

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SAĞLIKLI VE FENİLKETONÜRİLİ ÇOCUKLARDA
FONKSİYONEL B12 VİTAMİN EKSİKLİĞİNİN
PLAZMA METİLMALONİK ASİT VE HOMOSİSTEİN
DÜZEYLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

MERVE AKIŞ

**TIBBİ BİYOKİMYA
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2012

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2009970001

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SAĞLIKLI VE FENİLKETONÜRİLİ ÇOCUKLARDA
FONKSİYONEL B12 VİTAMİN EKSİKLİĞİNİN
PLAZMA METİLMALONİK ASİT VE HOMOSİSTEİN
DÜZEYLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

**TIBBİ BİYOKİMYA
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

MERVE AKIŞ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. HÜRAY İŞLEKEL

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2009970001

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Tıbbi Biyokimya Yüksek Lisans programı öğrencisi Merve AKIŞ “SAĞLIKLI VE FENİLKETONÜRİLİ ÇOCUKLARDA FONKSİYONEL B12 VİTAMİN EKSİKLİĞİNİN PLAZMA METİLMALONİK ASİT VE HOMOSİSTEİN DÜZEYLERİ İLE ARAŞTIRILMASI” isimli Yüksek Lisans tezini 26/07/2012 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



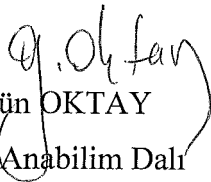
Prof. Dr. Hüray İŞLEKEL
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
BAŞKAN



Prof. Dr. Canan ÇOKER
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
ÜYE



Prof. Dr. Gül GÜNER
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
ÜYE



Prof. Dr. Gülgün OKTAY
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
ÜYE



Prof. Dr. Nur ARSLAN
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
ÜYE

Prof. Dr. Semra KOÇTÜRK
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Kemal BAYSAL
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇİNDEKİLER	i
TABLO DİZİNİ	iv
ŞEKİL DİZİNİ	vi
KISALTMALAR	viii
TEŞEKKÜR	x
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1. B12 VİTAMİNİ	8
2.1.1. B12 Vitamininin Tanımı ve Tarihi	8
2.1.2. B12 Vitamininin Moleküler Yapısı	8
2.1.3. B12 Vitamininin Formları	9
2.1.4. B12 Vitamininin Besinsel Kaynakları	10
2.1.5. B12 Vitamininin Günlük Alınması Gereken Miktarları	10
2.1.6. B12 Vitamininin Biyoyararlanımı	11
2.1.7. B12 Vitamininin Sindirim, Emilim ve Taşınması	12
2.1.8. B12 Vitamininin Emilim Sonrası Metabolizması	13
2.1.9. B12 Vitamininin Depolanması ve Atılımı	14
2.1.10. B12 Vitamininin Biyokimyasal Fonksiyonu	15
2.1.10.1. D-metilmalonil-KoA metabolizması	15
2.1.10.2. Homosistein metabolizması	16
2.2. B12 VİTAMİN EKSİKLİĞİ	18
2.2.1. B12 Vitamin Eksikliğinin Prevalansı	18
2.2.2. B12 Vitamin Eksikliğinin Nedenleri	18
2.2.3. B12 Vitamin Eksikliğinin Klinik Belirtileri	20

2.2.4. B12 Vitamin Eksikliğinin Belirlenmesinde Kullanılan Biyokimyasal Parametreler	22
2.2.4.1. Ortalama eritrosit hacmi	22
2.2.4.2. B12 vitamini	23
2.2.4.3. Holotranskobalamin	24
2.2.4.4. Homosistein	25
2.2.4.5. Metilmalonik asit	27
2.3. FENİLKETONÜRİ	32
2.3.1. Fenilketonürinin Tanımı, Biyokimyasal Mekanizması ve Tarihçesi	32
2.3.2. Fenilketonürinin Görülme Sıklığı ve Genetiği	33
2.3.3. Fenilketonürinin Sınıflandırılması	33
2.3.4. Fenilketonürinin Klinik Bulguları	34
2.3.5. Fenilketonürinin Tedavisi	34
2.3.6. Fenilketonüride Olası Besin Eksiklikleri	37
2.3.7. Fenilketonüri ve B12 Vitamini	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM	40
3.1. Araştırmanın Tipi	40
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	40
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örnekleme/Çalışma Grupları	40
3.4. Çalışma Materyali	40
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	41
3.6. Veri Toplama Araçları	42
3.6.1. Kullanılan Kimyasallar, Malzemeler ve Cihazlar	42
3.6.2. Rutin Biyokimyasal Analizler	43
3.6.3. Metilmalonik asit (MMA) Analizi	43
3.6.3.1. LC-MS/MS Özellikleri ve Çalışma Koşulları	47
3.6.3.1.1. Yüksek performans sıvı kromatografisi	47
3.6.3.1.2. Tandem kütle spektrometresi	49
3.6.3.2. Plazma Havuzunun ve MMA Standartlarının Hazırlanması	49
3.6.3.2.1. Plazma havuzunun hazırlanması	49
3.6.3.2.2. Plazma havuzunun endojen MMA konsantrasyonunun belirlenmesi	50

3.6.3.2.3. MMA ve döteryumlu MMA stok standartlarının hazırlanması	51
3.6.3.2.4. MMA kalibrasyon eğrileri için kullanılan standartların hazırlanması	52
3.6.3.3. SID-MRM LC-MS/MS ile MMA Analizi İçin Örnek Hazırlığı	54
3.6.3.4. Yöntem Geçerlilik Çalışmaları	55
3.6.3.4.1. Analitik duyarlılık	55
3.6.3.4.2. Doğruluk	55
3.6.3.4.3. Doğrusallık	55
3.6.3.4.4. Kesinlik	56
3.6.3.4.5. Tespit limiti ve kantitasyon limiti	57
3.6.3.4.6. Geri kazanım	57
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	58
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	58
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	58
3.10. Etik Kurul Onayı	58
4. BULGULAR	59
5. TARTIŞMA	85
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	93
7. KAYNAKLAR	94
8. EKLER	107

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa no</u>
Tablo 1. Yaş gruplarına göre günlük önerilen B12 vitamini miktarları	11
Tablo 2. Kobalamin malabsorpsiyonunun nedenleri	19
Tablo 3. Kobalamin malabsorpsiyonunun kalıtsal bozuklukları	20
Tablo 4. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve malzemeler	42
Tablo 5. Çalışmada kullanılan cihazlar	42
Tablo 6. MMA yönteminin HPLC çalışma koşulları	48
Tablo 7. Standart ekleme yönteminin hazırlığı	50
Tablo 8. Su ya da plazma havuzu ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinde kullanılan MMA standartlarının hazırlanması	53
Tablo 9. MMA doğrusallık çalışması standartlarının hazırlanması	56
Tablo 10. MMA kalite kontrol örneklerinin hazırlanması	56
Tablo 11. MS/MS sisteminin MMA ve d ₃ -MMA analizi için optimizasyon koşulları	59
Tablo 12. Su ile hazırlanan MMA kalibrasyon eğrisi çalışmasının sonuçları	65
Tablo 13. Plazma havuzu ile hazırlanan MMA kalibrasyon eğrisi çalışmasının sonuçları	65
Tablo 14. MMA'nın plazma havuzu ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi standartlarının doğruluğu	68
Tablo 15. MMA kalite kontrol örnekleri ile yapılan gün içi ve günler arası kesinlik çalışması	69
Tablo 16. MMA yönteminin tespit ve kantitasyon limitleri	71
Tablo 17. MMA yönteminin geri kazanımı	71

Tablo 18. FKÜ'li hasta ve kontrol gruplarının demografik ve antropometrik özellikleri	72
Tablo 19. FKÜ ve kontrol gruplarının B12 vitamini durumu ile ilişkili biyokimyasal parametreler açısından değerlendirilmesi	74
Tablo 20. FKÜ alt gruplarının ve kontrol grubunun demografik ve antropometrik özellikleri	76
Tablo 21. Diyete uyan, diyete uymayan ve kontrol gruplarının B12 vitamini durumu ile ilişkili biyokimyasal parametreler açısından ikili karşılaştırmaları	77
Tablo 22. FKÜ grubunda biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyonlar	78
Tablo 23. Kontrol grubunda biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyonlar	79
Tablo 24. FKÜ ve kontrol grubu birlikte ele alındığında incelenen biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyonlar	80
Tablo 25. Fonksiyonel B12 vitamin eksikliği olan FKÜ'li olgulara ait değerler	82
Tablo 26. Fonksiyonel B12 vitamin eksikliği olan sağlıklı kontrollere ait değerler	83
Tablo 27. B12 vitamin eksikliğinin gösterilmesinde plazma MMA ve serum B12 vitamininin tanı değerlerinin karşılaştırılması	84

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa no</u>
Şekil 1. B12 vitamini ve bazı formlarının yapısal formülü	8
Şekil 2. B12 vitamininin intestinal emilimi	13
Şekil 3. Kobalaminin hücre içi metabolizması	14
Şekil 4. D-metilmalonil-KoA metabolizması	16
Şekil 5. Homosistein metabolizması	17
Şekil 6. İntraselüler kobalamin metabolizması ve defektleri	28
Şekil 7. Fenilalaninin tirozine dönüştüğü metabolik yol	32
Şekil 8. FKÜ için farklı organlara yönelik mevcut tedavi stratejileri	35
Şekil 9. LC-ESI-MS/MS sisteminin şematik gösterimi	44
Şekil 10. Triple quadrupole iyon trap tandem kütle spektrometresi (QTRAP MS/MS)	45
Şekil 11. MRM modunda seçilen ana iyon/ürün iyon ikilisinin izlenmesi	46
Şekil 12. Stabil izotop işaretli internal standartlar	46
Şekil 13. MRM modunda izlenen analit ve internal standardının iyon kromatogramı	47
Şekil 14. LC-MS/MS’de MMA analizi için örnek hazırlığı basamakları	54
Şekil 15. MMA için ESI-MS/MS ürün iyon kütle spektrumu	60
Şekil 16. d ₃ -MMA için ESI-MS/MS ürün iyon kütle spektrumu	61
Şekil 17. MMA’nın plazma havuzu ile hazırlanan 0.5 µmol/L standardına ait total iyon kromatogramı	62
Şekil 18. MMA’nın plazma havuzu ile hazırlanan 0.5 µmol/L standardına ait ekstrakte iyon kromatogramı	63

Şekil 19. Standart ekleme yöntemi için hazırlanan grafik	64
Şekil 20. MMA'nın su ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi	66
Şekil 21. MMA'nın plazma havuzu ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi	66
Şekil 22. Plazma örneklerindeki MMA konsantrasyonlarının iki farklı kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılması	67
Şekil 23. MMA yönteminin doğrusallık grafiği	69
Şekil 24. LOD için plazma havuzunun 1:8 dilüsyonu ile elde edilen S/N oranı	70
Şekil 25. LOQ için plazma havuzunun 1:2 dilüsyonu ile elde edilen S/N oranı	70
Şekil 26. FKÜ grubunda fonksiyonel B12 vitamin eksikliği olan olgu sayıları	81
Şekil 27. Kontrol grubunda fonksiyonel B12 vitamin eksikliği olan kişi sayısı	83

KISALTMALAR

AdoKbl	Adenozilkobalamin
BH₄	Tetrahidrobiyopterin
CNKbl	Siyanokobalamin
Co	Kobalt atomu
d₃-MMA	Döteryumlu metilmalonik asit
Da	Dalton
DRI	Dietary Reference Intakes
dTMP	Deoksitimidin monofosfat
dUMP	Deoksiüridin monofosfat
ESI	Elektrospray iyonizasyon
FAH	Fenilalanin hidroksilaz
FDA	Food and Drug Administration
FKÜ	Fenilketonüri
GA	Güven aralığı
GC-MS	Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
HC	Haptokorrin
Hcy	Homosistein
HFA	Hiperfenilalaninemi
HoloTC	Transkobalamin II'ye bağlı B12 vitamini
HPLC (LC)	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
IF	İntrensek faktör
IS	İnternal standart
Kbl	Kobalamin
LC-MS/MS	Sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi
LIT	Lineer iyon trap
LOD	Tespit limiti
LOQ	Kantitasyon limiti
MCM	Metilmalonil-KoA mutaz
MCV	Ortalama eritrosit hacmi
MeKbl	Metilkobalamin
MH	Mantel-Haenszel

MMA	Metilmalonik asit
MRM	Çoklu reaksiyon izleme (Multiple reaction monitoring)
MS	Metiyonin sentaz
MS/MS	Tandem kütle spektrometresi
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
OHKbl	Hidroksikobalamin
ppb	parts per billion (milyarda bir)
QQQ	Triple quadrupole
RDA	Recommended Dietary Allowances
RIA	Radioimmünoassay
SAM	S-adenozilmetiyonin
SAX	Güçlü iyon değıştirici
SID	Stabil izotop dilüsyon
SS	Standart sapma
TCI	Transkobalamin I
TCII	Transkobalamin II
tHcy	Total Hcy
THF	Tetrahidrofolat

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince pratik ve teorik alandaki değerli bilgi ve deneyimlerinden her zaman yararlandığım, tez çalışmamın gerek deneysel gerekse tez yazımı aşamasının yürütülmesi sırasında karşılaştığım sorunlara sabırlı, hoşgörülü ve titiz yaklaşımı ile bana her türlü katkıyı sağlayan ve öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum çok değerli danışman hocam **Sayın Prof. Dr. Hüray İŞLEKEL'e**,

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda almış olduğum eğitimde emeği geçen, güler yüzlerini ve yardımlarını bizden esirgemeyen başta Anabilim Dalı Başkanımız **Sayın Prof. Dr. Canan ÇOKER** olmak üzere Anabilim Dalı'nın **tüm değerli öğretim üyelerine**,

Araştırmamın klinik yönü için veri toplanması aşamasında ve tez yazımı sırasında yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen **Sayın Prof. Dr. Nur ARSLAN'a**,

Tezimin istatistiksel analizlerinde değerli bilgi ve önerilerinden yararlandığım saygıdeğer hocam **Prof. Dr. Gazanfer AKSAKOĞLU'na**,

Tezimin klinik yönünün gerçekleşmesinde en zorlu kısım olan veri toplama aşamasındaki katkılarından dolayı **Dr. İshak IŞIK'a**,

Tez çalışmam boyunca tüm fedakârlığı ile bana her konuda destek ve yardımcı olan, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli çalışma arkadaşım **Melis KANT'a**,

Manevi desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyokimya AD'daki **tüm arkadaşlarıma**, bölüm sekreterimiz sevgili **Eda Nesrin OLUM'a** ve **Fadime ablamız'a**,

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu zorlu süreçte de göstermiş oldukları maddi ve manevi her türlü desteklerini benden esirgemeyen çok sevgili dostlarım **Sare KARATAŞ**, **Esra YILMAZ**, **Meltem GÜLTEKİN** ve **Türkan GÜRSOYLU'ya**,

Eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, beni her konuda karşılıksız destekleyen ve bugünlere gelmemde gösterdikleri sabır ve fedakârlık için **canım aileme** ve canımdan çok sevdiğim biricik yeğenim **Yusuf Talha'ya**

sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Merve AKIŞ

SAĞLIKLI VE FENİLKETONÜRİLİ ÇOCUKLARDA FONKSİYONEL B12 VİTAMİN EKSİKLİĞİNİN PLAZMA METİLMALONİK ASİT VE HOMOSİSTEİN DÜZEYLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

Merve AKIŞ

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 35340, İnciraltı, İzmir

ÖZET

Giriş ve amaç: Fenilketonüri (FKÜ) hastaları fenilalaninden zengin doğal proteinlerden kısıtlı diyetleri nedeniyle fonksiyonel B12 vitamin eksikliği riski altındadırlar. B12 vitamin eksikliğinin belirlenmesinde B12 vitamin konsantrasyonlarından daha duyarlı fonksiyonel belirteçler olan metilmalonik asitin (MMA) ve/veya homosisteinin (Hcy) kandaki yüksek konsantrasyonları bozulmuş hücre içi B12 vitamin durumunun göstergesi olarak kabul edilmektedir. Ancak, literatürde bu parametrelerin tanı değeri ile ilgili yapılmış yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı; kısıtlı diyet alan FKÜ hastalarının fonksiyonel B12 vitamin eksikliği açısından sağlıklı kontroller ile karşılaştırılması ve B12 vitamin eksikliğinde MMA ölçümünün B12 vitamini ölçümüne göre tanı değerinin ortaya konmasıdır.

Gereç ve yöntem: Çalışmaya 5-18 yaşları arasındaki fenilalaninden kısıtlı diyet alan 31 FKÜ hastası ve 26 sağlıklı çocuk dahil edildi. Serum B12 vitamini, ferritin ve folik asit düzeyleri kemilüminesans immünoassay yöntemiyle, fenilalanin düzeyi fluorimetrik bir yöntemle belirlendi. MCV değerleri hemogram cihazında çalışıldı. Plazma Hcy düzeyi ise HPLC ile ölçüldü. Plazma MMA düzeyi stabil izotop dilüsyon-çoklu reaksiyon izleme sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (SID-MRM LC-MS/MS) yöntemi ile belirlendi. MMA yönteminin analitik performansının değerlendirilmesinde doğruluk, doğrusalılık, gün içi ve günler arası kesinlik, tespit limiti, kantitasyon limiti ve geri kazanım çalışmaları yapıldı. Verilerin istatistiksel analizlerinde SPSS 15.0 programı kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular: 0.05-2.5 µmol/L aralığındaki kalibrasyon standartları ile değerlendirilen MMA yönteminin doğruluğu 100 ± 4 olarak bulundu. Yöntem 100 µmol/L'ye kadar doğrusaldı. Gün içi ve günler arası %CV sırasıyla 4.0 ve 6.0'dan küçük bulundu. Plazma MMA ölçümü için tespit ve kantitasyon limitleri sırasıyla 0.021 µmol/L ve 0.085 µmol/L olarak belirlendi. Düşük ve yüksek konsantrasyonda MMA içeren plazma örneklerine eklenen MMA'nın geri kazanımı sırasıyla %87.6 ve %86.4 bulundu. FKÜ ve kontrol grupları karşılaştırıldığında; iki grup arasında serum B12 vitamini, plazma MMA ve Hcy düzeyleri açısından anlamlı fark bulunamadı. FKÜ'li olgular arasında, serum B12 vitamini düşük olanlar grubun %12.9'unu, plazma MMA ve Hcy düzeyleri yüksek olanlar ise sırasıyla %29'unu ve %9.7'sini oluşturmaktaydı. Kontrol grubunun ise %30.7'sinde ve %11.5'inde sırasıyla plazma MMA ve Hcy konsantrasyonları yüksek bulundu. Folik asit ve MCV düzeylerinin FKÜ grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi ($p<0.01$). İncelenen parametreler arasındaki korelasyonlar değerlendirildiğinde; FKÜ grubunda plazma Hcy ile fenilalanin ve MCV düzeyleri arasında anlamlı pozitif korelasyonlar, folik asit ile anlamlı negatif korelasyon saptandı ($p<0.05$). Kontrol grubunda ise plazma MMA ile Hcy konsantrasyonları arasında anlamlı pozitif korelasyon bulundu ($p<0.05$). FKÜ ve kontrol gruplarının verileri birlikte ele alındığında, serum B12 vitamin konsantrasyonları ile plazma MMA ve MCV düzeyleri arasında anlamlı negatif korelasyonlar belirlendi ($p<0.01$). Yukarıdaki bulgulara ek olarak, B12 vitamin eksikliği tanısının konmasında, plazma MMA ölçümünün serum B12 ölçümüne göre 5.33 kat (%95 GA=1.62-17.49) daha fazla tanı koydurucu olduğu bulundu.

Sonuç: Çalışmamız, hem sağlıklı kontrollerde hem de potansiyel B12 vitamin eksikliği riski olan FKÜ grubunda, B12 vitamin düzeyleri referans değerler içinde olsa da fonksiyonel B12 vitamin eksikliğini olabileceğini göstermektedir. Ayrıca bu çalışma ile FKÜ'li olgularda ve sağlıklı çocuklarda MMA'nın B12 vitaminine göre daha yüksek tanı değeri ilk kez ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: B12 vitamini, metilmalonik asit, homosistein, fonksiyonel B12 vitamin eksikliği, fenilketonüri, çoklu reaksiyon izleme-sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (MRM-LC-MS/MS)

INVESTIGATION OF FUNCTIONAL VITAMIN B12 DEFICIENCY IN HEALTHY AND PHENYLKETONURIA CHILDREN WITH PLASMA METHYLMALONIC ACID AND HOMOCYSTEINE LEVELS

Merve AKIŞ

Dokuz Eylül University, Health Sciences Institute, 35340, İnciraltı, İzmir

ABSTRACT

Introduction and aim of study: Phenylketonuria (PKU) patients are at risk for functional vitamin B12 deficiency, based on their diet restricted of natural protein rich from phenylalanine. Elevated concentrations of methylmalonic acid (MMA) and/or homocysteine (Hcy), which are more sensitive functional markers of deficiency than vitamin B12 concentrations in the blood, are considered as measures of impaired intracellular vitamin B12 status. However, the diagnostic value of these parameters are not studied extensively. The aims of this study are to investigate functional vitamin B12 deficiency in treated PKU patients and healthy subjects as control group and to compare the diagnostic value of methylmalonic acid and vitamin B12 measurements in vitamin B12 deficiency.

Materials and methods: 31 PKU patients on phenylalanine-restricted diet and 26 healthy children aged 5-18 years were included in the study. Serum vitamin B12, ferritin and folate levels were determined by chemiluminescence immunoassay. Phenylalanine levels were measured by a fluorometric method. MCV values were studied with hemogram analyzer. HPLC was used for plasma Hcy assay. Plasma MMA was determined using a stable isotope dilution-multiple reaction monitoring liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SID-MRM LC-MS/MS) method. Accuracy, linearity, intra-assay and inter-assay precision, limit of detection and quantification, and recovery were evaluated to validate this method. Statistical analyses of data were performed using SPSS 15.0. Analyses were considered significant at $p < 0.05$.

