2000.
38. Wickramasinghe SN, Fida S. Bone marrow cells from vitamin B12 and folate deficient patients misincorporate uracil into DNA. Blood, 1994. 83: 1656-1666.
39. Fenech M, Aitken C, and Rinaldi J. Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults. Carcinogenesis, 1998. 19(7): p. 1163-71.
40. Ames BN. Micronutrients prevent cancer and delay aging. Toxicol Lett, 1998. 102-103: 5-18.
41. Fenech M, Perepetskaya G, and Mikhalevich L. A more comprehensive application of the micronucleus technique for biomonitoring of genetic damage rates in human populations--experiences from the Chernobyl catastrophe. Environ Mol Mutagen, 1997. 30:112-8.
42. Matsui SM, Mahoney MJ, Rosenberg LE. The natural history of the inherited methylmalonic acidemias. N Engl J Med, 1983. 308: 857.
43. Lee GR, Foerster J, Lukens J, et al. Nutritional Factors in the Production and Function of Erythrocytes. Witrobe's clinical Hematolog, 1999. 10th edition: 941-964.
44. Lanzkowsky P. Manual of pediatric hematology and oncology. (3th ed), Academic Press; New York, 1999: 51-72.
45. Morrow G. A new variant of methylmalonic acidemia: defective coenzymeapoenzyme binding in cultured fibroblasts. Clin Chim Acta, 1978. 308: 857.
46. Retey J. Methylmalonyl-CoA mutase. _n Dolphin D (ed). B12 Biochemistry and Medicine. Vol 2., New York, Jhon Wily & Sons, 1982: 357-380.94
47. Coulombe JT, Shih V, Levy HL. Massachusetts Metabolic Disorders Screening Program. II. Methylmalonic aciduria. Pediatrics, 1981. 67: 26.
48. Rosenberg L. The _nherited methylmalonic acidemias. Prog Clin Biol Res., 1982. 103: 187.
49. Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase in vascular disease, neural tube defects and colon cancer. Chapter 6, Europharma, 1998.

50. Engbersen AMT, Franken D, Boers GHJ, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genet*, 1995. 56: 142-50.
51. Perna AF, Castaldo P, Ingrosso D, et al. Homocysteine, a new cardiovascular risk factor is also a powerful uremic toxin. *J Nephrol*, 1999. 12: 230-40.
52. Telefoncu A, Tıp ve Fen Bilimleri için Biyokimya. 1. Baskı, İstanbul: Aktas Tıp Kitapları, Sermet Matbaası; 1998:178-9.
53. Fattal-Valevski A, Bassan H, Korman SH, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency: Importance of early diagnosis. *J Child Neuro*, 1999. 15: 543.
54. Cumming AM, Olujohungbe A, Keeney S, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism in patients with homozygous sickle cell disease and stroke. *Br J Haematol*, 1999. 107:569-71.
55. Markus HS, Ali N, Swaminathan R, Sankaralingam, common polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene, homocysteine, and ischemic cerebrovascular disease. *stroke*, 1997. 28: 1739-43.
56. Sucu M, Karadere A, Toprak N. Homosistein ve kardiyovasküler hastalıkları. *Türk Kardiyol Dern Ar*, 2001. 29: 181-90.
57. Nelen WLDM, Blom HJ, Thomas CMG, Steegers EAP. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism affects the change in homocysteine and folate concentrations resulting from low dose folic acid supplementation in women with unexplained recurrent miscarriages. *Nutrition Org*, 1998. 128:1336.
58. Schwartz SM, Siscovick D, Malinow R, Rosendaal FR. Myocardial infarction in young women in relation to plasma total homocysteine, folate, and a common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *circulation*, 1997. 96: 412-7.
59. Hademenos J, Lberts MJ, Awad I, et al. Advances in the genetics of cerebrovascular diseases and stroke. *Neurology*, 2001. 56: 997-1008.
60. Kostulas K, Crisby M, Huang WX, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in ischaemic stroke and in carotid artery stenosis,. *Euro J Clin Invest*, 1998. 28: 285-9.95
61. Diaz-Arrastia R. Homocysteine and neurologic disease. *Arch Neurol*, 2000. 57: 1422-8.
62. Allen RH, Stabler SB, Savage DG, Lindenbaum J. Metabolic abnormalities in cobalamin (vitamin-B12) and folate deficiency. *FASEB J*, 1993. 7: 1344-53.
63. Monsen ALB, Refsum H, Markestad T, Ueland PM, Homocysteine and methylmalonic acid in diagnosis and risk assessment from infancy to adolescence. *Am J Clin Nutr*, 2003. 78: 7-21.

64. Marcell PD, Stabler S, Podell ER, Allen RH. Quantitation of methylmalonic acid and other dicarboxylic acids in normal serum and urine using capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem*, 1985. 150: 58-66.
65. Bjorke-Monsen AL, Ueland PM, Vollset SE, et al. Determinants of cobalamin status in newborns. *Pediatrics*, 2001. 108: 624-30.
66. Rasmussen K, Vyberg B, Pedersen KO, Brochner-Mortensen J. Methylmalonic acid in renal insufficiency: evidence of accumulation and implications for diagnosis of cobalamin deficiency. *Clin Chem*, 1990. 36: 1523-4.
67. Rasmussen K, Moelby L, Jensen MK. Studies on methylmalonic acid in humans. II. Relationship between concentrations in serum and urinary excretion, and the 96 correlation between serum cobalamin and accumulation of methylmalonic acid. *Clin. Chem.*, 1989. 35: 2277-80.
68. Montgomery JA, Mamer OA, Scriver CR. Metabolism of methylmalonic acid in rats. *Jclin Invest*, 1983. 72: 1937.
69. Lewis MS, Miller LS, Johnson MA, Dolce EB, Allen RH, Stabler SP. Elevated methylmalonic acid is related to cognitive impairment in older adults enrolled in an elderly nutrition program. *J Nutr Elder*, 2005. 24: 47-65.
70. Hvas AM, Ellegaard J, Nexø E. Increased plasma methylmalonic acid level does not predict clinical manifestations of vitamin B12 deficiency. *Arch Intern Med*, 2001. 162: 102-4.
71. Artuch R, Calco M, Ribes A, Camarasa F, Vilaseca MA. Increased urine methylmalonic acid excretion in infants with apnoeas. *J. J Inherit Metab Dis*, 1998. 21: 86-7.
72. Babior BM, Bunn HF. Megaloblastic Anemias. In: Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 12th ed. New York: McGraw Hill, 1991: 1523-1529.
73. Kozyraki R, Fyfe J, Kristiansen M, et al. The Intrinsic Factor- Vitamin B12 Receptor, Cubillin, Is A High-Affinity Apolipoprotein A-1 Receptor Facilitating Endocytosis Of High Density Lipoprotein. *Nature Medicine* 1999; 5: 656-661.
74. Verroust PJ, Christensen EI. Megallin And Cubillin- The Story Of Two Multipurpose Receptors Unfolds. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 1867-1871.
75. Hammad SM, Stefansson S, Twal WO, et al. Cubilin, The Endocytic Receptor For Intrinsic Factor- Vitamin B(12) Complex, Mediates High-Density Lipoprotein Holoparticle Endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 10158-10163.
76. Seetharam B, Bose S, Li N. Cellular Import Of Cobalamin (Vitamin B-12). *J Nutr* 1999; 129: 1761-1764.
77. Pletsch QA, Coffey JW. Intracellular distribution of radioactive vitamin B12 in rat liver. *J Biol Chem*, 1971. 246:4619.
78. MacDonald C, Farquharson J, Bessent RG, The forms of vitamini B12 on the transcobalamins. *Clin Sci (Lond)*, 1977. 52: 215.

79. Lee GR, Foerster J, Lukens J, et al. Inherited and drug-induced megaloblastic anemia. 10th edition ed, ed. W.s.c. Hematology, 1999. 973-978.