Results: Accuracy for MMA assay calculated with calibration standards in the range of 0.05 to 2.5 $\mu\text{mol/L}$ was within $100 \pm 4\%$. The MMA assay was linear up to 100 $\mu\text{mol/L}$. Intra-assay and inter-assay CVs% were smaller than 4.0 and 6.0, respectively. The limit of

detection was 0.021 $\mu\text{mol/L}$ and limit of quantification was 0.085 $\mu\text{mol/L}$. Recoveries of MMA added to plasma samples with low and high levels of MMA were 87.6% and 86.4%, respectively. When PKU and control groups were compared in terms of vitamin B12 deficiency, no significant differences were found for serum vitamin B12, plasma MMA and Hcy concentrations between the groups. 12.9% of patients with PKU were found with low serum vitamin B12 concentrations. 29% of patients with PKU had elevated plasma MMA and 9.7% had high Hcy levels. In the controls, 30.7% and 11.5% had elevated also plasma MMA and Hcy levels, respectively. PKU patients had significantly elevated folate and MCV values than controls ($p < 0.01$). Regarding the correlations between the parameters investigated; in PKU patients, plasma Hcy were correlated with phenylalanine and MCV values and negatively correlated with folate ($p < 0.05$). In control group, we have found a positive correlation between plasma MMA and Hcy concentrations ($p < 0.05$). Taking data of PKU and control subjects together, plasma MMA and MCV were negatively related to serum vitamin B12 concentrations ($p < 0.01$). We have additionally found that, in vitamin B12 deficiency plasma MMA measurement is significantly 5.33 times (95% CI=1.62-17.49) more diagnostic than serum vitamin B12 measurement.

Conclusions: Our study clearly demonstrated that; even with serum vitamin B12 concentrations within reference ranges, functional vitamin B12 deficiency may be seen in both healthy subjects and PKU patients who are at risk for potential vitamin B12 deficiency. Additionally, the significantly higher diagnostic value of plasma MMA measurement compared to serum vitamin B12 in vitamin B12 deficiency, has been shown for the first time in PKU and healthy children.

Key words: Vitamin B12, methylmalonic acid, homocysteine, functional vitamin B12 deficiency, phenylketonuria, multiple reaction monitoring-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (MRM-LC-MS/MS)

1. GİRİŞ ve AMAÇ

B12 vitamini yalnızca mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve besinlerle alınması zorunlu esansiyel bir vitamindir (1). Başlıca iki enzimatik reaksiyonda koenzim olarak rol oynamaktadır. Bu reaksiyonlar, L-metilmalonil KoA'nın süksinil KoA'ya izomerizesyonu ve homosisteinin metiyonine remetilasyonudur (2). B12 vitamini insanlarda DNA sentezi, miyelin kılıfının oluşumu ve korunması, nörotransmitter sentezi ve eritropoez için gerekli bir mikronutrienttir (3).

B12 vitamini eksikliği dünyada yaygın bir problemdir. Özellikle çocuklarda ve yaşlılarda daha sık görülen B12 vitamini eksikliğinin insidansı yaşla birlikte artmaktadır (4). Gelişmiş ülkelerde çocuk ve adolesanlarda %1'den az görülmeyle birlikte, gelişmekte olan ve geri kalmış ülkelerde bu oran %40-80'dir. (5, 6). Ülkemizde ise çocuk ve adolesanlarda yapılan bir çalışmada B12 vitamin eksikliği prevalansı %5.9 olarak bildirilmiştir (7).

Malabsorbsiyondan sonra B12 vitamin eksikliğinin en sık görülen nedeni, diyetle yetersiz alımıdır. Özellikle vejeteryanlar ve fenilalanin kaynaklarından kısıtlı diyet alan fenilketonüri (FKÜ) hastaları diyetsel alım yetersizliği nedeniyle ortaya çıkan B12 vitamin eksikliği riski altındadırlar. Dünyada ve özellikle ülkemizde sık görülen kalıtsal bir hastalık olan FKÜ tedavisinde en geçerli ve geleneksel yöntem, fenilalaninden zengin doğal proteinlerin kısıtlandığı, aynı zamanda büyüme ve gelişme için gerekli olan mikronutrientlerin yeterli alımını sağlayacak amino asit karışımları ile desteklendiği bir diyet uygulamasıdır (8). Ancak, FKÜ diyet tedavisinin bir parçası olan bu amino asit karışımlarının biyoyararlılığı konusunda yeterli bilgi bulunmamaktadır (9, 10). Diğer yandan, özellikle adolesan ve yetişkinlik döneminde hastalar diyet tedavisine tam olarak uymamaktadır. Bu nedenle kısıtlı diyet tedavisi uygulanan FKÜ hastalarında B12 vitamin eksikliği görülebilmektedir (11-16).

Klinik olarak B12 vitamini eksikliği başlıca hematolojik ve nöropsikiyatrik bozukluklarla ortaya çıkmaktadır. Nörolojik komplikasyonlar hematolojik bozukluklardan yıllarca önce meydana gelebilir, hatta bazen hematolojik bulgular olmaksızın sadece minör nörolojik bulgular gözlenebilir. Bu nedenle B12 vitamin eksikliğinin erken aşamada belirlenmesi ve tedavi edilmesi toplum sağlığı açısından son derece önemlidir (3, 4).

B12 vitamin eksikliğinin belirlenmesinde serum B12 vitamini yaygın olarak ölçülmekte olan bir parametredir. Ancak B12 vitamini ölçümünün tanısal etkinliği, sınırlı özgüllük ve duyarlılığı nedeniyle halen sorgulanmaktadır. B12 vitaminin doku durumunu gösteren

metilmalonik asit (MMA) ve homosistein (Hcy), B12 vitamini eksikliğinin klinik belirti göstermeyen erken değişikliklerini yansıtan fonksiyonel biyobelirteçleridir. Serum B12 vitamin düzeyleri referans aralık içinde olduğu durumda dahi, bu fonksiyonel biyobelirteçlerin konsantrasyonları artabilir. Hcy duyarlı bir parametre olmasına karşın, folik asit ve B6 vitamin düzeylerinden de etkilenmesi nedeniyle sınırlı özgüllüktedir. MMA ise yalnızca B12 vitamininden etkilendiği için daha duyarlı ve özgül bir belirteçtir. Düşük normal vitamin B12 düzeyleri ile görülen subklinik B12 vitamini eksikliğinin değerlendirilmesinde, dolaşımdaki düzeyi yansıtan B12 vitamini ile birlikte doku düzeyini gösteren MMA ölçümü de önerilmektedir (17, 18). Klinik laboratuvarlarda vücut sıvılarındaki MMA kantasyonu için kullanılan sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometri (LC-MS/MS) görece basit metodolojik uygulamaları ve daha yüksek analitik duyarlılık ve özgüllüğü nedeniyle giderek kullanılan diğer tekniklerin yerini almaktadır (19).

Diyet tedavisi alan FKÜ hastalarında B12 vitamini eksikliğini gösteren az sayıda çalışma bulunmaktadır (11-13, 15, 16). Bu çalışmaların çoğunda B12 vitamin eksikliğinin belirlenmesinde sadece serum B12 vitamin konsantrasyonları ölçülmüştür (11-13). Son çalışmalarda ise B12 vitamin eksikliği, B12 vitamin ölçümüne göre daha duyarlı ve özgül fonksiyonel biyobelirteçler olan MMA ve Hcy konsantrasyonları ile gösterilmiştir (15, 16). FKÜ'li hastalarda B12 vitamin eksikliğini değerlendiren bu çalışmaların çoğunda sadece FKÜ'li hastalar arasında değerlendirme yapılmış olup ve kontrol grubu kullanılmamıştır, ayrıca MMA konsantrasyonlarının belirlenmesinde gaz kromatografisi-kütle spektrometri (GC-MS) tekniğinden yararlanılmıştır (11-13, 16). Yapılan literatür incelemesinde, FKÜ hastalarında ve sağlıklı çocuklarda MMA'nın B12 vitamin eksikliğini belirlemedeki tanisal değerini araştıran bir çalışmaya da rastlanmamıştır.

Bu çalışmada fenilalaninden kısıtlı diyet alan fenilketonüri hastalarında ve sağlıklı kontrollerde B12 vitamin eksikliğinin belirlenmesi amacıyla B12 vitamin ölçümünün yanı sıra MCV ve fonksiyonel biyobelirteçler olan MMA ve Hcy düzeyleri incelenecektir. Bu parametrelerin yanı sıra fenilalanin, folik asit, ferritin ve hemogram ölçümü de yapılacaktır.

Bu bilgilerin ışığı altında planlanan çalışmanın amaçları;

- 1) LC-MS/MS ile stabil izotop işaretli internal standart kullanılarak çoklu reaksiyon izleme (SID-MRM) modunda gerçekleştirilecek olan plazma MMA ölçümünün laboratuvarımız koşullarında optimize edilmesi ve yöntem geçerlilik çalışmalarının yapılması,
- 2) Fenilalaninden kısıtlı diyet alan fenilketonüri hastalarında, fonksiyonel biyobelirteçler olan MMA ve Hcy aracılığı ile B12 vitamin eksikliğinin araştırılması ve sağlıklı kontroller ile karşılaştırılması,
- 3) Fenilketonüri hastalarında ve sağlıklı kontrollerde, B12 vitamin eksikliğinin fonksiyonel biyobelirteci olan MMA ölçümünün geleneksel olarak kullanılan serum B12 vitamin ölçümüne göre tanısal değerinin araştırılmasıdır.

Bu araştırmanın hipotezi; fenilalaninden kısıtlı diyet alan FKÜ hastalarında ve sağlıklı kontrollerde B12 vitamin eksikliğinin belirlenmesinde fonksiyonel biyobelirteçler olan plazma MMA ve Hcy düzeylerinin ölçümünün, serum B12 vitamin ölçümü ile belirlenemeyen fonksiyonel eksikliği yansıtmadır. Fonksiyonel B12 vitamin eksikliğinin diyetle uyum göstermeyen FKÜ hastalarında diyetle uyanlara göre daha fazla görüleceği düşüncesindeyiz. Ayrıca, B12 vitamin eksikliğinin erken aşamada belirlenmesi amacıyla subklinik B12 vitamin eksikliği durumunda MMA ve Hcy ölçümünün tanıyı aydınlatmada yararlı olacağı görüşündeyiz.

2. GENEL BİLGİLER

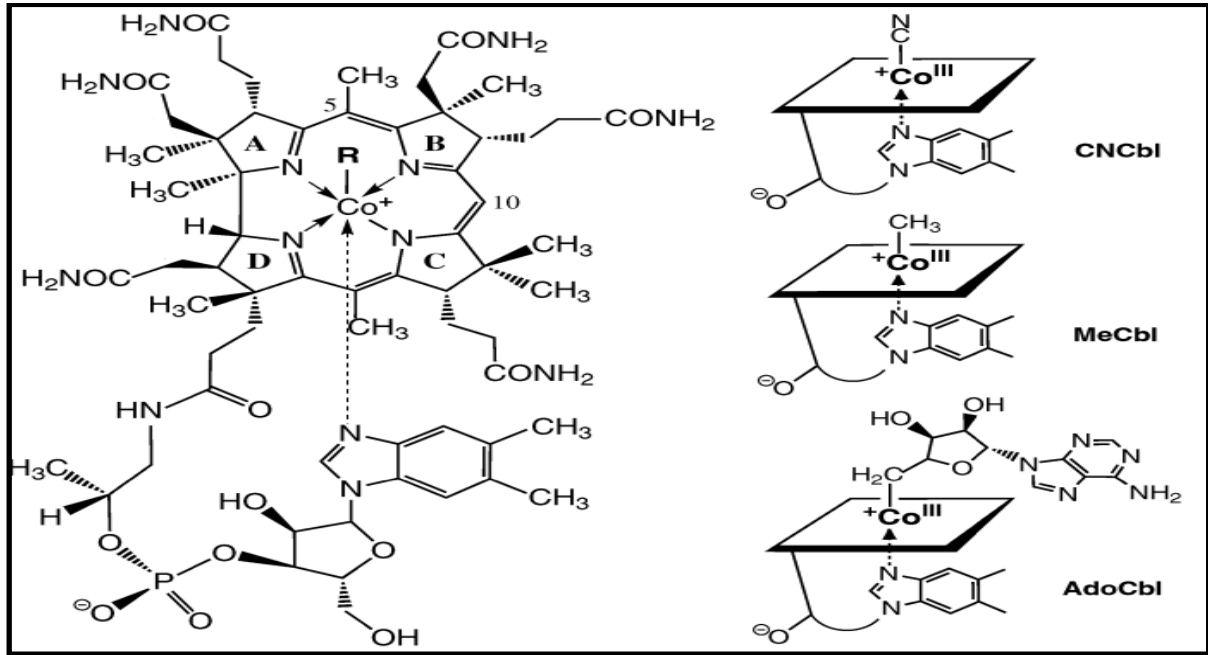
2.1. B12 VİTAMİNİ

2.1.1. B12 Vitamininin Tanımı ve Tarihçesi

Kobalamin (Kbl) olarak da bilinen B12 vitamini, yalnızca mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve suda eriyen bir vitamindir. 1355.42 Da moleküler ağırlığı ile B kompleks vitaminlerinin en büyük ve en son izole edilen üyesidir. 1926 yılında Minot ve Murphy tarafından pernisiyöz aneminin karaciğer ekstraktı ile tedavi edilebileceğinin gösterilmesinden sonra, B12 vitamini ilk kez 1947 yılında İngiltere’de Dr. E. Lester Smith tarafından karaciğerden izole edilmiştir. Kırmızı renkli kristal bir bileşiktir (20, 21).

2.1.2. B12 Vitamininin Moleküler Yapısı

B12 vitamininin yapısı ilk kez 1955 yılında Hodgkin ve arkadaşları tarafından X-ray kristalografisi kullanılarak aydınlatılmıştır (22). Yapısı oldukça karmaşık olan B12 vitamini üç bölümden oluşur (Şekil 1) (23-25).



Şekil 1. B12 vitamini ve bazı formlarının yapısal formülü (26)

Korrin halka yapısı: Merkezi bir kobalt atomuna dört adet tetrapirrol halkasının bağlanması ile oluşan çekirdek kısımdır. Kobalt atomu pirol halkalarının azot atomlarına koordine haldedir. Hemoglobindeki “hem” yapısına benzeyen korrin halkasında hemden farklı olarak, merkezde kobalt atomu (hemdeki demir atomu) ve üç α -meten köprüsü bulunmaktadır. Merkezdeki kobalt atomu (Co) tam okside durumda Co^{+3} , Co^{+2} durumunda ya da tam redükte durumda Co^{+1} bulunabilir.

α -aksiyel ligand: Düzlemin altında kalan ve kobalt atomunun bir koordinat bağıyla bağlı olduğu değişik türde bir nükleotid grubudur. Bilinen nükleotid yapısından farkı, baz olarak 5,6-dimetilbenzimidazol bulunmasından ileri gelmektedir. Benzimidazol bir azot atomuyla kobalta bağlı iken, bir azot atomuyla α -N-glikozidik bağı aracılığıyla riboza bağlanmıştır.

β -aksiyel ligand: B12 vitamininin çeşitli formları, düzlemin üstünde kalan ve korrin kompleksinin merkezindeki kobalt atomuna bağlanan R grubuna göre isimlendirilir. Bu gruptan yoksun olan kısma kobalaminler adı verilir.

2.1.3. B12 Vitamininin Formları

B12 vitamininin hücre metabolizmasında önemli olan dört formu bulunmaktadır (2, 20, 27).

Siyanokobalamin (CNKbl): B12 vitamininin ilk bulunan formudur, yapısında R grubu olarak siyanür ($-CN$) bulunur. Bu form doğal olarak oluşmaz, besinsel takviyelerde ve zenginleştirilmiş gıdalarda yaygın olarak kullanılan sentetik ve stabil formdur. Tüm memeli hücrelerinde alındıktan sonra biyolojik olarak aktif formlara dönüştürülür. Bakteriyel kobalaminin saflaştırılmasının bir ürünüdür.

Hidroksikobalamin (OHKbl): Yapısında R grubu olarak hidroksil ($-OH$) bulunur. Doğal olarak oluşan kobalamin formlarından biridir. Biyolojik olarak aktif değildir. Tüm memeli hücrelerinde biyolojik olarak aktif formlara dönüştürülür.

Metilkobalamin (MeKbl): Yapısında R grubu olarak metil ($-CH_3$) bulunur. Doğal olarak oluşan kobalamin formlarından biridir. Çoğunlukla serumda bulunan ve biyolojik olarak aktif koenzim olan formdur. Metilkobalamin bazı vitamin ilavelerinde de bulunur.

Adenozilkobalamin (AdoKbl): Yapısında R grubu olarak 5'-deoksiadenozil bulunur. "Koenzim B12" olarak da bilinmektedir. Doğal olarak oluşan kobalamin formlarından biridir. Çoğunlukla sitozolde bulunur ve biyolojik olarak aktif koenzim formudur.

2.1.4. B12 Vitamininin Besinsel Kaynakları

B12 vitamini sadece bakteriler, mantarlar ve yosunlar tarafından sentezlenebilir; mayalar, bitkiler, hayvanlar ve insanlar sentezleyemezler. İnsanlar için B12 vitamin kaynağı tamamen diyetel alıma bağıdır. İnsanların diyetindeki B12 vitamini sadece hayvansal kaynaklı gıdalarda yaygın olarak bulunur. Bu gıdalardaki B12 vitamini hayvanların barsaklarında ve işkembelerinde bulunan bakteriler tarafından sentezlenir. Zengin B12 kaynakları, hayvan organ etleri (özellikle karaciğer ve böbrek), balık, mantar, yumurta, süt ve süt ürünleridir. Bitkisel kaynaklı gıdalar normalde B12 vitamini içermezler, ancak fermante ürünlerde veya bakteriyel kontaminasyona bağı olarak çok küçük miktarlarda bulunabilir. Hayvanlarda B12 vitamini, bakteriyel sentez dışında mikrobiyal kontaminasyonlu bitkilerin veya kobalamin içeren hayvansal dokuların alınması ile de sağılanır (2, 25, 28).

B12 vitamini besinlerde birkaç formda bulunmaktadır. Et ve balık çoğunlukla adenozilkobalamin ve hidrosikobalamin içerirken, süt ürünlerinde bu formların yanısıra metilkobalamin de bulunur. Sütte diğer formlara kıyasla daha fazla hidrosikobalamin bulunmaktadır. Siyanokobalamin yalnızca yumurta beyazı, peynir ve haşlanmış mezzit balığında küçük miktarlarda bulunur (2).

2.1.5. B12 Vitamininin Günlük Alınması Gereken Miktarları

Tablo 1'de çocuk ve erişkin gruplarına, hamilelik ve laktasyon durumlarına göre günlük alınması önerilen B12 vitamin miktarları gösterilmiştir. RDA (Önerilen Günlük Miktar); ABD tarafından 1989 yılında hazırlanan yönerge dir. DRI (Diyetel Referans Alım) ise 1998 yılında hazırlanan ABD ve Kanada tarafından önerilen daha yeni bir yönerge dir.

RDA'ya göre dokuz yaşına kadar artan miktarda, dokuz yaşından sonra ise 2 µg/gün alınması önerilmektedir. DRI'ya göre 14 yaşına kadar artan miktarda, 14 yaşından büyük kişilerde ise günlük 2.4 µg'dır. Hamilelik ve laktasyon durumunda ise fizyolojik miktarların üzerinde alınması gerekmektedir. Herhangi bir emilim bozukluğu sendromu olan kişilerin

daha fazla miktarda B12 vitamini almaları önerilmektedir. B12 vitamin kaynaklarını tüketmeyen vejeteryan annelerin sütünde çok az miktarda B12 vitamini bulunur. Bu nedenle vejeteryan annelerin bebekleri B12 vitamin takviyesi almalıdır (29, 30).

Tablo 1. Yaş gruplarına göre günlük önerilen B12 vitamini miktarları

Yaş (yıl)	RDA (µg/günlük)*	DRI (µg/günlük)**
0-6 ay	0.3	0.4
7-12 ay	0.5	0.5
1-3	0.7	0.9
4-8	1.0	1.2
9-13	2.0	1.8
14-18	2.0	2.4
19-50	2.0	2.4
> 50	2.0	2.4
Hamilelik	2.2	2.6
Laktasyon	2.6	2.8

***RDA:** Recommended Dietary Allowances, 1989

****DRI:** Dietary Reference Intakes, 1998

Literatürde B12 vitamininin günlük 100 µg'a kadar oral alımına bağlı olarak ortaya çıkan herhangi bir zehirlenme olgusuna rastlanmamıştır. Diğer yandan, B12 vitamin eksikliği saptanmamış kişilerde yüksek miktarlarda B12 alımından ek bir yarar sağlanmadığı bildirilmiştir (29).

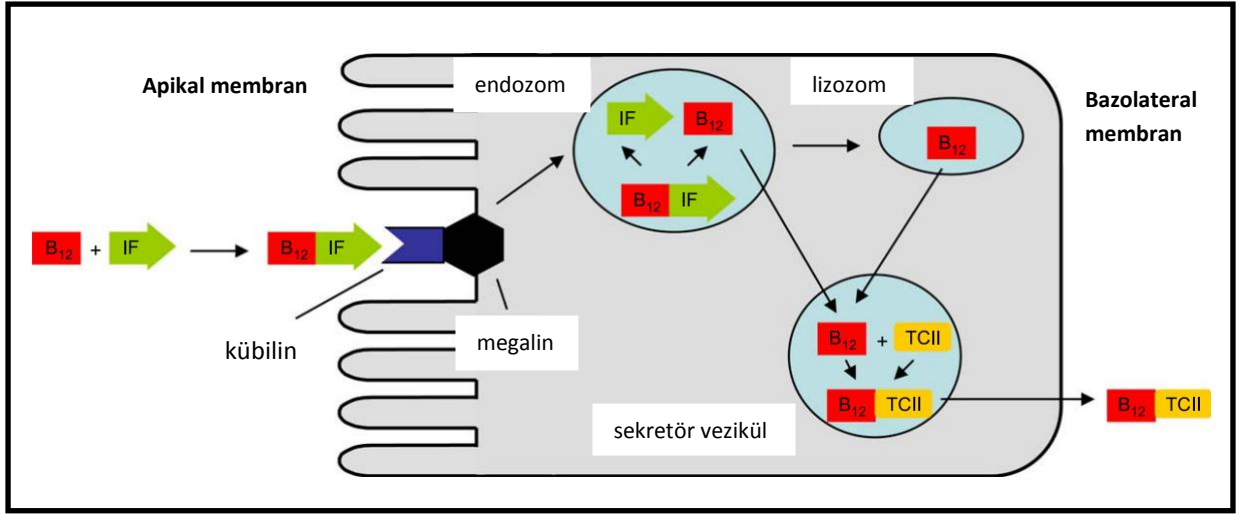
2.1.6. B12 Vitamininin Biyoyararlanımı

İnsan kalın barsağında B12 vitamininin mikrobiyal sentezi olmasına rağmen, bu B12 vitamini emilemez. Diyet ile alınan B12 miktarı arttıkça intestinal emilim yüzdesi azalır. 0.5 µg ya da daha az alımlarda B12 vitamininin yaklaşık %70'i emilir. 5 µg alındığında ortalama %28'i (%2-50), 10 µg alındığında ise yaklaşık %16'sı (%0-34) emilmektedir. 1000 µg veya daha fazla B12 vitamini alındığında emilimin etkinliği %1'e düşer ve aşırı B12 vitamini idrar ile atılır (24).