80. Kanazawa S, Herbert V, Herzlich B, et al. Removal of cobalamin analogua in bile by enterohepatic circulation. *Lancet*, 1983. 1: 707-708.
81. Koç A, Çocukluk çağında B12 vitamin eksikliği. *Türkiye klinikleri J.pediatri*, 2005. 1: 16-27.
82. Gözükar M. B12 vitamini. *Biyokimya*, 1990. Ofset Repromat Ltd. sti.(706-707).
83. Herbert V. Vitamin B12; plant sources, requirements, and assay. *Am J Clin Nutr*, 1988.48: 852-8.
84. Sandberg DP, Begely J, Hall CA, The content, binding, and forms of vitamin B12 in milk. *Am J Clin Nutr*, 1981. 34: 1717.
85. Trugo N, Sardinha F. Cobalamin and cobalamin-binding capacity in human milk. *Nutr. Res*, 1994. 14. 22-33.
86. Baker SJ, Mathan VI. Evidence regarding the minimal daily requirement of dietary vitamin B12. *Am J Clin Nutr*,1981. 34: 24-23.
87. Food and Nutrition Board, I.O.M. Vitamin B12. Dietary Reference Intakes: Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline Washington D.C.: National Academy Press, 1998. 306-356.
88. Fenech MF, Dreosti IE, and Rinaldi JR, Folate, vitamin B12, homocysteine status and chromosome damage rate in lymphocytes of older men. *Carcinogenesis*, 1997. 18: 1329-36.
89. Adkins Y, Lönnerdal B. Mechanisms of vitamin B12 absorption in breast-fed infants. *J of Pediatric Gast and Nut*, 2002. 32: 192-198.
90. Mittal VS, Aggarwal KN, Observations on nutritional megaloblastic anaemia in early childhood. *Indian J Med Res*, 1969. 57: 730-738.
91. Drogari E, Liakopoulou-Tsitsipi T, Xypoyta-Zachariadi A, et al. Transient methylmalonic aciduria in four breast fed neonates of strict vegetarian mothers in Greece. *Journal of inherited metabolic disease*, 1996: 19-84.
92. Kuzminski AM, Dell E, Allen RH, et al. Effective treatment of cobalamin deficiency with oral cobalamin. *Blood*, 1998. 92: 1191-1198.
93. Allen LH, King J. Vitamin B12 metabolism and status during pregnancy, lactation and infancy. in: *Nutrient Regulation during Pregnancy, Lactation and infant Growth*. Vol. plenum Press. 1994, New York. 173-186.
94. Lee GR, Foerster J, Lukens J, et al. Pernicious anemia and other causes of vitamin B12 (cobalamin) deficiency. 10th edition ed. Vol. *Witrobe's clinical Hematology*. 1999. 941-964.
95. Hall C.A. Function of vitamin B12 in the central nervous system as revealed by congenital defects. *Am J Hematol*, 1990. 34: 121-7.

96. Emerson RG, Pedley TA. Elektroencephalography and Evoked Potentials. In: Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM, Marsden CD. *Neurology in Clinical Practice*. 2000, Butterworth-Heinemann: Boston-Oxford. 473-496.
97. Stollhoff K and Schulte FJ, Vitamin B12 and brain development. *Eur J Pediatr*, 1987. 146: 201-5.
98. Duchen L, Jacobs J. Nutritional deficiencies and metabolic disorders. In: Adams J, Duchen LW, eds. *Green field's Neuropathology*. New York, NY: Oxford University Press; 1992:826-834.
99. Kunze K, Leitenmaier K. Vitamin B12 deficiency and subacute combined degeneration of the spinal cord (funicular spinal disease). In: Vinken P, Bruyn GW, eds. *Handbook of Neurology*. Vol 28. Amsterdam: Elsevier; 1976: 141-198.
100. Daphna K, Dror and Lindsay H Allen. Effect of vitamin B12 deficiency on neurodevelopment in infants: current knowledge and possible mechanisms. *Nutrition Reviews*® 2008. Vol. 66(5): 250-255
101. Lovblad K, Ramelli G, Remonda L, Nirkko AC, Ozdoba C, Schroth G. Retardation of myelination due to dietary vitamin B12 deficiency: cranial MRI findings. *Pediatr Radiol*. 1997;27: 155-158.