2.1.7. B12 Vitamininin Sindirim, Emilim ve Taşınması

B12 vitamini sindirim, emilim ve metabolizması oldukça karmaşıktır. Özellikle bazı taşıyıcı proteinlerle ilgili henüz açıklığa kavuşmamış noktalar mevcuttur (31). B12 vitamini gıdalarda proteine bağlı olarak bulunur. Proteine bağlı B12 vitamini midedeki pepsin ve gastrik asit aracılığıyla proteinden ayrılır. Serbest kalan B12 vitamini mide ve tükürük bezlerinden salgılanan 60 kDa ağırlığındaki bir glikoprotein olan *haptokorrine (HC)* bağlanır. *R-proteinler* olarak da adlandırılan HC, B12 vitaminini kimyasal yıkımdan korur. Midede hidroklorik asit salgılayan parietal hücreler, *intrensek faktör (IF)* olarak bilinen 45 kDa ağırlığında spesifik bir glikoprotein de salgırlar. Ancak IF, HC varlığında B12 vitaminine zayıf olarak bağlanır. Haptokorrin-B12 vitamin kompleksi ve serbest IF mideyi terk ederek duodenuma geçerler. Duodenumda pankreas kökenli proteazlar, özellikle tripsin, HC'ı parçalayarak B12 vitaminini serbest hale getirir. IF ince barsağın alkali pH'ında serbest kalan B12 vitaminine sıkıca bağlanır. IF-B12 vitamini kompleksi distal ileumdaki spesifik enterosit reseptörlere (kübilin) bağlanarak endositoz ile mukozal hücrelerden emilir ve daha sonra IF, B12 vitamininden ayrılır (**Şekil 2**). Serbest kalan B12 vitamini *transkobalamin I ve II (TC I ve TC II)* taşıyıcı proteine bağlanır ve dolaşıma katılır (2, 32, 33).

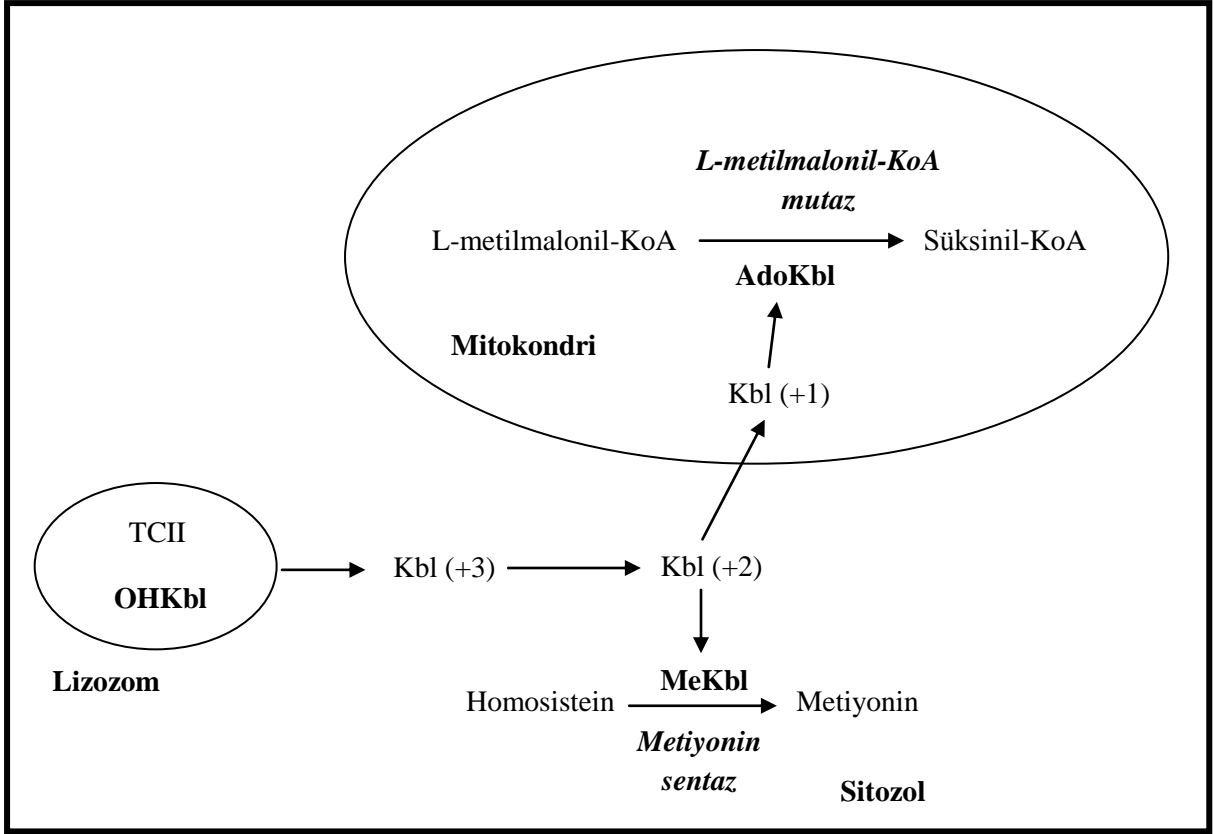
Dolaşımdaki B12 vitamininin büyük kısmı (%75-90) TC I'e bağlıdır. TC I'in hücelere B12 vitamini alınmasında fizyolojik rolü yoktur. Dolaşımdaki B12 vitamininin az bir kısmı (%10-25) TC II'ye bağlıdır. TC II, B12 vitaminini vücuttaki tüm dokulara taşımakla görevlidir. Bu sebeple metabolik olarak aktif B12 vitaminini gösterir. TC II-B12 vitamin kompleksi (holotranskobalamin, holoTC) karaciğer, kemik iliği ve diğer hücreler tarafından reseptör-aracılı endositoz ile hücre içine alınarak lizozomal enzimler tarafından yıkıma uğratılır. B12 vitamini hidroskobalamin formunda serbestleşerek sitoplazma içine salınır (**Şekil 2**) (2, 34).



Şekil 2. B12 vitamininin intestinal emilimi (1)

2.1.8. B12 Vitamininin Emilim Sonrası Metabolizması

Hidroksikobalamin hücre içinde aktif koenzim formları olan adenzilkobalamin (AdoKbl) ve metilkobalamine (MeKbl) dönüştürülür (Şekil 3). Hidroksikobalamin'in bu formlara dönüştürülmeden önce merkezi Co^{+3} atomunun indirgenmesi gerekmektedir. AdoKbl için ilk adım sitozolde gerçekleşir ve Co^{+3} atomu Co^{+2} atomuna indirgenir. Daha sonra mitokondri içine alınarak Co^{+1} atomuna indirgenir. AdoKbl mitokondriyal *L-metilmalonil-KoA mutaz*'ın kofaktörüdür. *L-metilmalonil-KoA*'nın süksinil-KoA'ya izomerize olmasında görev alır. MeKbl için ise sadece sitozolde Co^{+2} indirgenme basamağı gerçekleşir. Bu form, sitozolik bir enzim olan *metiyonin sentaz*'ın kofaktörüdür ve homosisteinden metiyoninin sentezlenmesinde görev alır (33).



Şekil 3. Kobalaminin hücre içi metabolizması (33)

2.1.9. B12 Vitamininin Depolanması ve Atılımı

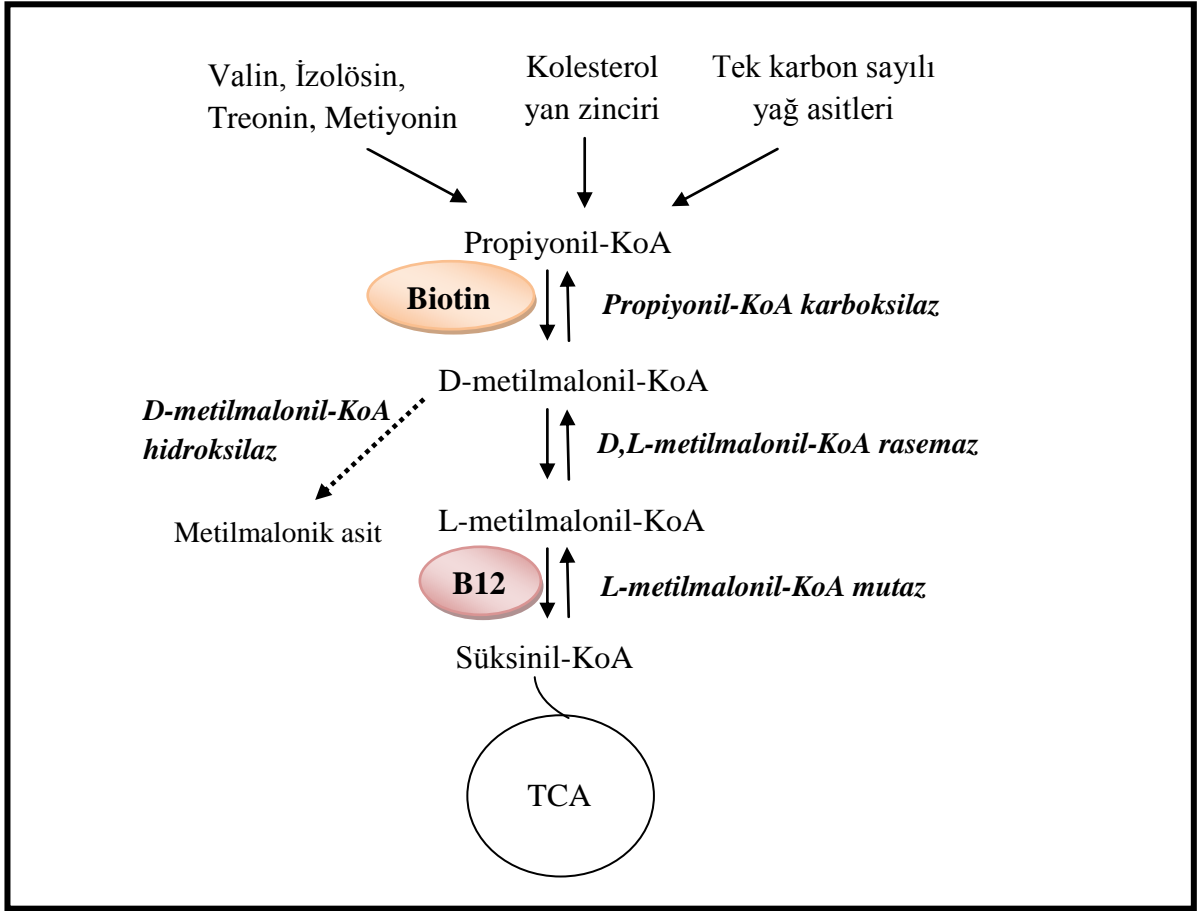
Diğer suda çözünen vitaminlerin aksine, B12 vitamini ana form olarak AdoKbl şeklinde karaciğerde depolanır. Yetişkin bir kişide, B12 vitamininin vücuttaki toplam miktarı yaklaşık 2-5 mg olup, %80'i karaciğerde depolanır. Karaciğerde depolanan miktar yaş ile artış gösterir. 20 ile 60 yaşları arasında fark iki kattan daha fazladır. Depolanan B12 vitamininin geri kalan kısmı kas, deri ve plazmada bulunur. B12 vitamininin yalnızca 2-5 µg kadarı metabolik döngü sebebiyle günlük olarak kaybedilir. Kobalaminin günlük yaklaşık 0.5-5 µg kadarı safra yoluyla jejunuma salınır, ileumda bunun en az %65-75'i geri emilerek enterohepatik dolaşıma girer. Safraya atılan B12 vitamininin geri emilimi için intrinsek faktör gereklidir. İntrinsek faktör yokluğunda tüm B12 vitamini feçes ile atılır. Emilim bozukluğu olan kişilerde 2-3 yıl içinde B12 vitamin eksikliğinin işaretleri gelişir (2).

2.1.10. B12 Vitamini'nin Biyokimyasal Fonksiyonu

B12 vitamini başlıca iki enzimatik reaksiyonda koenzim olarak rol oynamaktadır. Bu reaksiyonlardan birincisi propiyonil-KoA katabolizmasında görev alan L-metilmalonil-KoA mutazın (EC 5.4.99.2) katalizlediği metilmalonil-KoA'nın süksinil-KoA'ya dönüşüm basamağıdır; diğeri ise homosistein metabolizmasında, metiyonin sentaz (EC 2.1.1.13) tarafından katalizlenen homosisteinin metiyonine remetilasyonunun gerçekleştiği basamaktır (2).

2.1.10.1. D-metilmalonil-KoA metabolizması

D-metilmalonil-KoA, bazı amino asitlerin (valin, lösin, metiyonin, treonin) karbon iskeletinin yıkılması, tek karbon sayılı yağ asitlerinin β -oksidasyonu ve kolesterol yan zincirinin yıkımı sonucu oluşan propiyonil-KoA'nın katabolizmasında metabolik bir ara üründür (2, 35). Propiyonil-KoA'nın D-metilmalonil-KoA'ya dönüşümü biyotin bağımlı bir enzim olan *propiyonil-KoA karboksilaz* tarafından gerçekleşir. D-metilmalonil-KoA *D,L-metilmalonil-KoA rasemaz* enziminin katalizlediği rasemizasyon reaksiyonu ile L-metilmalonil-KoA'ya dönüşür. Koenzim olarak adenzilkobalamin formundaki B12 vitamini gerektiren bir enzim olan *L-metilmalonil-KoA mutaz*, L-metilmalonil-KoA'nın trikarboksilik asit döngüsünün önemli bir ara ürünü olan süksinil-koA'ya izomerizasyonunu sağlar. B12 vitamini eksikliği ya da kalıtsal L-metilmalonil-KoA mutaz yetersizliği, D-metilmalonil-KoA'nın *D-metilmalonil-KoA hidroksilaz* enzimi aracılığıyla metilmalonik asite (MMA) dönüşerek dokularda birikmesine yol açar (**Şekil 4**) (33, 36, 37).



Şekil 4. D-metilmalonil-KoA metabolizması (36)

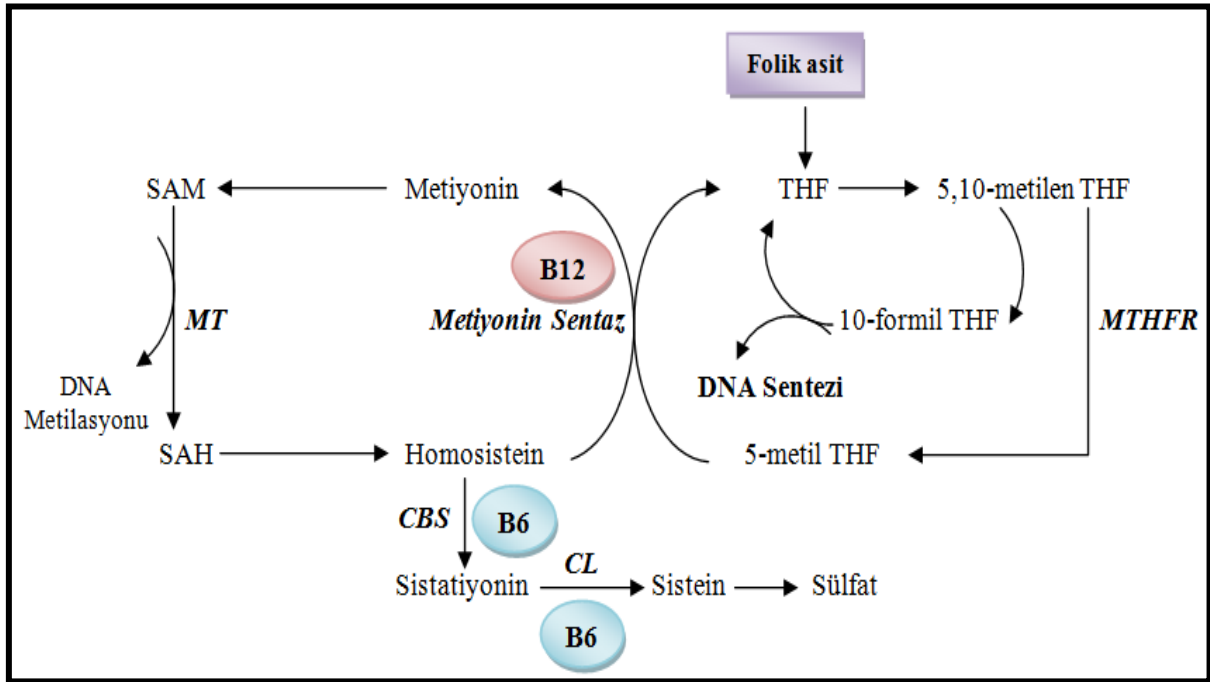
2.1.10.2. Homosistein metabolizması

Homosistein (Hcy), S-adenozilmetiyonin (SAM) bağımlı metilasyon reaksiyonları sırasında metiyonin amino asidinden oluşmaktadır (Şekil 5). Homosisteinin metiyonine remetilasyonu *metiyonin sentaz* tarafından katalizlenir. Metiyonin sentaz bu dönüşüm için kosubstrat olarak 5-metil tetrahidrofolata (5-metil THF) ve koenzim olarak B12 vitamininin metilkobalamin (MeKbl) formuna gereksinim duyar. Bu reaksiyonda 5-metil THF metil grubu donörü, koenzim B12 ise metil grubunun aracı akseptörüdür. Metabolizmada metiyonin sentazın iki önemli rolü bulunmaktadır. Birincisi, vasküler hastalıklar, inme ve bazı kanserler için bir risk faktörü olan homosisteinin dokularda ve serumda birikmesini önlemektir. İkincisi, protein sentezinde ve SAM oluşumunda gerekli olan metiyonini üretmektir (36-39).

B12 vitamini eksikliği durumunda metiyonin sentaz aktivitesi azalır. Bu durum metiyonin ve THF sentezininin azalmasına, homosistein ve 5-metil THF birikimine neden

olur. THF'daki bu azalma, DNA sentezi için deoksiüridin monofosfatın (dUMP) deoksitimidin monofosfata (dTMP) dönüşümünde gerekli olan 5,10-metilen THF'ın azalmasına yol açar. Metiyonin sentezindeki azalma ise SAM üretimini azaltır. SAM, normalde 5,10-metilen THF redüktaz enzimini baskılar. SAM üretimindeki bozukluk bu baskılamayı azaltarak 5,10-metilen THF'ın 5-metil THF'a dönüşümünü artırır. Redüktaz reaksiyonunun *in vivo* olarak geri dönüşümsüz olması ve MeKbl eksikliğinden dolayı metiyonin sentazın inaktif duruma geçmesi nedeniyle 5-metil THF metabolik olarak yakalanmış olur. Bu olaylar dizisi "metil tuzağı hipotezi" olarak bilinir (2).

Alternatif olarak, homosistein transsülfürasyon yolu ile de metabolize olmaktadır. Transsülfürasyon yolunda, homosistein B6 vitaminine bağımlı ardışık iki reaksiyon ile sisteine dönüşür (Şekil 5) (37).



Şekil 5. Homosistein metabolizması

SAM: S-adenozilmetiyonin, **SAH:**S-adenozilhomosistein, **MT:**Metil transferaz, **THF:**Tetrahidrofolat, **MTHFR:** Metilentetrahidrofolat redüktaz, **CBS:** Sistatyonin β sentetaz, **CL:** Sistatyonin γ liyaz

2.2. B12 VİTAMİN EKSİKLİĞİ

2.2.1. B12 Vitamin Eksikliğinin Prevalansı

B12 vitamin eksikliği dünyada yaygın bir problemdir (6). Prevalansının genel popülasyonda %20 civarında olduğu belirtilmektedir (40). Ülkemizde ise çocuk ve adolesanlarda yapılan bir prevalans çalışmasında %5.9 olarak bildirilmiştir (7). Gelişmekte olan ve geri kalmış ülkelerde bu oran çocuklarda %40 ila %80 arasında değişmektedir (6). B12 vitamini eksikliği insidansı ise yaşla birlikte artmaktadır (4). B12 vitamin eksikliğinin prevalansı B12 vitamini ölçümü için kullanılan metoda ve referans aralıklarına bağlı olarak değişmektedir (36, 41, 42).

2.2.2. B12 Vitamin Eksikliğinin Nedenleri

B12 vitamin eksikliğinin nedenleri besinsel eksiklik, malabsorpsiyon ve B12 vitamini emilim ve taşınmasına ait kalıtsal hastalıklar olmak üzere başlıca üç grupta toplanabilir.

Besinsel Eksiklik: B12 vitamininin diyetel kaynakları başlıca et ve süt ürünleridir. Batı diyetindeki ortalama B12 vitamini miktarı (5-15 µg/gün) günlük önerilen diyetel alım miktarından (2 µg) daha fazladır. Katı vejeteryan diyet yapanların dışında, B12 vitamin eksikliğinin varlığı kişide bir emilim bozukluğunun olduğunu gösterir. Vücutta B12 vitamininin büyük kısmı (2-5 mg) depolanır. Bu nedenle, ciddi malabsorpsiyon durumunda bile 2-5 yıl sonra B12 vitamin eksikliği gelişir. Çocuklar, yaşlılar, kronik alkolikler, katı vejeteryanlar ve proteinden kısıtlı diyet alan fenilketonüri hastaları B12 vitamini besinsel eksikliği açısından yüksek risk altındadırlar (43, 44).

Malabsorpsiyon: B12 malabsorpsiyonuna yol açan klasik bozukluk pernisiyöz anemidir. Pernisiyöz anemi gastrik pariyetal hücreleri etkileyen otoimmün bir hastalıktır. Çoğu pernisiyöz anemi olgusunda, pariyetal hücrelere karşı antikolar üretilir. Bu hücrelerin yok olması IF üretimini ve HCl salınımını azaltarak B12 vitamininin emilimini kısıtlar. Pariyetal hücre antikolarlarının varlığı pernisiyöz aneminin teşhisi için yaklaşık %85-90 duyarlılığa sahiptir. Fakat pariyetal hücre antikolarları spesifik değildir ve diğer otoimmün hastalıklarda da görülmektedir. IF antikoları ise %50 duyarlılığa sahip olmasına rağmen pernisiyöz aneminin teşhisi için çok daha özgüdür (4, 27, 32).

Besin-kobalamin malabsorpsiyon sendromu, ilk kez 1995 yılında Carmen tarafından özellikle “bağlanmamış” kobalamin emiliminin normal kaldığı hipoklorhidri varlığında besin ya da intestinal transport proteinlerinden kobalaminin ayrılmasındaki yetersizlik olarak tanımlanmıştır (45). Besin-kobalamin malabsorpsiyonunun başlıca sebebi HCl ve pepsinojenin gastrik sekresyonunun azaldığı kronik atrofik gastrittir (36). Atrofik gastrik prevalansı pariyetal hücrelerin HCl salgılama yeteneğine bağlı olarak yaş ile birlikte artar (45). Bu durum B12 vitamin malabsorpsiyonunun neden artan yaş ile daha sık görüldüğünü iyi bir şekilde açıklayabilir (46). *Helicobacter pylori* enfeksiyonu kronik atrofik gastritin ana nedeni olarak kabul edilir. Sanayileşmiş ülkelerde 60 yaş üzerindeki kişilerin yaklaşık %50’sini etkilerken, gelişen ülkelerde bu oran daha yüksektir (46).

Eksikliğin diğer nedenleri, bakteriyal büyüme, pankreatik yetersizlik, Zollinger-Ellison sendromu, ileal hastalıklar, asiditeyi azaltan ajanların (proton pompa inhibitörleri ve H2 reseptör antagonistleri) ve ileal mukoza veya membran reseptörleri üzerinde etkileri olan bazı ilaçların (kolşisin, metformin) kullanılmasıdır (4, 36, 47, 48). **Tablo 2**’de malabsorpsiyonun nedenleri ve patofizyolojileri verilmiştir.

Tablo 2. Kobalamin malabsorpsiyonunun nedenleri (48)

Neden	Patofizyolojisi
Pernisiyöz anemi, Atrofik gastrit	Parietal hücre kaybı: IF eksikliği
Kısmi ya da tam gastrektomi	Asit üretiminin yoksunluğu ve besin proteinlerinin azalmış parçalanması
Pankreatik yetersizlik	Pankreatik proteazların eksikliği nedeniyle HC-Kbl parçalanmasında yetersizlik
Zollinger-Ellison sendromu	Düşük intraluminal pH nedeniyle HC’den IF’e kobalaminin bozulmuş transferi
Bakteriyal büyüme	Patojenlerin diyetel kobalamin için yarışması
İleal hastalıklar, Cerrahi rezeksiyon	Kübilin kaybı
Bazı ilaçlar	Azalan asidite ve mukoza veya reseptör defekti

IF: intrensek faktör, **HC:** haptokorrin

Kalıtsal Hastalıklar: Nadir rastlanan kalıtsal malabsorpsiyon bozukluklarının nedenleri ve patofizyolojileri **Tablo 3**'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Kobalamin malabsorpsiyonunun kalıtsal bozuklukları (48)

Tip	Tanımı	Etkilenen molekül	Patofizyolojisi
1	IF sentezinin yokluğu ya da IF fonksiyon bozukluğu yüzünden IF-Kbl kompleksinin oluşmasında veya fonksiyonunda bozukluk	IF	Kbl'in IF'ye bağlanamaması ve hem serbest Kbl hem de HC bağlı Kbl'in ileal reseptörler tarafından tanınamaması
2	Kübilin'deki defektler yüzünden IF-Kbl kompleksinin alınamaması veya alımının azalması	Kübilin	İleal hücreler içine Kbl girişinin azalması ya da girişinin olmaması
3	Asidik veziküllerin (endozomlar ve lizozomlar) dışına Kbl transportunun yetersizliği	Lizozomal taşıyıcı	Kbl'in ileal hücreler içinde kalması ve TC II'ye bağlanamaması
4	TC II sentezinin yokluğu ya da Kbl'e bağlanamayan TC II fonksiyon bozukluğu yüzünden dolaşıma katılan Kbl yetersizliği	TC II	Kbl'in ileal hücrelerden çıkışında başarısızlık

Kbl: kobalamin, **IF:** intrinsek faktör, **HC:** haptokorrin, **TC II:** transkobalamin II

2.2.3. B12 Vitamin Eksikliğinin Klinik Belirtileri

B12 vitamininin en önemli temel fonksiyonu folik asit ile birlikte hücre bölünmesi ve çoğalması için gerekli DNA sentezini desteklemektir. Bu vitaminlerin eksikliğine en fazla duyarlı olan sistem, hücre çoğalma hızının en yüksek olduğu hematopoietik sistemdir. B12 vitamini kemik iliğinde eritrosit yapımı ile görevli normoblastların normal gelişimi ve bölünmesi için gereklidir. İkinci önemli etkisi ise, santral ve periferik sinir sistemindeki bazı nöronların normal yapı ve fonksiyonlarını sürdürmelerini sağlamaktır. B12 vitamini ayrıca nörotransmitterlerin sentezi ve eritropoez için de önemlidir (3, 49).

Vücutta büyük miktarda B12 vitamin depolarının bulunması nedeniyle eksiklik bulguları birkaç yıl sonra ortaya çıkmaktadır. B12 vitamin eksikliği; depoların azalması, metabolik-fonksiyonel eksiklik ve klinik bulgular olmak üzere birkaç aşamada gelişir. Klinik olarak B12 vitamin eksikliği başlıca hematolojik ve nöropsikiyatrik bozukluklar olarak ortaya çıkmaktadır. Diğer belirtileri ise kardiyovasküler ve gastrointestinal sistem ile ilgilidir (3, 4, 30, 36).

Hematolojik belirtiler: Kan ve kemik iliği hücrelerindeki morfolojik değişimler B12 vitamin eksikliğinin ana bulguları arasındadır. Çünkü bu hücreler yüksek turnover hızına sahip, hızlı hematopoez gerçekleştiren ve nükleik asit metabolizmasının bozukluklarına karşı duyarlıdır. Vitamin eksikliğinde birçok hematolojik değişiklikler ortaya çıkabilir. En sık karşılaşılan klinik tablo megaloblastik anemidir (27).

Megaloblastik anemide B12 vitamini ve folik asit eksiklikleri sonucunda bozulan DNA sentezi anormal çekirdek olgunlaşmasına neden olmaktadır. Bu durumda kemik iliğindeki eritrosit öncülleri hızlı bir şekilde çoğalamadıkları için nükleus ve sitoplazma hacimleri artmış olan megaloblastlar oluşur. Dolaşımdaki eritrositlerin bu olgun megaloblastlardan oluşmasıyla anormal boyutlarda makrositler ortaya çıkar (Ortalama eritrosit hacmi, MCV>100 fL). Bunun dışında laboratuvar incelemelerinde artmış bilirubin ve laktat dehidrogenaz düzeyleri, düşük ya da normal retikülosit sayısı, düşük beyaz küre ve trombosit sayıları, makroovalositler ve hipersegmente nötrofiller görülebilir. Yukarıdaki bulgulara sahip kişilerde B12 vitamini eksikliğinin ayırıcı tanısında özellikle folik asit eksikliği ve miyelodisplaziye göz önünde bulundurmak gereklidir. Anemi ve makrositoz, B12 vitamin eksikliği ile ilişkili klasik bulgular olsa da tüm hastalarda gözlenmez. Eritrosit hacmindeki artışlar, eşlik eden demir eksikliği veya α -talasemi varlığı ile maskelenebilir. Bu nedenle, B12 vitamin eksikliği olan hastaların üçte biri normal MCV seviyelerine sahiptir (2, 3, 50).

Nöropsikiyatrik belirtiler: B12 vitamin eksikliği olan hastaların %90'ında B12 vitamini tedavisi ile geri döndürülemeyen nörolojik komplikasyonlara rastlanabilir (1, 51). Nörolojik komplikasyonlar besinsel eksiklik ile birlikte yavaş yavaş gelişir. B12 vitamin eksikliğinde karıncalanma, kol ve bacaklarda uyuşma ile seyreden periferik nöropatiler, motor bozukluklar, görme bozuklukları, hafıza kaybı, çevreyi tanıyamama ve açık demansı içeren idrak zayıflığı ve depresyon gibi hastalıklar gözlenebilir. B12 vitamin eksikliğinin en çarpıcı nörolojik sonuçlarından biri de spinal kordun konjuge dejenerasyonu olarak adlandırılan klasik

nöropatidir (43). Nörolojik komplikasyonlar hematolojik bozukluklardan yıllarca önce meydana gelebilir, hatta bazen hematolojik bulgular olmaksızın sadece minör nörolojik bulgular gözlenebilir. Bu nedenle B12 vitamin eksikliğinin erken aşamada belirlenmesi ve tedavi edilmesi önemlidir. Özellikle nöropsikiyatrik belirtisi olan hastalarda tedavinin gecikmesi başarısızlıkla sonuçlanabilir (1, 3, 18, 52-55).

Genellikle hematolojik ve nörolojik etkilerin birbirinden bağımsız olduğu düşünülmektedir. Bunu destekleyen başlıca olgular şunlardır: (1) Pernisiyöz anemi ve B12 vitamin eksikliğine bağlı diğer 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 paralellik yoktur. (3) Folat tedavisi, B12 vitamin eksikliğine bağlı anemilerde hematolojik bozukluğu düzelttiği halde nörolojik bozukluğu genellikle iyileştirmez, hatta bazen kötüleştirebilir (49).

2.2.4. B12 Vitamin Eksikliğinin Belirlenmesinde Kullanılan Biyokimyasal Parametreler

B12 vitamin eksikliğinin erken tanısı, yüksek prevalansı ve geri dönüşümsüz nörolojik hasar, megaloblastik anemi ve kardiyovasküler hastalıklar gibi ciddi komplikasyonlara yol açma potansiyeli nedeniyle önem taşımaktadır. Bu nedenle B12 vitamin durumunu belirlemek için duyarlı ve özgül analizlere gerek vardır (56, 57). Aşağıda B12 vitamini eksikliğinin incelenmesinde kullanılan tanısal ve metabolik belirteçler yer almaktadır.

2.2.4.1. Ortalama eritrosit hacmi (MCV)

B12 vitamini eksikliğinin “geleneksel ve geç” belirteçidir. B12 vitamin eksikliği DNA sentezindeki bozulmalar nedeniyle normal hücre bölünmesinde aksamalara yol açabilir. Mitotik hızdaki azalma yüksek MCV (>100 fL) değerleri ile ortaya çıkan makrositoz ile sonuçlanır. Anemi ile birlikte ya da anemi olmaksızın görülen MCV’deki bu artış ilerlemiş bir eksikliğin işaretidir. Artmış MCV düzeylerinin folik asit eksikliği durumunda da gözlenmesi nedeniyle, MCV B12 vitamin eksikliğinin özgül bir belirteci değildir (36, 44). MCV değeri 115 fL’den daha yüksek olan 100 hastada yapılan bir çalışmada, hastaların sadece %50’sinde serum kobalamin, eritrosit folat düzeyi ya da her ikisinin birden normalin altındaki değerlere sahip olduğu; yalnızca 130 fL’den yüksek MCV düzeyleri olan kişilerde MCV’nin B12

vitamin eksikliğini tahmin etmede güvenilir olduğu bildirilmiştir. Bu nedenlerden dolayı artmış MCV değerleri B12 vitamin eksikliğinin duyarlı ve özgül bir belirteci değildir (52, 58).

2.2.4.2. B12 vitamini

B12 vitamin eksikliğinin belirlenmesinde diğer bir “geleneksel” belirteç olan B12 vitamin konsantrasyonunun ölçümü 1950’lerden bu yana en sık kullanılan laboratuvar testidir. Ancak, B12 vitamini ölçümünün tanısal etkinliği, sınırlı özgüllük ve duyarlılığı nedeniyle halen sorgulanmaktadır. Nedenleri aşağıdaki gibi açıklanabilir: Dolaşımdaki B12 vitamininin ~ %80’i birçok hücre tarafından alınamayan bir protein olan HC’e bağlı, geriye kalan küçük kısmı (~ %20) ise periferik hücreler tarafından alınabilen TC II’ye bağlı olarak bulunmaktadır. B12 vitamininin metabolik aktif formu TC II’ye bağlı olan formudur. (59-61). Kanda ölçülen total B12 vitamin konsantrasyonu her iki formu da içermektedir, dolayısıyla dokularca kullanılan biyolojik aktif form ölçülen miktarın küçük bir kısmını oluşturmaktadır (52). Ayrıca, B12 vitamin konsantrasyonları bağlayıcı protein konsantrasyonundaki değişikliklerden de etkilenebilir. Bu nedenle, B12 biyoyararlanımını göstermede B12 vitamin ölçümü zayıf bir belirteçtir (18, 62).

Dolaşımdaki B12 vitamin konsantrasyon ölçümünün tanısal açıdan bir diğer sınırlayıcı yönü de; B12 vitamininin ciddi eksiklik durumunda dahi hücre içi depoların tüketilerek serum düzeylerinin korunması nedeniyle dokudaki eksikliğin maskelenmesidir. Bu nedenle serum B12 vitamini referans aralığının alt sınırı olarak kabul edilen 200 pg/mL (148 pmol/L) değerinin üzerindeki konsantrasyonlar yeterli B12 vitamin durumunu yansıtmaz (63). Referans aralıklara göre tanısal etkinliğin değerlendirildiği bir çalışmada; tanısal duyarlılık oranları “klinik B12 vitamin eksikliği” olarak tanımlanan 200 pg/mL düzeyinin altındaki değerler için %90-95, “subklinik B12 vitamin eksikliğinde” [200-300 pg/mL (148-221 pmol/L)] %5-10 ve 300 pg/mL üzerindeki değerlerde ise %1’den daha az olduğu bildirilmiştir (44, 64). Serum B12 vitamini ölçümünün subklinik B12 vitamin eksikliğinin metabolik olarak belirlenmesindeki düşük duyarlılığı nedeniyle bazı araştırmacılar alt sınır değerinin <300 pg/mL veya <350 pg/mL düzeylerine çekilmesini önermektedirler. Düşük ve yüksek eşik değerler kullanılarak B12 vitamin eksikliğinin araştırıldığı çalışmalarda 200 pg/mL eşik değeri kullanıldığında eksiklik oranı %5-12 iken, 350 pg/mL eşik değerinde bu oranın %34-50’ye yükseldiği gösterilmiştir (64-66). Ancak normal aralığın yeniden düzenlenmesi bazı dezavantajlara yol açabilir. Öncelikle, insanların büyük bir kısmında metabolik olarak normal

olsalar bile B12 vitamin eksikliği görülecektir. Ayrıca, B12 vitamini metabolitleri olan MMA ve Hcy düzeylerinde anormallikler ortaya çıkabilir (63, 64, 67).

Tanısal özgüllük açısından B12 vitamini ölçümü için bir diğer sınırlılık da miyeloproliferatif hastalıklar, karaciğer hastalığı, ince bağırsaktaki bakteriyel aşırı çoğalma, hemoliz ve TC II eksikliği durumunda gözlenen yalancı pozitif değerler ve ciddi folat eksikliği, ciddi demir eksikliği, hamilelik, miyelomatozis durumunda görülebilen yalancı negatif değerlerdir (44, 64, 68).

Sınırlı tanısal özgüllüğü ve duyarlılığı konusundaki bu tartışmalara rağmen, serumda B12 vitamin konsantrasyonu ölçümü, B12 vitamin eksikliği için rutin inceleme parametresi özelliğiyle halen yaygın olarak kullanılmaktadır (57, 61, 69).

B12 vitamin kantitasyonunda uygulanan ilk yöntem *Lactobacillus leichmannii* organizmasının kullanıldığı mikrobiyal analizdir. Ancak bu yöntem, zaman alıcı olması ve antibiyotikler gibi ilaçlar ile nonspesifik etkileşime girmesi nedeniyle dezavantajları bulunmaktadır. Kullanılan diğer analiz yöntemleri kemilüminesans, fluorimetrik ve radyoizotopik yöntemler, kapiller elektroforez, yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC), MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) ve atomik absorpsiyon spektrometresi'dir. Bu yöntemler arasında klinik laboratuvarlarda en yaygın olanı B12 vitaminine spesifik bağlayıcı proteinlerin kullanıldığı kemilüminesans yöntemidir. Otomotize cihazlara uyarlanan kemilüminesans yöntemlerin duyarlılığının iyi olmasına karşın, biyolojik ve kompleks matrikslerdeki metal iyonlarının girişimleri nedeniyle özgüllüğü halen tartışılmaktadır (70, 71).

2.2.4.3. Holotranskobalamin (holoTC)

B12 vitamin durumunun belirlenmesinde son yıllarda üzerinde durulan holoTC, dolaşımdaki B12 vitamininin direkt belirteçidir. HoloTC, B12 vitamininin hücrelere iletilmesini sağlayan transkobalamin II bağlı B12 vitaminini temsil eden ve biyolojik olarak aktif olan kısımdır (70). HoloTC aktif B12 vitamin emilimini ve B12 vitamini homeostazındaki ani değişiklikleri B12 vitamininden çok daha duyarlı bir biçimde yansıtmaktadır (69, 70, 72).

Düşük holoTC konsantrasyonları B12 vitamin eksikliğinin en erken belirteci olarak gösterilmektedir (73, 74). Ancak holoTC'nin B12 eksikliğinin belirlenmesinde diğer fonksiyonel belirteçlere göre (MMA ve Hcy) daha yeni bir parametre olması nedeniyle tanısal

değeri ve klinik duyarlılığı konusunda çelişkili bilgiler mevcuttur (75-77). HoloTC'nin tanısal doğruluğunu göstermek için yapılan bazı çalışmalar holoTC'nin B12 vitaminine göre daha üstün olduğunu gösterirken (78-80), diğer çalışmalar B12 vitaminine eş değerde ya da daha düşük tanısal doğruluğu olduğunu göstermiştir (41, 81). Bu nedenle; holoTC ölçümünün varolan diğer testlerin ötesinde ne düzeyde ek tanısal değer sağladığı konusu halen tartışmalıdır. HoloTC'nin tek başına ya da diğer B12 vitamini belirteçlerinden biri ile birlikte kullanılıp kullanılmayacağına karar verilmesi için ileri çalışmalara gerek duyulmaktadır (69).

HoloTC için bir diğer kısıtlılık ise B12 vitamin tedavisine yanıtın izlenmesinde kullanılamamasıdır (52). B12 vitamini dışındaki faktörler de holoTC düzeylerini etkileyebilir. Bu faktörler TC genetik polimorfizimleri (yaygın olarak C776G), renal yetersizlik ve karaciğer hastalığıdır (74, 76, 82-84). Kobalamin durumuna bağlı olmayan bu faktörlerin holoTC üzerindeki etkileri, holoTC'nin bir tanısal belirteç olarak kullanılabilirliğini olumsuz etkileyebilir. Ayrıca, holoTC düzeylerinde yaş, cinsiyet ve etnik köken gibi potansiyel karışıklığa neden olan faktörlerin değerlendirilmesi için daha fazla populasyon temelli çalışmalara gereksinim vardır (70). HoloTC'nin referans aralığının alt sınırı kullanılan farklı yöntemlere göre 19-45 pmol/L arasında değişmektedir. Referans aralığının alt sınırının bu kadar farklı olmasının nedeni ise; referans aralığının düzenlenmesi için yeterli çalışmanın yapılamamış olmasıdır (85).

HoloTC'nin direk ölçümü için geliştirilen iki yöntem bulunmaktadır. Birincisi; Uilleland ve arkadaşları tarafından geliştirilen radioimmünoassay (RIA) yöntemi holoTC ölçümünün yapıldığı ilk ticari yöntemdir (77). HoloTC ölçümünde immünoassay otomatize bir test olarak kullanışlı olmasına rağmen, maliyet açısından B12 vitamin ölçümüne göre yaklaşık iki kat fazladır, ayrıca RIA yöntemine özgü biyogüvenlik sorunu kullanımı için önemli bir engeldir (3). Diğer geliştirilen yöntem ise; Nexo ve ark.'nın ilk kez apoproteinlerden holoproteinlerin ayrılmasını takiben ELISA yöntemi ile analizinin yapıldığı yöntemdir (86). HoloTC ölçümünün kullanılabilirliği, güvenilir ve sağlam analizlerin yokluğu nedeniyle halen sınırlıdır (61, 81).

2.2.4.4. Homosistein (Hcy)

B12 vitamin durumunun ek fonksiyonel belirtecidir. Homosistein, koenzim olarak B12 vitamininin metilkobalamin formuna gereksinim duyan metiyonin sentaz enzimi aracılığıyla metiyonine dönüşür. B12 vitaminindeki eksiklik Hcy'in birikmesine neden olur (56).

Dolaşımda Hcy'in birkaç formu bulunmaktadır. Serbest Hcy, disülfid bağı içeren Hcy ve %70-80 oranında bulunan protein bağı Hcy'dir. Tüm Hcy formları kanda "total Hcy (tHcy)" olarak ölçülmektedir (87). Serum ya da plazmadaki normal aralığı 5-15 µmol/L'dir. Referans aralığın üst sınırı farklı çalışmalarda 13-15 µmol/L arasında değişmektedir (56, 88).