102. Baldessarini RJ. Neuropharmacology of S-adenosyl-L-methionine. *Am J Med*. 1987;83:95-103.
103. Casella EB, Valente M, de Navarro JM, Kok F. Vitamin B12 deficiency in infancy as a cause of developmental regression. *Brain Dev*. 2005; 27: 592-594.
104. Grattan-Smith PJ, Wilcken B, Procopis PG, Wise GA. The neurological syndrome of infantile cobalamin deficiency: developmental regression and involuntary movements. *Mov Disord*. 1997;12: 39-46.
105. Horstmann M, Neumaier-Probst E, Lukacs Z, Steinfeld R, Ullrich K, Kohlschütter A. Infantile cobalamin deficiency with cerebral lactate accumulation and sustained choline depletion. *Neuropediatrics*. 2003;34: 261-264.
106. Briddon A. Homocysteine in the context of cobalamin metabolism and deficiency states. *Amino Acids*. 2003;24: 1-12.
107. Molloy A, Weir D. Homocysteine and the nervous system. In: Jacobsen D, ed. *Homocysteine in Health and Disease*. Cambridge: Cambridge University Press; 2001;183-197.
108. Guerra-Shinohara EM, Morita OF, Peres S, et al. Low ratio of 5-adenosylmethionine to 5-adenosylhomocysteine is associated with vitamin deficiency in Brazilian pregnant women and newborns. *Am J Clin Nutr*. 2004;80: 1312-1321.
109. Scalabrino G. Subacute combined degeneration one century later. The neurotrophic action of cobalamin (vitamin B12) revisited. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001;60: 109-120.

110. Peracchi M, Bamonti Catena F, Pomati M, De Franceschi M, Scalabrino G. Human cobalamin deficiency: alterations in serum tumour necrosis factor- α and epidermal growth factor. *Fur J Haematol.* 2001;67: 123-127.
111. Scalabrino G, Carpo M, Bamonti F, et al. High tumor necrosis factor- α [corrected] levels in cerebrospinal fluid of cobalamin-deficient patients. *Ann Neurol.* 2004;56: 886-890.
112. Scalabrino G, Peracchi M. New insights into the patho-physiology of cobalamin deficiency. *Trends Mol Med.* 2006;12: 247-254.
113. Veal N, Hsieh CL, Xiong S, Mato JM, Lu S, Tsukamoto H. Inhibition of lipopolysaccharide-stimulated TNF- α promoter activity by S-adenosylmethionine and 5'-methylthioadenosine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;287:G352-G362
114. Schenck UV, Bender-Götze C, Koletzko B. Persistence of neurological damage induced by dietary vitamin B12 deficiency in infancy. *Arch Dis Child.* 1997. 77: 137-139.
115. Tateishi N, Shimoda T, Yada N, Shinagawa R, Kagamiishi Y. S100B: astrocyte specific protein. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 2006; 26 (1): 11-6.
116. Schafer, B.W., et al., Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics*, 1995. 25(3): p. 638-43.
117. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 33,637-668,2001
118. R.H. Kretsinger, D. Tolbert, S. Nakayama, W. Pearson. The EF-hand, homologs and analogs, in: *Novel Calcium Binding Proteins*. Springer-Verlag. 1991; pp: 17-37.
119. Kuhne M, Brown DWG, Jin L. Genetic variability of measles virus in acute and persistent infections. *Infect Genet Evol.* 2006; 6: 269-76.
120. Donato R. S100 proteins. *Cell Calcium.* 1986; 7: 123-45.
121. Nylén K, Csajbok LZ, Ost M, Rashid A, Blennow K, Nellgard B. Serum glial fibrillary acidic protein is related to focal brain injury and outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2007; 38: 1489-94.
122. Jung CS, Foerch C, Schanzer A, Heck A, Plate KH, Seifert V. Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain* 2007;12: 1-6.
123. Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I, et al. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med* 2003; 349:139-45.
124. Lamers KJ, Vos P, Verbeek MM, Rosmalen F, Van Geel WJ, Van Engelen BG. Protein S-100B, neuron-specific enolase (NSE), myelin basic protein (MBP) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in cerebrospinal fluid (CSF) and blood of neurological patients. *Brain Res Bull* 2003; 61: 261-4.

125. W.S.T. Griffin, L.C. Stanley, C. Ling, L. White, W McLeod, L.J. Perrot, C.L. White III, C. Araoz. Brain interleukin 1 and S100 immunoreactivity are elevated in Down's syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci.* 1989; 86: 7611–5.
126. Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, et al. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009;1793:1008-22.
127. Y. Li, S.W. Barger, L. Liu, R.E. Mrak, W.S.T. Griffin, S100b induction of the proinflammatory cytokine interleukin-6 in neurons, *J. Neurochem.* 74,143–150. 2000
128. M.A. Mariggio, S. Fulle, P. Calissano, I. Nicoletti, G.Fano, The brain protein S100ab induces apoptosis in PC12 cells, *Neuroscience* 60,29–35. 1994
129. H.J. Huttunen, J. Kuja-Panula, G. Sorci, A.L. Agneletti, R. Donato, H. Rauvala, Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through RAGE activation, *J. Biol. Chem.* 275,40096–40105. 2000
130. S. Fulle, T. Pietrangelo, M.A. Mariggio, P. Lorenzon, L.Racanicchi, J. Mozrzymas, S. Guarnieri, G. Zucconi-Grassi, G. Fano, Calcium and fos involvement in brain-derived Ca²⁺-binding protein (S100)-dependent apoptosis in rat pheochromocytoma cells, *Exp. Physiol.* 85 243–253. 2000
131. C. Adami, G. Sorci, E. Blasi, A.L. Agneletti, F. Bistoni, R. Donato, S100B expression in and effects on microglia. *Glia* 33 ,131–142,2001
132. Gerlach, R., et al., Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress. *Neuroscience*, 2006. 141(4): p. 1697-701.
133. Tramontina, F., et al., High glutamate decreases S100B secretion by a mechanism dependent on the glutamate transporter. *Neurochem Res*, 2006. 31(6): p. 815-20.
134. L.A. Gromov, L.P. Syrovatskaya, G.V. Ovinova, Functional role of the neurospecific S100 protein in the processes of memory, *Neurosci. Behav. Physiol.* 22,25–29. 1992
135. B.S. O'Dowd, W.Q. Zhao, K.T. Ng, S.R. Ribinson, Chicks injected with antisera to either S100a or S100b protein develop amnesia for a passive avoidance task, *Neurobiol. Learning Memory* 67, 197–206,1997
136. P.M. Whitaker-Azmitia, M. Wingate, A. Borella, R.Gerlai, J. Roder, E.C. Azmitia, Transgenic mice overexpressing the neurotrophic factor S100_ show neuronal cytoskeletal and behavioral signs of altered aging processes: implications for Alzheimer's disease and Down's syndrome, *Brain Res.* 776,51–60,1997
137. L.I. Benowitz, A. Routtenberg, GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity, *Trends Neurosci.* 20,84–91. 1997
138. Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, Arolt V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech.* 60(6):614-32, 2003.

139. Kim JS, Yoon SS, Kim YH, Ryu JS. Serial measurement of interleukin-6, transforming growth factor-beta, and S-100 protein in patients with acute stroke. *Stroke*, 27(9): 1553, 1996.
140. Missler U, Wiesmann M, Friedrich C, Kaps M. S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke*, 28(10):1956-60, 1997.
141. Wunderlich MT, Ebert AD, Kratz T, Goertler M, Jost S, Herrmann M. Early neurobehavioral outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage. *Stroke*, 30(6): 1190-5,1999.
142. Elting JW, de Jager AE, Teelken AW, Schaaf MJ, Maurits NM, van der Naalt J, Sibinga CT, Sulter GA, De Keyser J. Comparison of serum S-100 protein levels following stroke and traumatic brain injury. *J Neurol Sci*. 181(1-2):104-10, 2000.
143. Wunderlich MT, Ebert AD, Kratz T, Goertler M, Jost S, Herrmann M. Early neuro behavioral outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage. *Stroke* 1999; 30: 1190-1195.
144. Gazzolo D, Vinesi P, Bartocci M, Geloso MC, Bonacci W, Serra G. Elevated S100 blood level as early indicators of intraventricular hemorrhage in preterm infants. Correlation with cerebral Doppler velocimetry. *J Neurol Sci* 1999;170: 32-5.
145. Nagdyman N, Komen W, Ko HK, Müller C, Obladen M. Early biochemical indicators of hypoxic-ischemic encephalopathy after birth asphyxia. *Pediatr Res* 2001; 49: 502-6.
146. Gazzolo D, Di Lorio R, Marinoni E, Masetti P, Serra G, Giovannini I. S100B protein is increased in asphyxiated term infants in developing intraventricular hemorrhage. *Crit Care Med* 2002; 30: 1356-60.
147. Blennow M, Savman K, Ilves P, Thoresen M, Rosengren L. Brain-specific proteins in the cerebrospinal fluid of severely asphyxiated newborn infants. *Acta Paediatr* 2001; 90: 1171-5.
148. Gazzolo D, Marinoni E, Di Lorio R, Lituania M, Bruschetti PL, Michetti F. Circulating S100 beta protein is increased in intrauterine growth-retarded fetuses. *Pediatr Res* 2002;51: 215-9.
149. Michetti F, Gazzolo D. S100B Protein in Biological Fluids: A Tool for Perinatal Medicine. *Clinical Chemistry* 2000;48: 2097-104.
150. Gazzolo D, Bruschetti M, Corvino V, Oliva R, Sarli R, Lituania M. S100B protein concentrations in amniotic fluid are correlated with gestational age and with cerebral ultrasound scanning parameters results in healthy fetuses. *Clin Chem* 2001; 47: 954-6.
151. Portela LC, Tort AB, Neto EC, Kessler RG, Penchaszadeh V, Souza DO. High immunoreactivity of S100 beta protein in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000; 6: 590-2.
152. Abaha HD, Noble PL, Nicolaidis KH, Sherwood RA. Maternal serum S100 protein in normal and Down syndrome pregnancies. *Prenat Diagn* 1999; 19: 334-6.

153. Gazzolo D, Bruschetti M, Lituanica M, Serra G, Bonacci W, Michetti F. Increased urinary S100B protein as an early indicator of intraventricular hemorrhage in preterm infants: correlation with the grade of hemorrhage. *Clin Chem* 2001; 47: 1836-8.
154. Neyzi O: Büyüme ve gelişme, pediatri. Neyzi O, Ertuğrul T, 3. baskı. Nobel Tıp Kitapevi: İstanbul 2002; s:69-102.
155. Daphna Dror K. and Lindsay H. A. Effect of vitamin B12 deficiency on neurodevelopment in infants: current knowledge and possible mechanisms. *Nutrition Reviews* Vol. 66'5:250-255
156. Selva Kumar S, Singh Chouhan R, Singh Thakur M. Trends in analysis of vitamin B12. *Analytical Biochemistry* 398 (2010) 139–149
157. Black MM. Effects of vitamin B₁₂ and folate deficiency on brain development in children. *Food Nutr Bull* 2008; 29 (Suppl): S126-131.
158. Metz J. Pathogenesis of cobalamin neuropathy: deficiency of nervous system S-adenosylmethionine? *Nutr Rev* 1993; 51: 12-15.
159. Ertaş T, Koç A, Koçyiğit A, Baz T. Bebeklerin nöro-motor, sosyal ve fiziksel gelişmeleri üzerine B12 vitamini eksikliğinin etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2011; 54: 62-69
160. Honzik T, Adamovicova M, Smolka V, Magner M, Hrubá E, Zeman J. Clinical presentation and metabolic consequences in 40 breastfed infants with nutritional vitamin B12 deficiency – What have we learned? *Eur J Paediatr Neurol* 2010; 14: 488-495.