Plazma tHcy fonksiyonel B12 vitamin eksikliğinin duyarlı ancak sınırlı özgüllükte bir belirteçdir (70). Hcy konsantrasyonları B12 vitamininin yanı sıra, metilasyon reaksiyonları için gerekli olan folik asit ve transsülfürasyon reaksiyonları için kullanılan B6 vitamin eksikliğinde de artmaktadır. B12 vitamin eksikliği, tüm yüksek Hcy düzeylerinin az bir kısmını oluşturduğu için tek başına Hcy ölçümünün özgüllüğü düşüktür (3, 18, 52, 56, 64). Bu nedenlerle Hcy ölçümü MMA ile birlikte fonksiyonel B12 vitamin eksikliğinin metabolik göstergesi olarak kullanılmaktadır (36, 44, 89).

Homosistein düzeyi yaş, cinsiyet, sosyo-ekonomik durum, etnik özellikler, sigara, egzersiz, fazla kahve tüketimi gibi fizyolojik ve yaşam tarzına bağlı pek çok faktörden etkilenmektedir (37, 88). Homosistein metabolizmasında görevli enzimlerdeki (sistatinyonin sentaz ve metilentetrahidrofolat redüktaz) nadir genetik defektler hiperhomosisteinemiye neden olur. Genetik olmayan hiperhomosisteineminin B12 vitamini eksikliği dışındaki diğer nedenleri; böbrek yetersizliği, tiroid disfonksiyonu, kalp transplantasyonu gibi patolojik durumlar ve bazı ilaçlardır (37, 56). Yüksek Hcy konsantrasyonları kardiyovasküler hastalıklar, venöz trombofili ve nöral tüp defekti gibi bazı hastalıkların artan riski ile ilişkilidir (90).

Total Hcy'in doğru olarak ölçülebilmesi için kan örneklerinin toplanması ve analize kadar geçen süre konusunda bazı özel koşullar gerekmektedir. Kan hücrelerinden Hcy'in salınımı zaman ve sıcaklık bağımlıdır. Serum ya da plazma örneğinin oda sıcaklığında bekletilmesi Hcy konsantrasyonunda saatte yaklaşık %10'luk bir artışa yol açmaktadır. Bu nedenle, kan örneklerinin soğuk zincirde taşınması, santrifüje kadar buz üzerinde bekletilmesi ve yarım saat içerisinde +4 °C derecede kan hücrelerinden ayrılması önerilmektedir (56, 91).

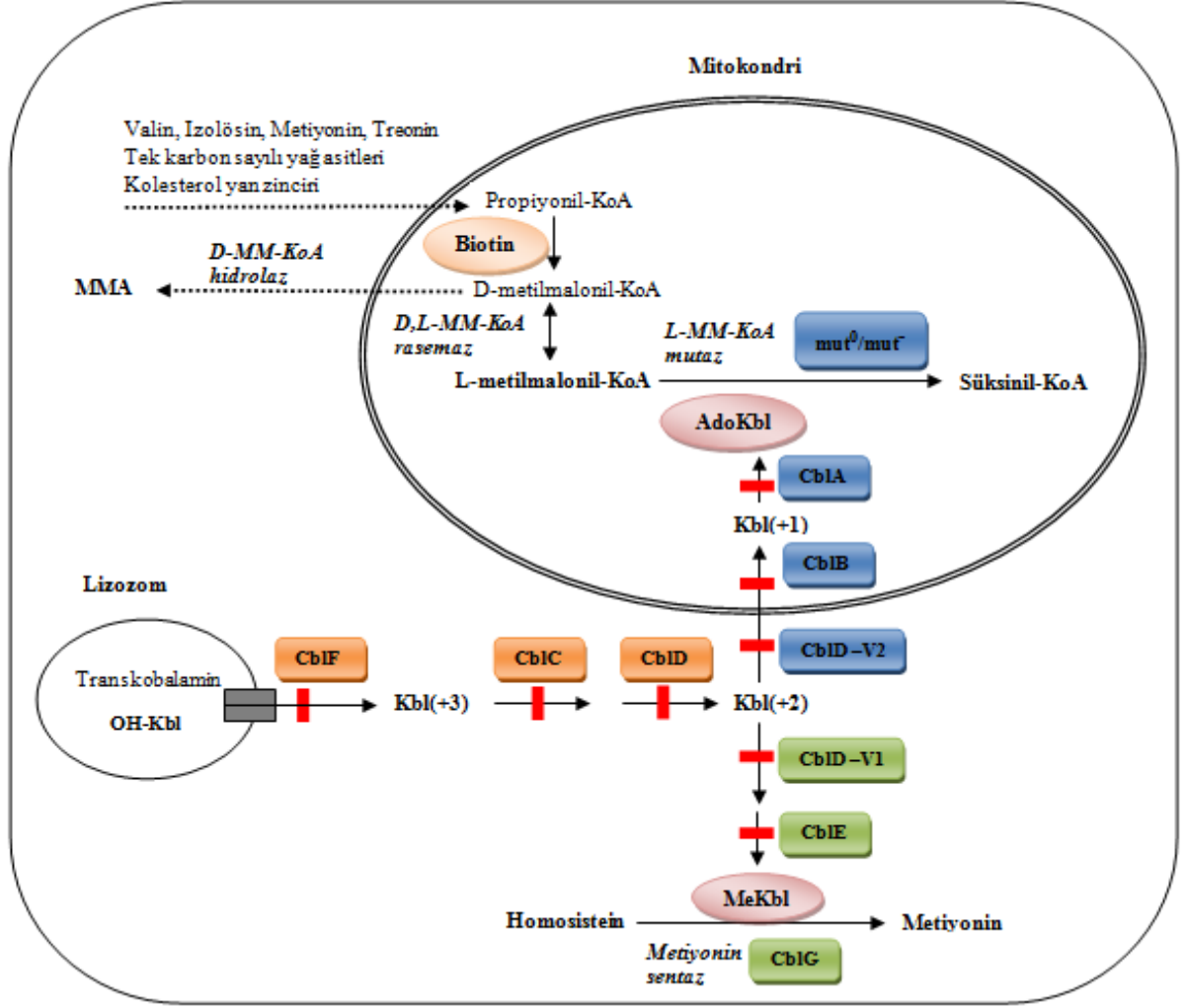
Total Hcy ölçümü immünoassay, enzimatik, kromatografik ve kütle spektrometrik tekniklere dayalı farklı yöntemler ile yapılabilmektedir. Enzim ve immünoassay yöntemlerinin farklı tipleri klinik laboratuvarlarda kullanışlı olması nedeniyle geniş ölçüde kullanılmakla birlikte, pahalı antikorların gereksinimi bu yöntemlerin uygulamalarını kısıtlamaktadır (88, 92). Kromatografik yöntemlerde ise sıvı kromatografisi (LC) ile birlikte

farklı tipte dedektörler (UV, floresans, elektrokimyasal) kullanılabilir. Sıvı kromatografik yöntemlerin avantajı aynı örnek içerisinde birden fazla analitin beraber analizine olanak sağlamasıdır. Ancak, basit sıvı kromatografik şartlarda elde edilen bileşiğe ait piklerin rezolüsyonunda ve dolayısıyla bileşiğin özgülüğünde sıkıntı yaşanabilir. Bu yöntemler ayrıca zaman alıcı türevlendirme işlemleri gerektirmektedir (93, 94). Son zamanlarda Hcy ve diğer metabolitlerinin ölçümü için GC-MS (gaz kromatografisi-kütle spektrometresi) ve LC-MS/MS (sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi) yöntemleri geliştirilmiştir. GC-MS yöntemleri yüksek duyarlılık sağlamakla birlikte LC-MS/MS yöntemlerine göre türevlendirme gerektiren örnek hazırlığı aşaması nedeniyle daha zaman alıcı ve daha sınırlı veri elde edilmektedir. LC-MS/MS ile Hcy analizi diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında daha yüksek doğruluk, duyarlılık, özgülük ve hızlı sonuç alma olanağı sağlamaktadır. Ayrıca LC-MS/MS yöntemleri ucuz reaktiflerin kullanılması, düşük örnek hacmi gerekliliği ve hızlı örnek hazırlığı ile avantajlıdır (88, 92, 94). Tüm bu nedenlerden dolayı LC-MS/MS yöntemi Hcy ölçümü için referans bir yöntem olarak önerilmektedir (95).

2.2.4.5. Metilmalonik asit (MMA)

B12 vitamin durumunun öncelikli tercih edilen fonksiyonel belirteçdir. B12 vitamininin adenzilkobalamin formunun eksikliğinde L-metilmalonil-KoA ve öncülü olan D-metilmalonil-KoA birikir. Aşırı D-metilmalonil-KoA, D-metilmalonil-KoA hidroksilaz aracılığı ile MMA'ya dönüşür. Dokularda biriken MMA çeşitli biyolojik sıvılarda ölçülebilmektedir.

Vücut sıvılarında MMA konsantrasyonları başlıca iki nedenle yükselmektedir. Birincisi; propiyonik asit katabolizmasında anahtar bir enzim olan mitokondrial L-metilmalonil-KoA mutaz'ın koenzimi 5-deoksiadenzilkobalamin (AdoKbl) eksikliğinde ortaya çıkan "kalıtsal olmayan B12 vitamini eksikliği" durumudur. İkincisi ise; L-metilmalonil-KoA mutaz (MCM) eksikliği ya da AdoKbl transportunda veya sentezindeki kalıtsal defektlerden oluşan ve "metilmalonik asidüriler" olarak adlandırılan heterojen bir grup bozukluktur (**Şekil 6**) (96, 97).



Şekil 6. İntraselüler kobalamin metabolizması ve defektleri (98)

MM-KoA: metilmalonil-KoA, **mut⁰/mut⁻:** mut geni tarafından kodlanan metilmalonil-CoA mutaz enziminin tam/kısmi eksikliği, **CblA, CblB ve CblD-varyant 2:** AdoKbl sentez basamaklarındaki defektler, **CblE, CblG ve CblD-varyant 1:** metiyonin sentaz enzim eksikliği ve MeKbl sentez basamaklarındaki defektler, **CblF, CblC ve CblD:** OH-Kbl'in lizozomdan çıkışında ve Kbl(+3)'den Kbl(+2)'ye dönüşümü sırasında gerçekleşen defektler.

Metilmalonik asidüriler otozomal resesif kalıtılan ve organik asidemiler arasında en sık görülen metabolizma bozukluklarıdır. Görülme sıklığı 1/50,000–1/80,000 arasında değişmektedir (96, 99). Biyokimyasal olarak, propiyonat, 3-hidroksipropiyonat ve 2-metilsitrat'ın birikmesi sonucunda alternatif bir yol olan propiyonat oksidasyonunun aktivasyonu yüzünden dokularda ve vücut sıvılarında biriken MMA ile karakterizedir (97). B12 vitamin eksikliği ve metilmalonik asidüriler dışında böbrek yetersizliği, hipovolemi ve

intestinal bakteriyal aşırı üreme durumlarında da MMA düzeylerinde artış görülebilir (18, 44, 62, 70).

MMA analizi hem idrarda hem de serum/plazmada yapılabilir. İdrardaki MMA konsantrasyonlarının seruma göre yaklaşık 40 kat daha fazla olması ve örneklerin girişimsel olmayan bir işleme toplanması nedeniyle bazı araştırmacılar tarafından tercih edilmekle birlikte (43, 47, 89), idrar örneklerinin toplanmasının özellikle yenidoğan ve çocuklarda zor ve zaman alıcı olması nedeniyle serum/plazma MMA ölçümüne literatürde daha sık rastlanmaktadır (100). İdrarda MMA ölçümünde böbrek fonksiyonlarının MMA düzeyleri üzerine etkisini normalize etmek için idrar kreatinin ölçümü yapılmalıdır. Kreatinin atılımına göre düzeltilmiş üriner MMA düzeylerinin ölçümü, özellikle böbrek yetersizliği olan kişilerde serum düzeylerinin ölçümüne alternatif olarak kullanılabilir. İdrar referans aralığı ise 0-3.6 mmol/mol kreatinin'dir (70, 101-103).

Kanda MMA analizi için serum ya da plazma kullanılabilir. Literatürde yaygın olarak plazma örnekleri ile çalışılmaktadır (35, 101-107). MMA analizi için kan alımı ve saklanması konusunda özel bir koşul bulunmamaktadır. Oda sıcaklığında serum ve plazmadaki MMA en az iki gün stabildir (56). Serum/plazma MMA referans aralığının üst sınırı 0.21 $\mu\text{mol/L}$ 'den 0.48 $\mu\text{mol/L}$ 'ye kadar değişmektedir. Bu nedenle yüksek MMA konsantrasyonları görülme sıklığı seçilen referans aralığına göre değişmektedir. En yaygın kullanılan üst sınır 0.27 $\mu\text{mol/L}$ 'dir. Savage ve ark. MMA normal aralığını 0.07-0.27 $\mu\text{mol/L}$ olarak tanımlamıştır (37, 64, 108).

B12 vitamin eksikliğinin belirlenmesinde serum MMA ölçülmesinin, serum B12 vitamini ölçümüne göre bazı üstünlükleri bulunmaktadır: 1) Örneklerdeki MMA, B12 vitamininden daha stabildir. 2) Serum MMA konsantrasyonları serum B12 konsantrasyonundan 1000 kat daha fazladır. 3) B12 vitamin eksikliğinde MMA analizi ile ölçülen azalan bir konsantrasyondan ziyade artan bir konsantrasyondur. 4) Doku B12 durumunu serum MMA düzeyleri, B12 vitamin konsantrasyonuna göre daha iyi yansıtır, bu nedenle B12 vitamin eksikliğinin erken aşamasında (subklinik), serum B12 vitamin konsantrasyonları azalmadan önce sıklıkla MMA konsantrasyonları artmaktadır (18, 103). Tüm bu nedenlerden dolayı, MMA ölçümü B12 vitamin konsantrasyonu ölçümüne göre tanısal doğruluğu daha yüksek ve daha iyi bir belirteçtir. Özellikle "düşük normal B12 konsantrasyonlarında" tanıyı aydınlatmada yardımcı bir parametredir (18). ABD'de yapılan

Ulusal Sağlık ve Beslenme Değerlendirmesi Çalışması (NHANES) programı, subklinik eksikliğin değerlendirilmesinde, dolaşımdaki B12 konsantrasyonlarını göstermede tercihen B12 vitamini ölçümü (holoTC ve B12 vitamini arasından) ve B12 vitamin eksikliğinin fonksiyonel metabolik belirteçlerinden tercihen MMA ölçümü (Hcy ve MMA arasından) olmak üzere en az iki biyobelirteç kullanılmasını önermektedir (17).

Serum/plazma ya da idrardaki MMA analizi yaklaşık 25 yıl önce B12 vitamin eksikliğinin bir göstergesi olarak kullanılmaya başlandı (107). Vücut sıvılarındaki MMA ölçümü için kapiller elektroforez, HPLC, GC-MS ve LC-MS/MS'i içeren farklı yöntemler geliştirilmiştir. Kapiller elektroforez yöntemleri türevlendirme işlemi gerektirmektedir ve analiz süresi uzundur. Kullanılan HPLC yöntemleri girişim yapan pikler, yetersiz ayırılma ve internal standart olmaması nedeniyle hatalı sonuçlara yol açabilmektedir (102). HPLC ve GC-MS yöntemlerinde duyarlılığı ve özgüllüğü arttırmak için türevlendirme ve uzun ekstraksiyon işlemlerine gereksinim vardır. Uzun yıllardan bu yana MMA analizinde "altın standart" olarak kullanılan GC-MS (19) iyi bir performans göstermesine karşın, MMA'nın hidrofilik ve uçucu olmayan yapısı nedeniyle GC-MS teknikleri ile direkt ölçümü mümkün değildir. Ayrıca ölçüm için gerekli örnek hacminin fazla olması ve uzun analiz süresi diğer dezavantajlarıdır. LC-MS/MS görece basit metodolojik uygulamaları nedeniyle klinik laboratuvarlarda hızlı bir şekilde GC-MS'in yerini almıştır. GC-MS ile karşılaştırıldığında, %75 daha kısa analiz süresi ve yarıdan daha az analiz maliyeti nedeniyle potansiyel olarak en hızlı ve en uygun yöntemdir (19, 70, 104, 105). Stabil izotop işaretli internal standartların kullanıldığı LC-MS/MS yöntemleri ile türevlendirme yapılarak veya yapılmaksızın uygulanan farklı örnek hazırlıkları, daha az örnek hacmi ve kısa analiz süresi ile MMA ölçümünü gerçekleştirilmektedir. Ayrıca, hemolizli örnekler MMA'nın LC-MS/MS analizlerinde girişim yapmamaktadır (103). LC-MS/MS'in MMA analizindeki diğer bir avantajı ise MMA'nın yapısal izomeri olan süksinik asitten ve girişim yapabilecek olan diğer izobarik bileşiklerden yeterli ayırımın sağlanmasıdır. LC-MS/MS cihazlarının duyarlılığı, seçiciliği ve özgüllüğü sayesinde B12 vitamin durumunun belirteçleri için ileri düzeyde referans yöntemlerin geliştirilmesi mümkün olmuştur. LC-MS/MS ile B12 vitamin eksikliğinin belirlenmesinde, diğer yöntemlere göre daha yüksek kurulum maliyeti ve deneyimli kullanıcı gereksinimi olmasına karşın, otomatize örnek hazırlığı ile uyumlu ve çoklu analit ölçümüne olanak sağlayan yöntemlerin kullanılabilirliği nedeniyle, popülasyon-temelli çalışmalarda ve klinik laboratuvarlarda bu duyarlı platformun kullanımı giderek artmaktadır (18, 70).

B12 vitamin eksikliğinin araştırılmasında MMA düzeylerinin kullanıldığı çalışmalar literatürde son yıllarda hızla artış göstermektedir. Nöropsikiyatrik populusyondaki B12 vitamin eksikliğinin belirlenmesinde B12 vitamini ve holoTC ölçümünün tanısal yararını araştırmak için doğrulama kriteri olarak MMA'nın kullanıldığı bir çalışmada; yüksek MMA düzeyleri ile karşılaştırıldığında, B12 vitamininin ve holoTC'nin yeterli tanısal doğruluğu sağlayamadığı gösterilmiştir (41).

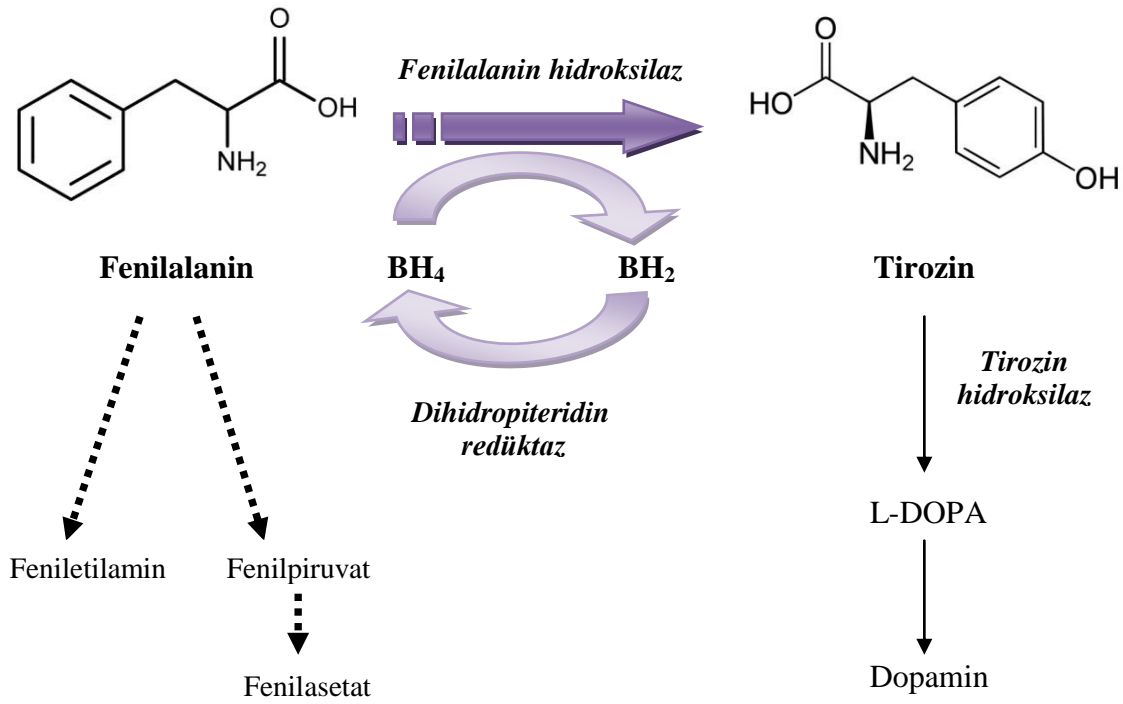
Miyeloproliferatif bozukluklara sahip 33 hastada yapılan bir çalışmada; tüm hastalar normal ya da yüksek serum B12 vitamin düzeylerine sahip olmalarına karşın %27.27'sinde yüksek serum MMA düzeyleri bulunmuştur. Bu alışmada, B12 vitamin eksikliği şüphesi olan miyeloproliferatif bozukluğu olan hastalarda bir tarama parametresi olarak serum MMA düzeylerinin kullanılması önerilmektedir (109).

Diyabetik ve nondiyabetik yaşlı hastalarda yapılan retrospektif bir çalışmada; normal kabolamin düzeylerine sahip olgularda yüksek MMA düzeyleri ile belirlenen fonksiyonel kobalamin yetersizliğinin nöropati ile ilişkisi gösterilmiştir (110).

2.3. FENİLKETONÜRİ

2.3.1. Fenilketonürinin Tanımı, Biyokimyasal Mekanizması ve Tarihçesi

Fenilketonüri (FKÜ), hepatic fenilalanin hidroksilazı (FAH, fenilalanin 4-monooksijenaz, E.C. 1.14.16.1) kodlayan gende meydana gelen mutasyonlar nedeni ile ortaya çıkan ve aminoasit metabolizması bozukları arasında en yaygın olan kalıtsal bir metabolik hastalıktır. FAH, fenilalanini tirozine dönüştürür ve kofaktör olarak tetrahidrobiopterine (BH_4) gereksinim duyar (Şekil 7) (8).



Şekil 7. Fenilalaninin tirozine dönüştüğü metabolik yol (BH_2 : Dihidrobioplerin)

Fenilketonüride, FAH enziminin eksikliği veya bu enzimin kofaktörü olan BH_4 üretiminde ya da döngüsündeki bir bozukluk nedeniyle proteinli gıdalarda bulunan fenilalanini sindiremeyen çocukların vücutlarında bu aminoasit ve artıkları birikmeye başlar. Biriken fenilalanin ve artıkları FKÜ'li bireyde geri dönüşü olmayan, ilerleyici zeka ve nörolojik gelişme geriliğine neden olur.