161. Kühne T, Bubl R, Baumgartner R. Maternal vegan diet causing a serious infantile neurological disorder due to vitamin B12 deficiency. *Eur J Pediatr* 1991; 150: 205-208.
162. Şimşek OP, Gönç N, Gümrük F, Çetin M. A child with vitamin B₁₂ deficiency presenting with pancytopenia and hyperpigmentation. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004; 26: 834-838.
163. Heaton EB, Savage DG, Brust JC, Garret TJ, Lindenbaum J. Neurologic aspects of cobalamin deficiency. *Medicine* 1991; 70: 229-245.
164. Chalouhi C, Faesch S, Anthoine-Milhomme MC, Fulla Y, Dulac O, Cheron G. Neurological consequences of vitamin B₁₂ deficiency and its treatment. *Pediatr Emerg Care* 2008; 24: 538-541.
165. incecik F, Hergüner MO, Altunbasak S, Leblebisatan G. Neurologic findings of nutritional vitamin B12 deficiency in children, *lurk J Pediatr* 52; 2010: 17-21.
166. Şen S, Durat G, Atasoy I. Vitamin B 12 ve Folik Asit Eksikliğinin Psikiyatrik ve Nörolojik Bozukluklarla İlişkisi. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2009; 7(1): 31-36
167. Pelinka LE, Harada N, Szalay L, Jafarmadar M, Redl H, Bahrami S. Release of S100B differs during ischemia and reperfusion of the liver, the gut, and the kidney in rats. *Shock*. 2004; 21: 72-6.

168. Netto CB, Portela LV, Ferreira CT, Kieling C, Matte U, Felix T, da Silveira TR, Souza DO, Goncalves CA, Giugliani R. Ontogenetic changes in serum S100B in Down syndrome patients. *Clin Biochem.* 2005; 38: 433-5.
169. Holtkamp K, Buhren K, Ponath G, Eiff CV, Dahlmann BH, Hebebrand J, Rothermundt M. Serum levels of S100B are decreased in chronic starvation and normalize with weight gain. *J Neural Transm* (2008) 115:937–940
170. Denize R, Zieglera, Diogo LO, Piresa C, Ribeiroa L, Leiteb M, Mendezb A, Gonc D, Tramontinab F, Portelab LV, Susana T, Wofchukb, Marcos L. Perryb, Gonc CA, Ketogenic diet fed rats have low levels of S100B in cerebrospinal fluid. *Neuroscience Research* 50 (2004) 375–379
171. Steiner J, Schroeter ML, Schiltz K, Bernstein HG, Müller UJ, Richter-Landsberg C, Müller WE, Walter M, Gos T, Bogerts B, Keilhoff G. Haloperidol and clozapine decrease S100B release from glial cells. *Neuroscience.* 2010 Jun 2;167(4): 1025-31.
172. Nardin P, Tramontina F, Leite MC, Tramontina AC, Quincozes-Santos A, de Almeida LM, Battastini AM, Gottfried C, Gonçalves CA. S100B content and secretion decrease in astrocytes cultured in high-glucose medium. *Neurochem Int.* 2007 Apr;50(5): 774-82. Epub 2007 Feb 9.
173. Tramontina AC, Nardin P, Quincozes-Santos A, Tortorelli L, Wartchow KM, Andrezza AC, Braganhol E, de Souza DO, Gonçalves CA. High Glucose and S100B Stimulate Glutamate Uptake in C6 Glioma Cells. *Neurochem Res.* 2012 Feb 23.
174. Tramontina F, Leite MC, Gonçalves D, Tramontina AC, Souza DF, Frizzo JK, Nardin P, Gottfried C, Wofchuk ST, Gonçalves CA. High glutamate decreases S100B secretion by a mechanism dependent on the glutamate transporter. *Neurochem Res.* 2006 Jun;31(6): 815-20. Epub 2006 Jun 23.