Fenilketonüri ilk kez 1934 yılında "Asbjørn Følling" tarafından, ciddi mental retardasyon gösteren ve idrarlarında büyük miktarda fenilketon cisimciklerinin (feniletilamin, fenilpiruvat, fenilasetat) atılmasına bağlı olarak oluşan kokuya sahip dört ve yedi yaşlarındaki iki kardeşte gösterilmiştir (111). 1953'de, Jervis tarafından normalde fenilalanini tirozine

çeviren FAH enziminin FKÜ’de yetersiz olduğu ve Bickel tarafından fenilalanin kısıtlı diyetin zeka geriliğini önlediği keşfedilmiştir (112, 113). 1963’de Guthrie ve Susie tarafından, bakteriyel inhibisyon yöntemi ile yarı-kantitatif olarak kolaylıkla kan fenilalaninini ölçülebilen bir “Guthrie testi” geliştirilmiştir (114). Günümüzde, birçok ülkede Guthrie testi ya da kütle spektrometresi gibi daha modern sistemler ile yenidoğan tarama programı kapsamında fenilketonürinin erken teşhisi mümkündür (115).

2.3.2 Fenilketonürinin Görülme Sıklığı ve Genetiği

Fenilketonüri sıklığı ülkelere göre farklılık göstermektedir. Avrupa’daki görülme sıklığı yaklaşık 1/10,000 canlı doğumdur (116). Ülkemizdeki görülme sıklığı ise 4,500 canlı doğumda birdir. Türkiye’de bu oranın yüksek olmasının sebebi akraba evliliklerinin sıklığı (%21.06) ve her 20-25 kişiden birinin FKÜ taşıyıcısı olmasıdır (117, 118). Fenilalanin hidroksilaz geni 12. kromozom üzerinde (12q22-q24.1) bulunup, 13 ekzondan oluşmaktadır (119). 2007 yılında “İnsan FAH Mutasyon Bilgi Veri Tabanı (hPAHdb)” FAH genine ait toplam 548 ayrı mutasyon olduğunu bildirmiştir (120). Ülkemizde klasik FKÜ’li çocuklarda yapılmış mutasyon incelemelerinde IVS10nt546 (IVS10-11G>A) ve R261Q mutasyonlarının sıklığı sırasıyla %32 ve %6.8 olarak bulunmuştur (121).

2.3.3 Fenilketonürinin Sınıflandırılması

Hiperfenilalaninemi (HFA), kan fenilalanin düzeyinin 2 mg/dL’nin üzerinde (>120 µmol/L) olmasıdır (122). HFA, fenilalanin hidroksilaz enzimidaki bozukluğun tipine bağlı olarak farklı fenotipik özellikler gösteren heterojen bir gruptur (123). HFA hastada var olan enzim aktivitesine, tedavi öncesi kan fenilalanin düzeyine ve hastaların tolere edilebildikleri günlük fenilalanin miktarına göre beş gruba ayrılabilir.

Klasik fenilketonüri: FAH enziminin tam ya da tama yakın eksikliği söz konusudur. Tanı anındaki kan fenilalanin düzeyi >20 mg/dL (>1200 µmol/L)’dir. Hastaların tolere edebildikleri günlük fenilalanin miktarı 20 mg/kg civarındadır.

Orta derecede (moderate) fenilketonüri: Enzim aktivitesi %1’in üzerindedir. Kan fenilalanin düzeyi 15-20 mg/dL (900-1200 µmol/L) arasındadır. Hastaların tolere edebildikleri günlük fenilalanin miktarı 20-25 mg/kg’dır.

Hafif derecede (mild) fenilketonüri: Enzim aktivitesi %5'in üzerindedir. Kan fenilalanin düzeyi 10-15 mg/dL (600-900 µmol/L) arasındadır. Hastaların tolere edebildikleri günlük fenilalanin miktarı 25-50 mg/kg'dır.

Hafif derecede (mild) hiperfenilalaninemi (FKÜ olmayan HFA): Enzim aktivitesi %30'un üzerindedir. Kan fenilalanin düzeyi <10 mg/dL (<600 µmol/L) arasındadır.

BH₄ metabolizması bozukluğuna bağlı hiperfenilalaninemi: BH₄ biyosentezi ya da rejenerasyonunda görevli enzimlerde meydana gelen mutasyonlardan dolayı HFA'nın yaklaşık %1-3'ünde BH₄ metabolizma bozukluğu görülür (124).

2.3.4. Fenilketonürinin Klinik Bulguları

Fenilketonürlü bebek doğumda normaldir. Nörolojik etkilenme yavaş yavaş gelişir ve ilk aylarda dikkati çekmez. FKÜ'de en çarpıcı bulgu gelişim ve zeka geriliğidir. Genellikle altı ay civarında bebeğin yaşlılarından geri kaldığı fark edilir. Eğer birkaç ay içinde teşhis edilemez ve tedavi sürecine başlanamazsa ilerleyici ve geri dönüşümsüz mental retardasyon gerçekleşir. Buna ek olarak görülen klinik bulgular; açık saç, cilt ve göz rengi, geniş aralıklı dişler, küf benzeri idrar ve ter kokusu, ekzematöz kaşıntı, hipopigmentasyon, otizm, nöbetler ve motor gerilik, gelişim problemleri, anormal davranışlar ve psikiyatrik bozukluklardır. FKÜ hastalarının çoğunda yenidoğan döneminde hastalık tanısının konması tedaviye erken başlanması nedeniyle tipik klinik bulguların görüldüğü hastalar azalmıştır (8, 115, 122, 125, 126).

2.3.5. Fenilketonüri Tedavisi

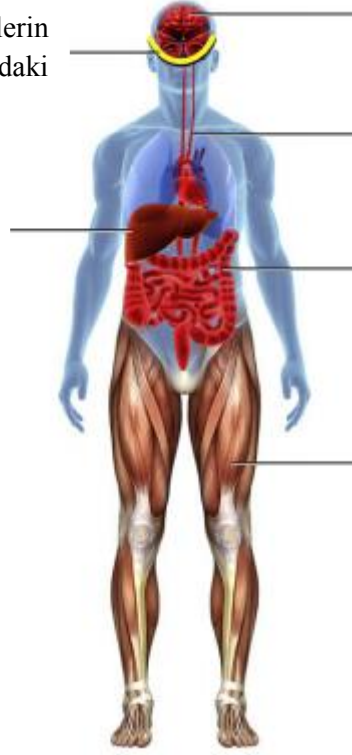
Fenilketonüri biyokimyasal mekanizması iyi anlaşılmış ve tedavisi mümkün olan metabolik bir hastalıktır. FKÜ tedavisinin ömür boyu, titizlikle ve programlı bir şekilde sürdürülmesi gerekmektedir. Henüz FKÜ için "kür" olmamasına rağmen, beyindeki etkilerini önleyebilecek çeşitli tedavi stratejileri mevcuttur (**Şekil 8**) (120, 127).

Kan Beyin Bariyeri

NAT1 aracılığı ile BNAA'lerin KBB'den geçmek için kandaki yüksek FA ile yarışması

Karaciğer

FAH geni ile gen terapisi
Hücre transplantasyonu
BH₄ tedavisi
Yanlış katlanmış FAH enzimi için şaperon terapisi



Beyin

Tüm tedaviler beyine geçen azalmış FA ile sonuçlanır.

Kan Dolaşımı

Enjekte edilebilir formda enzim (FAL) replasman tedavisi

Sindirim Sistemi

Oral formda enzim (FAL) replasman tedavisi, düşük FA içeren besinler ve BNAA ile dolaşıma katılan FA'nın inhibisyonu

Kas

FAH geni ve normal BH₄ metabolizması için gerekli genlerin kombinasyonu ile alternatif gen terapisi

Şekil 8. FKÜ için farklı organlara yönelik mevcut tedavi stratejileri (127)

NAT1: Nötral amino asit taşıyıcı-1, **BNAA:** Büyük nötral amino asit, **KBB:** Kan beyin bariyeri, **FA:** Fenilalanin, **BH₄:** Tetrahidrobiyopterin, **FAH:** Fenilalanin hidroksilaz, **FAL:** Fenilalanin amino liyaz

Fenilketonüri hastalarının tedavisinde en geçerli ve geleneksel yöntem, fenilalaninden kısıtlı ve aynı zamanda diğer besinlerin yeterli alımını sağlayacak şekilde yarı-sentetik bir diyet uygulamasıdır (128, 129). Doğumdan çok kısa bir süre sonra başlanan fenilalaninden kısıtlı diyet tedavisinin temel amaçları; fenilalaninden zengin doğal proteinleri kısıtlayarak kan fenilalanin düzeylerini güvenli sınırlar (120-360 µmol/L) içinde tutmak, böylece kan ve serebral dokudaki akut ve kronik artışı önlemek, mental retardasyona engel olmak ve sağlıklı bir şekilde normal hayatı ve büyümeyi sağlamaktır (128). FKÜ'li hastalarda yenidoğan döneminde tedaviye başlandığında ve tedaviye iyi uyum sağlandığında zekâ düzeylerinin normal olması beklenmektedir (115, 127, 130).

Klasik FKÜ diyetinde, hastalar proteinden zengin olan hayvansal gıdalar (et, balık, yumurta, süt ürünleri), fındık, normal ekmek, aspartam, un, soya, arpa suyu ve krema içeren yiyecek ve içeceklerden uzak durmak zorundadırlar. Bu sebeple FKÜ diyeti düşük-protein

içeren doğal besinlerden (sebzeler, meyveler ve bazı bakliyatlar), özel mamalardan (fenilalaninsiz, tirozin içeren, mineral ve vitaminlerle zenginleştirilmiş amino asit karışımları) ve tıbbi besinlerden (düşük proteinli un, ekmek, makarna, pirinç, bisküvi, çikolata gibi) oluşmaktadır (128, 131). Tirozin, fenilalaninden sentezlenen ve esansiyel olmayan bir amino asittir. Tirozin tüm proteinlerin içerisinde bulunur ve tiroksin, melanin, dopamin ve epinefrinin prekürsörüdür. FKÜ'li kişiler hepatik FAH enzimi eksikliği nedeniyle fenilalaninden tirozini sentezleyemezler. Bu nedenle, bu kişiler için tirozin esansiyel bir amino asittir. FKÜ'li hastalar için kullanılan özel mamalar fenilalaninsiz, tirozin içeren, eser element, vitamin ve mineral, az miktarda da karbohidrat ve yağ içeren amino asit karışımlarından oluşmaktadır (130, 132, 133).

Diyet tedavisi altındaki FKÜ hastalarında okul çağından itibaren diyete uyumda güçlükler görülebilmektedir. 10-12 yaşları arasındaki FKÜ'li çocukların yaklaşık %30'unun diyeti bıraktığı bildirilmiştir (134). Erişkin FKÜ'li hastalarda ise bu oran daha yüksektir (%50-90) (135). Diyete uyum gösteren hastalar; fenilalaninden kısıtlı diyete uyan, amino asit karışımlarını içeren özel mamaları alan, belirli miktarda sebze, meyve, tahıl tüketen ve serum fenilalanin düzeyi hedef aralıkta bulunanlardır. Diyete uyum göstermeyenler ise amino asit karışımlarını düzenli kullanmayan ve kısıtlı verilen meyve, sebze ve tahıllarda bir miktar kaçak yaptığı düşünülen, dolayısı ile serum fenilalanin düzeyi istenilen değerin üzerinde seyreden hastalardır.

Diğer yandan, adolesan ve yetişkin dönemdeki hastaların tolere edilebildiği fenilalanin miktarı daha fazla olduğu için izleyen hekim tarafından doğal protein alımına sınırlı miktarda izin verilerek diyetleri gevşetilebilir. Ancak bazı adolesan ve yetişkinler kısıtlı olarak izin verilen doğal proteinlerin tad ve kokularına bebeklikten itibaren alışkın olmadıkları için bu grup proteinlerden yeterince tüketemezler, üstelik almaları gereken amino asit karışımlarını da düzenli kullanmazlar. Bu nedenle B12 vitaminin de içinde bulunduğu bazı esansiyel besinlerin eksikliklerine maruz kalırlar. (13).

2.3.6. Fenilketonürde Olası Besin Eksiklikleri

Fenilalaninden kısıtlı bir diyet hayvansal proteinlerde bulunan birçok mikro besin öğelerinden eksik beslenmeyi gerektirir. Bu eksikliklerinden kaçınmak için diyete ek olarak vitamin, mineral ve eser elementler alınması gereklidir. FKÜ’de mikro besin öğelerinin durumu; diyetin tipi, hayvansal ya da bitkisel kaynaklı doğal protein miktarı, BH₄ tedavisi, metabolik kontrol, fenilalaninsiz amino asit karışımının mikro besin öğelerinin içeriği ve doz sıklıkları gibi birçok faktör tarafından etkilenmektedir (133).

Mikro besin eksikliği riski altında olan hastalar:

- 1) Fenilalaninsiz amino asit karışımlarına alışamayanlar
- 2) Fenilalaninsiz amino asit karışımı kullanmayan, yalnızca düşük proteinli vegan diyeti ile tedavi altında olan hafif hiperfenilalaninemili kişiler
- 3) Diyet tedavileri çok sıkı olmayan ya da durdurulan, fakat hayvansal proteinli besinleri de tüketmeyenler
- 4) Fenilalaninsiz amino asit karışımı kullanmayan, proteinden kısıtlı bir diyet ile birlikte BH₄ tedavisi alan kişilerdir (133).

Fenilketonürlü kişilerde A vitamini (136), B6 vitamini (15, 137), koenzim Q10 (138), demir (139), karnitin (140), uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri (141, 142), selenyum, çinko, kalsiyum, B12 vitamini alımının yetersiz olduğu gösterilmiştir.

Fenilketonürde eser minerallerin durumu, özellikle antioksidan sistem ile ilişkili olan çinko ve selenyum geniş çaplı çalışılan konulardır (143). Bazı çalışmalarda FKÜ’de çinko normal durumu bildirilirken, bu alandaki diğer çalışmalarda hastalarda çinko eksikliği göstermiştir. Yapılan bir kohort çalışmasında, çinko plazma düzeyleri hastaların %48’inde referans aralığın altında bulunmuştur. Bu sonuçlar özellikle doğal proteinlere bağlı olmayan, amino asit karışımlarına eklenen çinkonun biyoyararlanımının yetersiz olduğunu düşündürmektedir (133, 144, 145).

Selenyum eksikliği FKÜ’de rapor edilen en yaygın besinsel problemlerden biridir (146, 147). Sıkı diyet alan FKÜ’li hamilelerde serum, tam kan, idrar ve saç selenyum konsantrasyonlarının ve glutatyon peroksidaz aktivitesinin düşük olduğu gösterilmiştir. Bu parametrelerin düzeylerinin diyet kısıtlamasının azaltılması ile yükseldiği bildirilmiştir (148).

2.3.7. Fenilketonüri ve B12 Vitamini

B12 vitamini ana kaynakları fenilalanince zengin et, süt, süt ürünleri ve deniz ürünleri gibi hayvansal gıdalar olması nedeniyle, kısıtlı diyet alan FKÜ hastalarında sık rastlanan klinik problemlerden birisi B12 vitamin eksikliğidir. Aslında, fenilalaninsiz amino asit karışımlarının B12 vitamin içeriği yüksektir (0,65-9,4 µg/10 g amino asit). Bu nedenle FKÜ'li hastalar almaları gereken vitamin ve minerallerle zenginleştirilen amino asit karışım miktarına uyuyor ise B12 vitamin eksikliği riski düşük olacaktır (133). Ancak, FKÜ diyet tedavisinin bir parçası olan bu amino asit karışımlarının biyoyararlılığı konusunda yeterli bilgi bulunmamaktadır (9, 10).

Belirgin B12 vitamin eksikliği olan hastalar diyet tedavisine iyi uyum sağlayamayan, vitamin/mineral ilavesinden yeterli B12 vitamin alamayanlar ya da gevşetilmiş diyetle geçtiğinde doğal protein kaynaklarını ve amino asit karışımlarını yeterince tüketemeyen adolesan ve yetişkin FKÜ hastalarıdır (11-13, 15, 16, 149).

Farriaux ve ark. (9), FKÜ'li hastalarda normalin alt sınırına yakın B12 vitamin düzeyleri olmasına karşın bu hastalarda makrositik anemi, megaloblastik kemik iliği ve idrar metilmalonik asit (MMA) düzeylerinin yüksek olduğunu ilk kez bildirmişlerdir.

Hanley ve ark. tarafından (11), diyet tedavisine iyi uyum sağlayamayan 18 yaşındaki FKÜ'li bir hastada yavaş ilerleyici spastik paraparezi yanısıra megaloblastik anemi ve düşük serum B12 vitamin düzeyleri bildirilmiştir. Aynı grubun 37 adolesan ve yetişkin FKÜ'li hastada yaptığı başka bir çalışmada ise, hastaların %16'sının düşük, %16'sının da alt sınıra yakın B12 vitamin düzeyleri olduğu gösterilmiştir. Daha sonra yapılan iki çalışmanın sonuçları da FKÜ hastalarındaki B12 vitamininin eksikliğini destekler niteliktedir (12, 13). Ancak bu çalışmalarda B12 vitamin eksikliği sadece B12 vitamin düzeyi ile gösterilmiş olup, fonksiyonel B12 vitamin eksikliği değerlendirilmemiştir.

Hvas ve ark.'nın (15) 18-43 yaşları arasındaki 31 yetişkin FKÜ'li bireyde yaptıkları çalışmada, B12 vitamin durumunu ilk kez serum holoTC, plazma MMA ve Hcy ile değerlendirilmiştir. Dokuz hastada düşük B12 vitamin düzeyi, 15 hastada ise düşük holoTC düzeyi bulunmuştur. Serum B12 vitamin düzeyi düşük olan hastaların MMA düzeylerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca dokuz kişide normal folik asit düzeyleri olmasına karşın yüksek Hcy konsantrasyonları bulunmuştur. Hastaların %39'unun B12 vitaminini, %71'inin ise B6 vitaminini önerilen günlük miktarlardan daha az aldıkları gösterilmiştir.

Vugteveen ve ark. (16) tarafından yapılan çalışmada ise, fonksiyonel B12 vitamin eksikliği serum MMA ve plazma Hcy düzeyleri ile birlikte değerlendirilmiştir. Yaşları 1-37 arasında değişen 75 hastada yapılan bu çalışmada, B12 vitamin düzeyleri referans aralığı içinde olan 67 hastanın %14.9'unda MMA ve Hcy düzeyleri yüksek bulunmuştur. Vitamin B12 düzeyleri normalin altında olan sekiz hastanın %25'inde MMA ve Hcy düzeyleri yüksek bulunmuştur.

B12 vitamini eksikliği potansiyel olarak nörolojik bozukluklara sebep olabilir. Klinik belirtiler ortaya çıkmadan önce eksikliğin belirlenmesi çok önemlidir. Bu yüzden, tüm hastalarda diyetin kısıtlamasının ciddiyetine bakılmaksızın yıllık B12 vitamin durumunun değerlendirilmesi önem taşımaktadır. Ancak referans aralık içindeki B12 vitamin konsantrasyonları yeterli B12 vitamin durumun göstergesi değildir. Bu yüzden fonksiyonel B12 vitamin eksikliğinin belirlenmesi için daha duyarlı ve özgül belirteçleri olan MMA ve Hcy ölçümünün tercih edilmesi önerilmektedir (16, 133).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Yapılan araştırma kesitsel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışma Mart 2011-Haziran 2012 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirildi.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örnekleme/Çalışma Grupları

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Gastroenteroloji, Beslenme ve Metabolizma Ünitesi'nde klasik fenilketonüri (FKÜ) tanısıyla izlenen ve fenilalaninden kısıtlı diyet alan, kan fenilalanin düzeyi 2-15 mg/dL arasında olan ve yaşları 5-18 arasında değişen kız ve erkek 31 çocuk çalışmaya dahil edildi.

Dışlama kriterleri;

- Diyet tedavisi almayan veya diyet harici fenilketonüri tedavisi uygulananlar
- Fenilketonüri dışında başka hastalığı olanlar
- Ağır zeka geriliği olanlar
- Enfeksiyonu olanlar
- Polivitamin desteği alanlar
- Fenilketonüri diyet tedavisi dışında başka hastalıklar için ilaç veya diyet tedavisi alanlar çalışma dışı bırakıldı.

Kontrol grubu FKÜ'li olmayan sağlıklı kişilerden oluşmaktadır. Bu kişiler Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'na tarama testleri (hepatit, çölyak taraması veya tiroid hastalıkları vb. taramalar) için başvurular arasından seçildi. Yaş ve cinsiyet olarak çalışma grubu ile benzer olan 26 çocuk çalışmaya dahil edildi. Polivitamin desteği alan, ilaç kullanan, büyüme gelişme geriliği, anemisi ve böbrek fonksiyon bozukluğu olan kişiler çalışmaya alınmadı.

3.4. Çalışma Materyali

Etik Kurul onayını (**EK 1**) takiben hasta ve kontrol gruplarındaki katılımcıların kendileri ve aileleri çalışma hakkında bilgilendirilerildi ve çalışmaya katıldıklarını kabul ettiklerine dair onam formu imzalatıldı (**EK 2** ve **EK 3**).

Araştırmada kullanılan materyal hasta ve kontrol gruplarından alınan kan örnekleridir. Dokuz Eylül Üniversitesi Pediatrik Gastroenteroloji, Beslenme ve Metabolizma Ünitesi'ne gelen fenilketonürlü hastalardan Dokuz Eylül Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda çalışılmak üzere fenilalanin, ferritin, folik asit ve B12 vitamini ölçümleri için 5 cc düz kan alındı. Kan örnekleri 20-25 dakika oda sıcaklığında bekletilerek pıhtılaşmaları sağlandıktan sonra 3000 rpm'de 10 dk santifüjlendi (Hettich, Rotina 38, Almanya). Santifüj sonrası ayrılan serumdan fenilalanin, ferritin, folik asit ve B12 vitamini ölçümleri yapıldı. Kontrol grubunda fenilalanin ölçümü yapılmadı.

Tam kan sayımı ve homosistein ölçümleri için 2 şer cc EDTA lı kan alındı. Plazma homosistein ölçümü için alınan kan örneği soğuk zincir ile taşınarak +4 °C, 3000 rpm'de 10 dk santifüjlendi (Hettich, Rotina 35 R, Almanya). Santifüj sonrası plazma ependorfa alınarak analize kadar -20 °C'de saklandı. Ayrıca, MMA analizi için hasta ve kontrol gruplarından 2 cc EDTA lı kan alındı. Alınan kanlar analizin yapılacağı Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'na getirildi ve +4 °C, 2000 g'de 10 dk santifüjlendi (150). Ayrılan plazmalar MMA analizine kadar -80 °C'de saklandı.

Çalışma için hazırlanan veri kayıt formlarına hasta ve kontrollerin isimleri, cinsiyetleri, yaşları, vücut ağırlıkları, boyları, ek vitamin alıp almadıkları kaydedildi. Beslenme durumunu saptamak amacıyla hastaların bir günlük diyet öyküleri alındı. Hem hastaların hem de sağlıklı kontrollerin boya göre ağırlığı aşağıdaki formülden hesaplandı.

$$\text{Boya göre ağırlık} = (\text{Çocuğun ağırlığı/aynı cins ve aynı boydaki sağlıklı çocuğun ağırlığı}) \times 100$$

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişken; B12 vitamini durumunu gösteren biyokimyasal parametrelerdir.
Bağımsız değişken; FKÜ hastalarına uygulanan özel diyet ile alınan B12 vitamini miktarıdır. Bu diyet fenilalaninden kısıtlı olup, düşük-protein içeren doğal besinlerden (sebzeler, meyveler ve bazı bakliyatlar), özel mamalardan (fenilalanin içermeyen mineral ve vitaminlerle zenginleştirilmiş amino asit karışımları) ve tıbbi besinlerden (düşük proteinli un, ekmek, makarna, pirinç, bisküvi, çikolata gibi) oluşan bir diyettir.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kullanılan Kimyasallar, Malzemeler ve Cihazlar

Tablo 4. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve malzemeler

Kimyasal/Malzeme adı	Markası	Kodu
Formik Asit (%98-100)	Merck	100264.2500
Metanol LC grade (\geq %99.8)	Merck	106018.2500
Metilmalonik asit (MMA)	Sigma	M54058
Döteryumlu Metilmalonik asit (d_3 -MMA) (%98)	Cambridge Isotope Lab.	DLM-387-0.25
Santifugal filtreli tüp	Millipore	UFC803024
Vial ve insört vial	Shimadzu	SV-15A
47 mm, 0.22 μ m naylon membran filtre	Lubitech	N14722
Ependorf	Greiner	
Otomatik pipetler	Labart	L010273/L020012/ L010133

Tablo 5. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz adı	Markası	Kodu/Modeli
Tandem kütle spektrometresi	AB Sciex	4000 QTRAP
Yüksek performans sıvı kromatografisi	Shimadzu	LC-20A Prominence
Şırınga pompası (infüzyon)	Harvard Apparatus	70-2208
Şırınga	Hamilton	1001
Hassas terazi	Sartorius Extend	ED224S
Vorteks	Heidolph	Reax Top
Manyetik karıştırıcı	Ikamag	RH
Ultrasonik banyo	Elma	Transsonic T 660/H
Vakum filtrasyon sistemi	Sartorius	
Distile su cihazı	Millipore	Elix 5
Soğutmalı santrifüj	Heraeus	Biofuge Stratos
+4 °C buzdolabı	Beko	BK 7751 T
-20 °C derin dondurucu	Beko	BK 7971 DF
-80 °C derin dondurucu	Thermo Scientific Forma	705

3.6.2. Rutin Biyokimyasal Analizler

B12 vitamin, ferritin, folik asit, fenilalanin, hemogram, homosistein analizleri Dokuz Eylül Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. B12 vitamini, ferritin ve folik asit ölçümleri kemilüminesans immunoassay yöntemi ile (ABBOTT, Architect i200, ABD), fenilalanin fluorimetrik yöntemle ölçüldü (Shimadzu, RF-5301PC, ABD). Tam kan sayımı hemogram analizöründe (Beckman Coulter, LH 780 Analyzer, ABD) çalışıldı. Bu parametreler için kullanılan referans aralıkları; B12 vitamini için 200-835 pg/mL, ferritin için cinsiyete bağlı olarak 7.9-109.7 ng/mL, folik asit için 1.8-9 ng/mL, fenilalanin için <2 mg/dL, hemogram için ise yaşa bağlı olarak belirlenen değerler kullanıldı (151).

Plazma homosistein ölçümü ticari kit (ImmuChrom, IC2801, Almanya) kullanılarak floresans dedektörlü HPLC (LC-20AT, Shimadzu, Japonya) ile gerçekleştirildi. Reversed faz MZ Inertsil ODS-2 (125 mm x 4 mm; 5 µm) analitik kolonu ile izokratik ayırılama yapıldı. Enjeksiyon hacmi 20 µL, toplam analiz süresi 5 dakikadır. Floresans dedektörün (RF-10A_{XL}, Shimadzu, Japonya) eksitasyon/emisyon dalga boyları 385 nm/515 nm'dir. Plazma homosistein için yaşa ve cinsiyete bağlı 2.24-15.06 µmol/L referans aralığı kullanıldı (151).

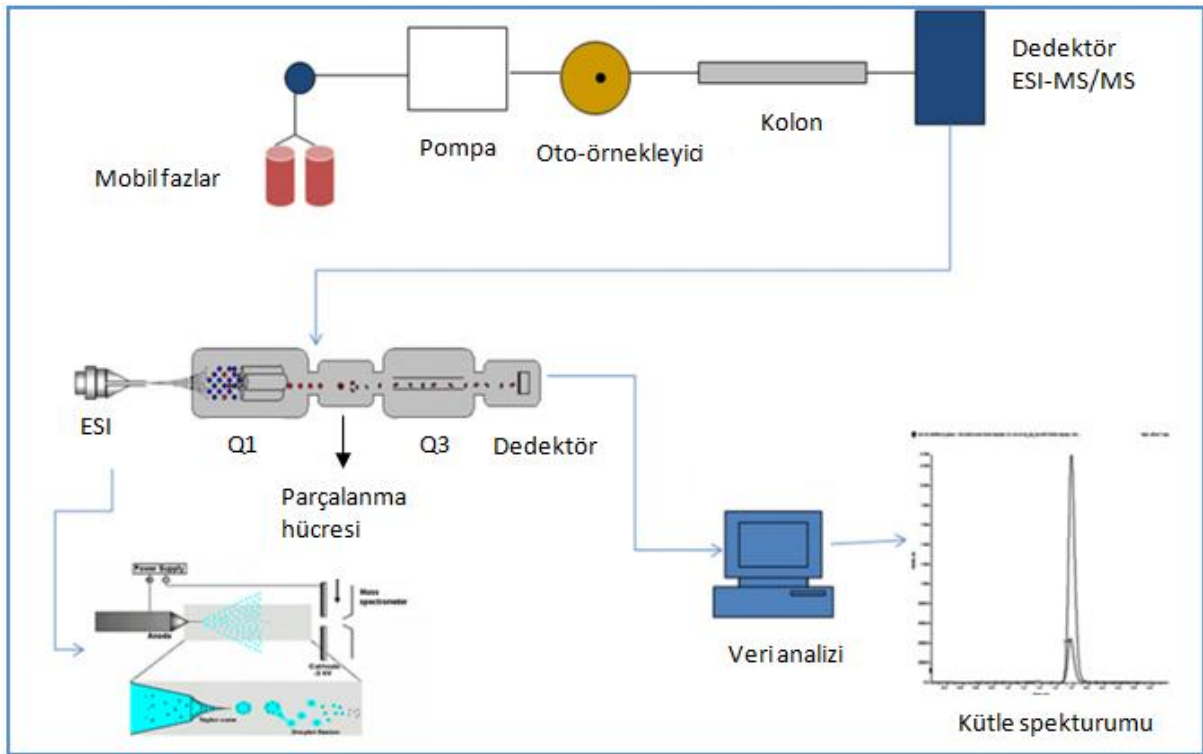
3.6.3. Metilmalonik asit (MMA) Analizi

Plazma MMA düzeyleri, yüksek performans sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresinde (LC-MS/MS), stabil izotop dilüsyon çoklu reaksiyon izleme (SID-MRM) modunda, türevlendirme gerektirmeyen örnek hazırlığı ve kısa analiz süresi olan bir yöntemle belirlendi (104). Plazma MMA için referans aralığı olarak, Türkiye'deki bir merkez tarafından belirtilen ve literatür ile de uyumlu olan 0.076-0.271 µmol/L kullanılmıştır (152-154).

Sıvı kromatografi tandem kütle spektrometri, sıvı kromatografik bir ayırımın ardından kütle spektrometresinde moleküllerin m/z oranlarına göre ölçümlerinin yapıldığı yüksek duyarlılık, özgüllük ve doğruluğa sahip bir yöntemdir (**Şekil 9**). LC-MS/MS sisteminde ilk adım, bileşiklerin kromatografik olarak ayrımıldığı sıvı kromatografi (LC) kısmında gerçekleşir. LC, kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın bileşenlerden oluşan kompleks biyolojik karışımların sabit faz ile hareketli faz arasındaki farklı etkileşimlerine göre ayırılmasını sağlar. Karışımdaki bileşikler kolon içerisinde farklı hızlarda hareket ederek kromatografik olarak birbirlerinden ayrılırlar. Alıkonma zamanı [retention time (RT)]

olarak adlandırılan, bileşiklerin kolona ilk girdikleri andan itibaren kütle spektrometresine ulaşmaları için geçen süre her bileşik için karakteristiktir.

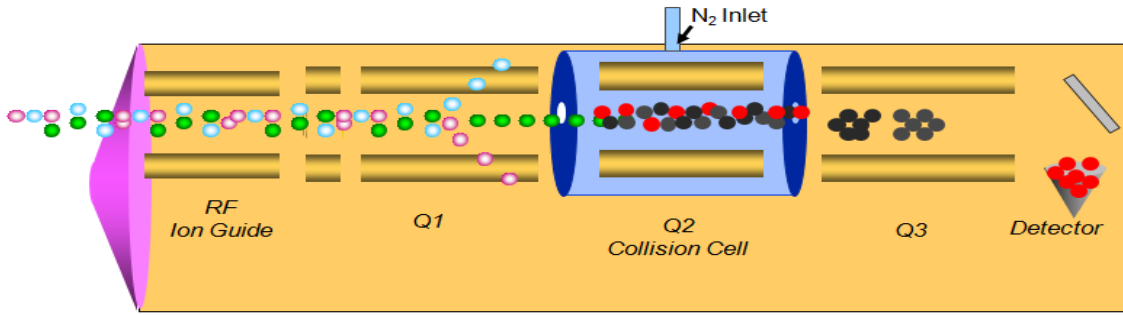
Kütle spektrometresinin (MS) prensibi, iyonize edilen analitlerin elektromanyetik bir alan içerisinde sıvı fazdan gaz fazına geçirilerek analitlere özgü kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrıştırılması esasına dayanır. En sık kullanılan MS iyonizasyon tekniklerinden biri olan ESI (Elektrosprey iyonizasyon) ile sıvı örneğin bir iğne ucundan püskürtülerek kararsız yüklü damlacıklar haline gelmesini sağlar. İyonizasyon kaynağından yüklü halde geçen damlacıklar belirlenen m/z oranlarına göre ayrılacağı kütle analizörü kısmına gelir. Kütle analizöründeki elektriksel alan belirli iyonların geçişine izin verirken, istenmeyen diğer iyonları tutarak bir m/z filtresi görevini yapar. İki kütle analizörünün ard arda geldiği sisteme sıralı kütle analizörü (Tandem MS) adı verilir.



Şekil 9. LC-ESI-MS/MS sisteminin şematik gösterimi (94)

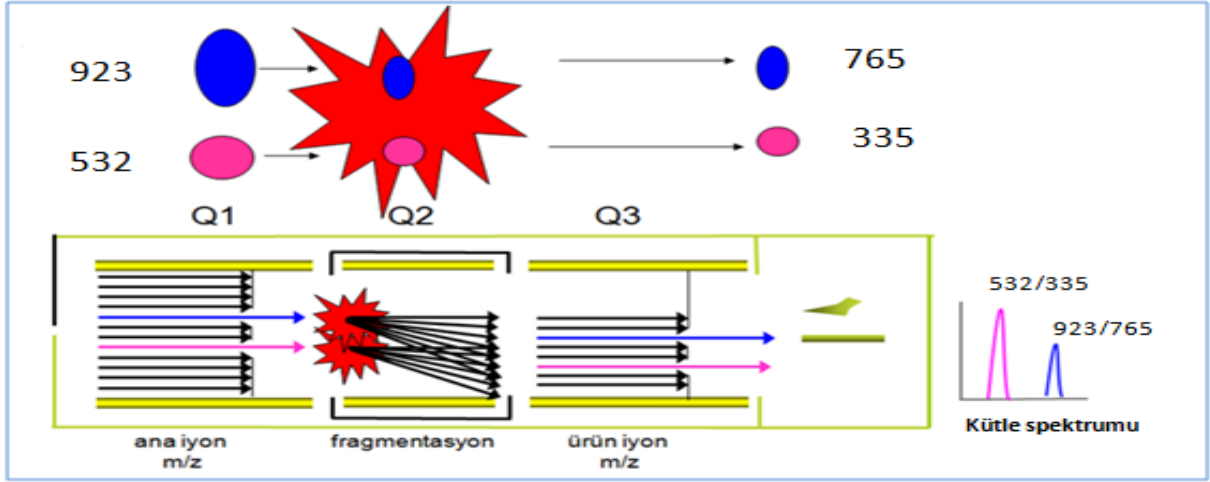
Triple quadrupole lineer iyon trap (QQQ/LIT), tandem MS özelliğinde olup analitlerin mutlak kantitasyonuna ve kalitatif karakterizasyonuna olanak sağlayan hibrid bir kütle analizörüdür. Ardışık üç quadrupole'den oluşan triple quadrupole kütle analizörlerinde (QQQ) ana iyonların filtrelenmesinin gerçekleştirildiği Q1 olarak adlandırılan ilk kısımda analite ait

belirli m/z değerindeki ana iyon seçilir. Seçilen ana iyon Q2 kısmına iletilerek inert N_2 gazı varlığında parçalanır. Q2’de oluşan ürün iyonlar Q3’e geldiklerinde belirlenen m/z değerlerindeki ürün iyon(lar) seçilir. Seçilen ana iyon/ürün ikilisi (transition) dedektöre ulaştığında m/z değerine karşı iyonların sinyal yoğunluğu (intensite) ktle spekturumu olarak kaydedilir. Kantitasyon amacıyla kullanıldığında, Q3 bölgesi standart quadrupole ktle spektrometresi olarak çalıştırılır; kalitatif tanımlayıcı çalışmalarda bu bölgenin lineer iyon trap özelliğinden yararlanılarak duyarlılık artırılmış olur. Her iki konfigürasyonun birlikte kullanımı ile tek tek kullanımlarına göre daha yüksek duyarlılık ve doğrulukta sonuçlar alınabilir (şekil 10).



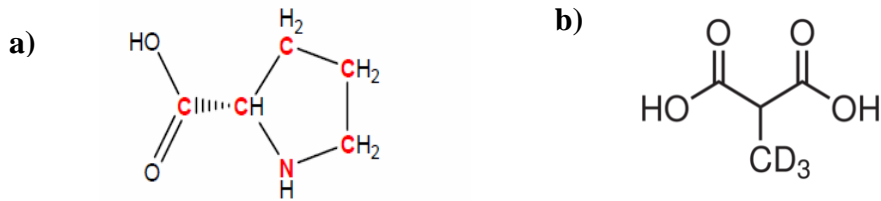
şekil 10. Triple quadrupole iyon trap tandem ktle spektrometresi (QTRAP MS/MS)

SID-MRM LC-MS/MS, adli toksikolojide ilaç düzeyi araştırmaları, yenidoğan metabolik hastalıklarının taranması ve tanısı, hormon/vitamin/biyolojik aminler, pestisit vb. analizleri gibi pek çok alanda kullanılan hedefli yüksek doğruluk ve özgüllüğe sahip bir kantitasyon modudur (155). Analitin LC’deki kromatografik alıkonma zamanı bilgisine ek olarak, MRM-MS/MS’de o analite özgü ve daha önceden tanımlanmış birden fazla ana iyon/ürün iyon(lar) ikilisinin izlenmesi ile kantitasyonun kesinliği arttırılmış olur (şekil 11) (156).



Şekil 11. MRM modunda seçilen ana iyon/ürün iyon ikilisinin izlenmesi

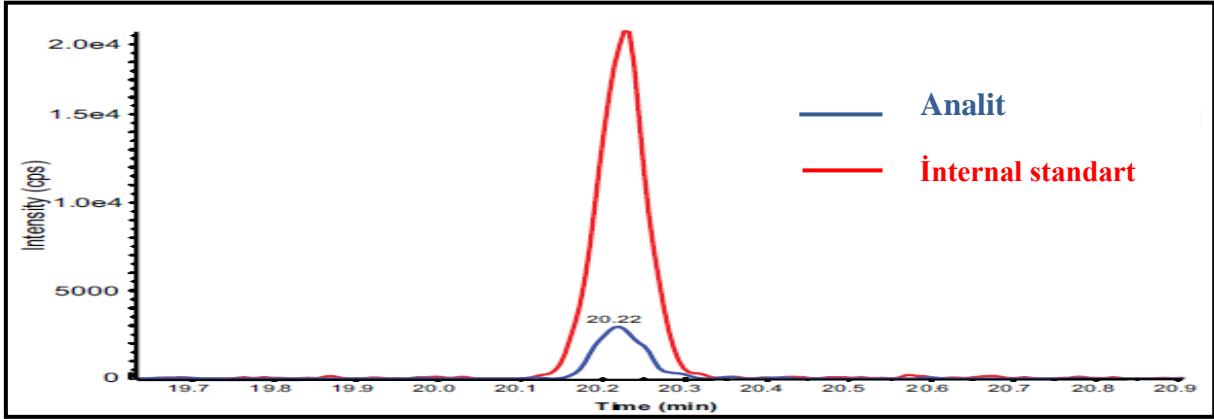
Bu yöntemde ayrıca kantitasyonun güvenilirliğini arttırmak amacıyla çalışmanın başında her bir örneğe belirli konsantrasyondaki stabil izotoplarla işaretlenmiş internal standart (IS) eklenmesiyle MS öncesi (ekstraksiyon, HPLC enjeksiyonu vb.) ve MS koşullarında (iyonizasyon vb.) oluşabilecek değişiklikler normalize edilmiş olur. İnternal standartlar ^{13}C , ^{15}N veya ^2H (döteryum) ile işaretlenebilir (**Şekil 12**). Stabil izotop işaretli IS'ların kimyasal özelliği, kromatografik ayrımlanma özellikleri, iyonizasyon etkinliği ve fragment iyon dağılımı hedef analit ile aynıdır. IS'ın hedef analitten tek farkı ^{12}C yerine ^{13}C ün, ^{14}N yerine ^{15}N in ve ^1H atomu yerine ^2H (döteryum) atomunun geçmesi nedeniyle daha yüksek moleküler kütleyle sahip olmasıdır.



Şekil 12. Stabil izotop işaretli internal standartlar [**a**] ^{13}C ve ^{15}N , [**b**] ^2H (D)]

Çalışmamızda SID-MRM LC-MS/MS ölçüm yöntemi ile MMA kantitasyonunu gerçekleştirmek için döteryum ile işaretlenmiş internal standart ($\text{d}_3\text{-MMA}$) kullanıldı. Tüm örneklere örnek hazırlık aşamasının en başında belirli konsantrasyonda döteryum ile işaretli IS eklendi. MRM modunda ana iyon/ürün iyon ikilisinin izlenmesi ile elde edilen kütle

spektrumundan analiz edilen analitin pik alanının IS pik alanına oranından yararlanılarak kantitasyon yapıldı (Şekil 13).



Şekil 13. MRM modunda izlenen analit ve internal standardının iyon kromatogramı

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda ilk kez yapılan MMA analizinde kullanılan SID-MRM LC-MS/MS yöntemi için bileşik ve cihaz bağımlı parametreler kendi çalışma koşullarımızda optimize edildi.

3.6.3.1. LC-MS/MS Özellikleri ve Çalışma Koşulları

Çalışmamızda MMA analizleri için yüksek performans sıvı kromatografisi triple quadropole iyon trap tandem kütle spektrometresi (4000 QTRAP, AB SCIEX, ABD) kullanıldı.

3.6.3.1.1. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC)

Yüksek performans sıvı kromatografisi olarak Shimadzu Prominence UFLC (Japonya) modüler sistem kullanıldı.

a) HPLC özellikleri

HPLC kısımları ve kullanılan kolonlar aşağıda verilmiştir.

- Binary pompa sistemi: LC-20AD
- Oto-örnekleyici: SIL-20AC_{HT}
- Degasser ünitesi: DGU-20A₃
- Analitik kolon: Inertsil ODS-3 Reversed Faz C18 (3 x 100 mm, 5 µm)
- Guard kolon: Agilent Eclipse XDB C8 (2.1 x 12.5 mm, 5 µm)

b) Kullanılan mobil fazlar ve hazırlanması

Mobil Faz A: %0.233 formik asit içeren distile su

Bidistile su 0.22 µm'lik membran filtre ile vakum yardımıyla filtrelendi. %2.33 formik asit eklendi. Hazırlanan mobil faz A cam şişeye alınarak degaze etmek amacıyla 15 dakika boyunca ultrasonik banyoda bekletildi.

Mobil Faz B: HPLC grade metanol (≥%99.8 saflık)

c) HPLC çalışma koşulları

HPLC çalışması 0.5 mL/dk akış hızında, %5 metanol ile izokratik elüsyon yapılarak gerçekleştirildi. İnertsil ODS-3 C18 analitik kolonun bu akış ve mobil faz konsantrasyonundaki basıncı 61 bar'dı. Kolon için dengeleme zamanı 3 dk olarak ayarlandı. Toplam analiz süresi 10.1 dk ve enjeksiyon hacmi 10 µL'dir. HPLC çalışma koşulları **Tablo 6**'da verilmiştir.

Tablo 6. MMA yönteminin HPLC çalışma koşulları

Mobil faz A akış hızı	0.475 mL/dk (%95)
Mobil faz B akış hızı	0.025 mL/dk (%5)
Akış hızı	0.5 mL/dk
Pompa modu	İzokratik elüsyon
Minimum basınç	0 bar
Maksimum basınç	400 bar
Kolon basıncı	61 bar
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Dengeleme zamanı	3 dk
Toplam analiz süresi	10.1 dk
MMA alıkonma zamanı	4.16 dk
d₃-MMA alıkonma zamanı	4.08 dk

d) HPLC sisteminin analiz için hazırlanması

Her çalışma öncesi mobil fazlardaki hava kabarcıklarının kolona gitmesini önlemek amacıyla “purge” işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra analitik kolon metotta kullanılan kromatografik akış koşulunda 14 dk boyunca (20 kolon hacmi) yıkandıktan sonra analiz için hazır hale getirildi.

3.6.3.1.2. Tandem kütle spektrometresi (MS/MS)

a) MS/MS özellikleri

Kullanılan tandem kütle spektrometresinin (4000 QTRAP) özellikleri aşağıda verilmiştir.

- İyonizasyon kaynağı: Turbo V
- İyonizasyon türü: Elektrosprey iyonizasyon (ESI)
- İyonizasyon modu: Çoklu reaksiyon izleme (MRM)
- Polarite: Negatif
- Software: Analyst 1.5

b) MS/MS çalışma koşullarının optimizasyonu

Çalışmaya başlamadan önce ilk olarak LC-MS/MS’de MMA ve d₃-MMA için bileşik bağımlı parametrelerinin optimizasyon çalışmaları üç tekrarlı olarak yapıldı. Optimizasyon için MMA standardı ve d₃-MMA standardından hazırlanan 100 ppb konsantrasyondaki infüzyon çözeltileri kullanıldı (**Çözeltilerin hazırlığı bölüm 3.6.3.2.3.**). Çözeltilerin MS/MS’e infüzyonu MS’in HPLC ile kolon bağlantısı kesilerek infüzyon pompası aracılığıyla yapıldı. İnfüzyon pompasının akış hızı 10 µL/dk olarak ayarlandı.

Optimizasyon çalışmaları kapsamında MMA ve d₃-MMA için bileşik ve iyonizasyon kaynağı bağımlı parametreler, izlenecek ana iyon/ürün iyon ikilileri ve kromatografik retansiyon zamanları belirlendi.

3.6.3.2. Plazma Havuzunun ve MMA Standartlarının Hazırlanması

3.6.3.2.1. Plazma havuzunun hazırlanması

Literatürde LC-MS/MS ile yapılan çalışmalarda kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında standartların dilüsyonunda su ve/veya plazma havuzu kullanılmıştır (19, 35, 102, 104-107,

157, 158). Dilüent olarak plazma havuzunun kullanılmasındaki amaç; analizi yapılacak olan bileşiğin bulunduğu matrisde olası girişime neden olabilecek maddeleri göz önüne alarak, örnek matrisi ile standartların matrisini eş kılmaktır. Çalışmamızda, MMA analizi için dilüent olarak su ve plazma havuzu kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrileri karşılaştırıldı.

Plazma havuzu, kontrol grubundaki 22 kişiden alınan plazma örneklerinin bir falkon içerisinde karıştırılması ile hazırlandı. MMA kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında ve yöntem geçerlilik çalışmalarında dilüent olarak kullanıldı. Plazma havuzunun endojen MMA konsantrasyonunu belirlemek için “standart ekleme yöntemi” kullanıldı.

3.6.3.2.2. Plazma havuzunun endojen MMA konsantrasyonunun belirlenmesi

Çalışmamızda kullandığımız plazma havuzunun endojen MMA miktarını belirlemek için standart ekleme yöntemi (spiking) kullanıldı. Bu yöntemde, sabit hacimdeki plazma havuzuna bilinen konsantrasyondaki bir standart farklı hacimlerde eklendi. Aynı örneklere ölçüm koşullarını standardize etmek amacıyla sabit konsantrasyon ve hacimde internal standart ilave edildi. Tüm örnekler distile su ile belirlenen sabit bir hacme tamamlandı. Daha sonra elde edilen örneklerin LC-MS/MS’de oluşturduğu sinyal değişiklikleri izlendi. Eklenen konsantrasyonlara karşı MMA/d₃-MMA pik alanı oranları ile grafik çizildi. Çizilen grafiğin regresyon denkleminde y’ye 0 değeri verilerek x’i kestiği nokta plazma havuzunun endojen MMA konsantrasyonu olarak belirlendi. Standart ekleme yöntemi için yapılan hazırlıklar **Tablo 7**’de verilmiştir.

Tablo 7. Standart ekleme yönteminin hazırlığı

Plazma havuzu hacmi (µL)	Eklenen standart* hacmi (µL)	Eklenen IS** hacmi (µL)	Eklenen distile su hacmi (µL)	Son konsantrasyon (µmol/L)
100	-	10	90	E
100	20	10	70	E + 0.05
100	40	10	50	E + 0.1
100	60	10	30	E + 0.15
100	80	10	10	E + 0.2

E: Endojen miktar

*Standart konsantrasyonu: 0.5 µmol/L

**IS konsantrasyonu: 2.1 µmol/L

3.6.3.2.3. MMA ve d₃-MMA stok standartlarının hazırlanması

a) MMA stok standartları

MMA ana stok çözeltisi (5 mmol/L)

5.9 mg MMA ($M_A=118.09$ g/mol) tartılarak bir miktar distile su ile çözülüp 10 mL'lik balon joje içine alındı. Distile su ile 10 mL'ye tamamlandı. Ependorflara ayrılarak -20 °C'de saklandı.

MMA ara stok çözeltisi I (200 µmol/L)

Metilmalonik asit ana stok çözeltisinden 80 µL alınıp bir ependorfun içinde 2000 µL'ye plazma havuzu ile tamamlandı. Hazırlanan çözelti doğrusalılık çalışması için kullanıldı. Kalan kısım -20 °C'de saklandı.

MMA ara stok çözeltisi II (50 µmol/L)

MMA kalibrasyon eğrisi çalışmaları için hem distile su ile hem de plazma havuzu ile hazırlandı. Metilmalonik asit ana stok çözeltisinden 10 µL alınıp bir ependorfun içinde 1000 µL'ye distile su veya plazma havuzu ile tamamlandı. Ependorflara ayrılarak -20 °C'de saklandı.

MMA çalışma standart çözeltisi (5 µmol/L)

MMA kalibrasyon eğrisi çalışmaları için hem distile su ile hem de plazma havuzu ile hazırlandı. Metilmalonik asit ara stok çözeltisi II'den 200 µL alınıp bir ependorfun içinde 2000 µL'ye distile su veya plazma havuzu ile tamamlandı. Ependorflara ayrılarak -20 °C'de saklandı.

MMA infüzyon çözeltisi (100 ppb, 0.1 µg/mL)

Distile su ile hazırlanan MMA çalışma standart çözeltisinden 200 µL alınıp bir ependorfun içinde 1180 µL'ye metanol:distile su (50:50 v/v) ile tamamlandı. İnfüzyon çözeltisi MS/MS parametrelerinin optimizasyonu için kullanıldı.

b) Döteryumlu internal standart (d₃-MMA) stok standartları

d₃-MMA ana stok çözeltisi (5 mmol/L)

6.1 mg d₃-MMA ($M_A=121.09$ g/mol) tartılarak bir miktar distile su ile çözülüp 10 mL'lik balon joje içine alındı. Distile su ile 10 mL'ye tamamlandı. Ependorflara ayrılarak -20 °C'de saklandı.

d₃-MMA ara stok çözeltisi I (50 µmol/L)

d₃-MMA ana stok çözeltisinden 100 µL alınıp bir balon joje içinde 10 mL'ye distile su ile tamamlandı. Ependorflara ayrılarak -20 °C'de saklandı.

d₃-MMA ara stok çözeltisi II (5 µmol/L)

d₃-MMA ara stok çözeltisi I'den 1000 µL alınıp bir balon joje içinde 10 mL'ye distile su ile tamamlandı. Ependorflara ayrılarak -20 °C'de saklandı.

d₃-MMA çalışma çözeltisi (2.1 µmol/L)

d₃-MMA ara stok çözeltisi II'den bir beherin içine 5.25 mL alınıp 12.5 mL'ye distile su ile tamamlandı. Ependorflara ayrılarak -20 °C'de saklandı. Hazırlanan internal standart çalışma çözeltisi standart eğrilerinin (su ve plazma havuzu ile hazırlanan) oluşturulmasında, yöntem geçerlilik çalışmalarında, standart ekleme metodunda ve hasta ve kontrol örneklerinin LC-MS/MS ile analizlerinde kullanıldı.

d₃-MMA infüzyon çözeltisi (100 ppb, 0,1 µg/mL)

d₃-MMA çalışma standart çözeltisi'den 500 µL alınıp bir ependorfun içinde 1300 µL'ye metanol:distile su (50:50 v/v) ile tamamlandı. İnfüzyon çözeltisi MS/MS parametrelerinin optimizasyonu için kullanıldı.

3.6.3.2.4. MMA kalibrasyon eğrileri için kullanılan standartların hazırlanması

Dilüent olarak su ya da plazma havuzunun kullanıldığı, artan konsantrasyonda MMA kalibrasyon standartlarının hazırlığı **Tablo 8**'de gösterilmiştir. Her iki dilüent ile hazırlanan kalibrasyon standartlarının ardışık üç günde üç tekrarlı çalışılarak ortalamaları alındı. Kalibrasyon eğrilerinin regresyon denklemlerinin eğim ve kesimi ortalama ± standart sapma (SS) olarak verildi. Matriks etkisini belirlemek için kalibrasyon eğrilerinin eğimleri karşılaştırıldı. Ayrıca, 57 plazma örneğinin MMA konsantrasyonu her iki kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı. Suda hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre elde edilen sonuçlara karşı plazma havuzunda hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre elde edilen sonuçlar grafiğe geçirildi. Elde edilen regresyon denkleminin eğimi ve korelasyon katsayısı değerlendirildi.

Tablo 8. Su ya da plazma havuzu ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinde kullanılan MMA standartlarının hazırlanması

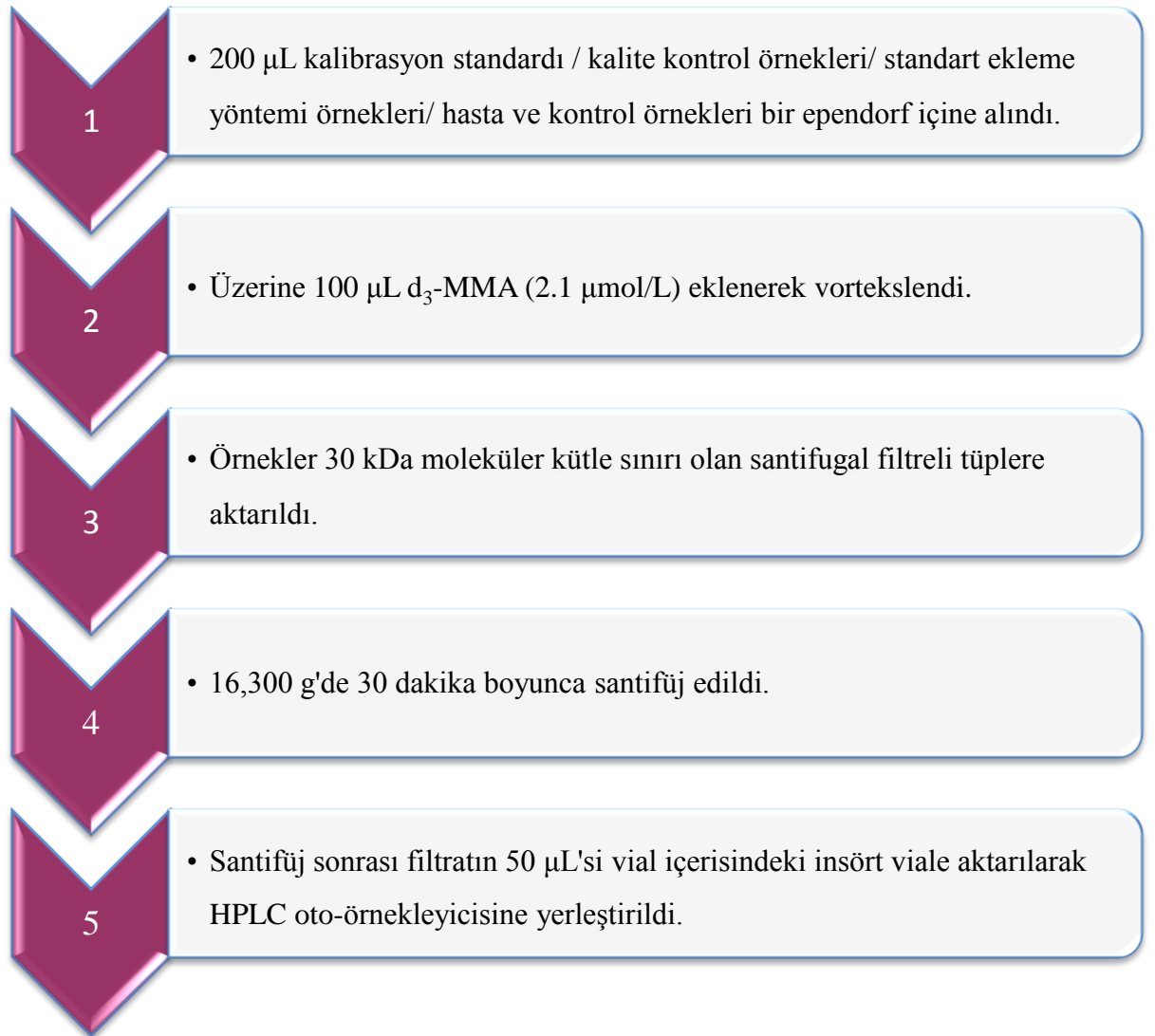
Standart konsantrasyonu ($\mu\text{mol/L}$)	Standart* hacmi (μL)	Dilüent hacmi (μL)
0.05	5	495
0.1	10	490
0.25	20	480
0.5	50	450
1	100	400
2	200	300
2.5	250	250

*Standart konsantrasyonu: 5 $\mu\text{mol/L}$

3.6.3.3. SID-MRM LC-MS/MS ile MMA Analizi İçin Örnek Hazırlığı

Plazma içerisindeki yüksek moleküler ağırlıklı proteinleri uzaklaştırmak amacıyla deproteinizasyon işlemi yapıldı. Deproteinizasyon, moleküler ağırlığı 30 kDa'nın altındaki moleküllerin geçişine izin veren santifugal filtreli ultrafiltrasyon tüpleri kullanılarak gerçekleştirildi.

MMA'nın plazma havuzu ile hazırlanan kalibrasyon standartları, kalite kontrol örnekleri, standart ekleme yöntemi için hazırlanan örnekler, hasta ve kontrol örnekleri aşağıdaki prosedüre göre LC-MS/MS analizine hazırlandı (Şekil 14).



Şekil 14. LC-MS/MS'de MMA analizi için örnek hazırlığı basamakları

3.6.3.4. Yöntem Geçerlilik Çalışmaları

Biyoanalitik yöntem geçerliliği, bir analitin ya da analit serisinin konsantrasyonunun bir biyolojik matrikste kantitatif olarak saptanması için kullanılan yöntemin güvenilir olduğunun gösterilmesi amacıyla yapılmaktadır. MMA yöntem geçerlilik çalışmaları için FDA'nın "Biyoanalitik Yöntem Geçerliliği" yönergesi ve literatürdeki MMA yöntem çalışmaları esas alınmıştır (104, 107, 159).

3.6.3.4.1. Analitik duyarlılık

Analitik duyarlılık ölçüm cihazının birim konsantrasyon için verdiği sinyal büyüklüğüdür. Duyarlılık, üç tekrarlı günde çalışılan plazma havuzu ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinin eğimi (ortalama \pm SS) ile belirlendi.

3.6.3.4.2. Doğruluk

Analitik bir metodun doğruluğu, bir analitin ölçülen ortalama değerinin gerçek değere olan yakınlığı olarak tanımlanır. Doğruluk, bilinen konsantrasyonda analit içeren örneğin tekrarlanan analizleri ile belirlenir. Analitik doğruluğun kabul edilebilir sınırı ölçülen ortalama değer analitin gerçek değerinin \pm %15'i içinde olmasıdır. MMA yönteminin doğruluğu, ardışık üç günde üç tekrarlı olarak çalışılan kalibrasyon standartlarının ortalamaları alınarak hesaplandı.

3.6.3.4.3. Doğrusallık

Doğrusallık, analitik ölçüm aralığında, ölçülen ve beklenen değerler arasındaki ilişki olarak adlandırılır. MMA yönteminin doğrusallık çalışması için ara stok çözeltisi I (200 μ mol/L) kullanılarak plazma havuzu ile 10-200 μ mol/L konsantrasyon aralığında yedi farklı standart hazırlandı (**Tablo 9**). Her standart üç tekrarlı çalışılarak ortalamaları alındı.

Tablo 9. MMA doğrusallık çalışması standartlarının hazırlanması

Standart konsantrasyonu ($\mu\text{mol/L}$)	Standart* hacmi (μL)	Plazma havuzu hacmi (μL)
10	20	380
25	50	350
50	100	300
100	200	200
125	250	150
150	300	100
200	400	-

*Standart konsantrasyonu: 200 $\mu\text{mol/L}$

3.6.3.4.4. Kesinlik

Kesinlik, homojen bir biyolojik matriksin tekrarlı ölçümlerinin birbirine olan yakınlığıdır. Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları plazma havuzu kullanılarak hazırlanan düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda üç farklı kalite kontrol örneği ile gerçekleştirildi (**Tablo 10**). Her düzeydeki kalite kontrol örneği ile gün içi tekrarlanabilirlik için, bir gün içinde 10 tekrarlı okuma, günler arası tekrarlanabilirlik için 10 ardışık günde birer okuma yapılarak yöntemin kesinliği hesaplandı. Kesinlik %CV olarak ifade edildi.

Tablo 10. MMA kalite kontrol örneklerinin hazırlanması

Kalite kontrol örneği konsantrasyonu ($\mu\text{mol/L}$)	Standart* hacmi (μL)	Plazma havuzu hacmi (μL)
0.3	30	471
1.5	150	345
2.5	250	250

*Standart konsantrasyonu: 5 $\mu\text{mol/L}$

3.6.3.4.5. Tespit limiti ve kantitasyon limiti

Kütle spektrometresinde uygulanan biyoanalitik bir yöntemde tespit limiti (LOD), mobil faz vb. etkilerden kaynaklanan arka plan gürültüsünden farklı olarak tespit edilen ancak miktarı belirlenemeyen en küçük analit konsantrasyonudur. Kantitasyon limiti (LOQ) ise, uygun doğruluk ve kesinlik sınırları içinde, bir örnekteki analitin kantitatif olarak tespit edilebilen en düşük konsantrasyonudur. LOD ve LOQ belirlenmesinde kromatografik ölçümlerde pratik bir kural olan sinyal/gürültü oranı (S/N) kullanıldı. Bunun için plazma havuzunun seri dilüsyonları ile çalışıldı. S/N>3 olduğu konsantrasyon LOD, S/N>10 olduğu konsantrasyon ise LOQ olarak belirlendi.

3.6.3.4.6. Geri kazanım

Bir analitin geri kazanımı, biyolojik matrikse eklenen analitin dedektör cevabı ile gerçek konsantrasyondan elde edilen cevabın karşılaştırılmasıdır. Geri kazanım çalışması için plazma havuzunda hazırlanan bir standart (0.24 µmol/L) düşük ve yüksek konsantrasyonlu iki plazma örneğine (0.17 µmol/L ve 0.89 µmol/L) eklendi. Geri kazanımın hesaplanması aşağıdaki formüle göre yapıldı.

$$\% \text{ Geri kazanım} = \frac{(\text{Ölçülen konsantrasyon} - \text{Başlangıç konsantrasyonu})}{\text{Eklenen konsantrasyon}} \times 100$$

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Hasta örneklerinin toplanması	Mart 2011-Mart 2012
Kontrol örneklerinin toplanması	Eylül 2011-Mart 2012
Optimizasyon çalışmaları	Temmuz 2011-Mart 2012
Yöntem geçerlilik çalışmaları	Mart-Nisan 2012
Hasta ve kontrol örneklerinin çalışılması	Nisan-Mayıs 2012
Tez yazımı	Aralık 2011-Temmuz 2012

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

İstatistiksel analizler, SPSS 15.0 programı ile yapıldı. Veriler ortanca ve en düşük-en yüksek değer olarak verildi. Grup oranlarının karşılaştırılmasında ki-kare testi, gözlerde beklenen değerler 5'in altında ise Fisher'in kesin testi, grup ortancalarının karşılaştırılmasında ise "nonparametrik" testler (Kruskal Wallis testi, Mann-Whitney U-testi) kullanıldı. İki grup arasındaki bağıntının araştırılması Spearman korelasyon testi ile yapıldı. Metilmalonik asit'in B12 vitamini'ne göre tanı koymadaki değerinin araştırılmasında McNemar Ki-kare testi ve Mantel-Haenszel (MH)'in Olasılıklar Oranı kullanıldı (160). $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Kontrol ve hasta grubunun sayısının göreceli az olması çalışmanın istatistiksel olarak kısıtlı yönüdür.

Kullandığımız SID-MRM LC-MS/MS yönteminde MMA analizi ile aynı anda homosistein kantitasyonu yapılabilmesine karşın, homosistein için gerekli olan internal standardın alınamaması nedeniyle homosistein ölçümleri bu yöntemle yapılamamış, Merkez Laboratuvarı'nda rutin analiz yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

3.10. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma için, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 25.02.2011 tarihli ve 88-GOA protokol numaralı 2011/05-10 karar numarası ile etik kurul onayı alınmıştır (**EK 1**).

4. BULGULAR

4.1. LC-MS/MS ile MMA Analiz Koşullarının Optimizasyonu Çalışmaları

4.1.1. Bileşik ve İyonizasyon Kaynağı Bağımlı Parametrelerin Belirlenmesi

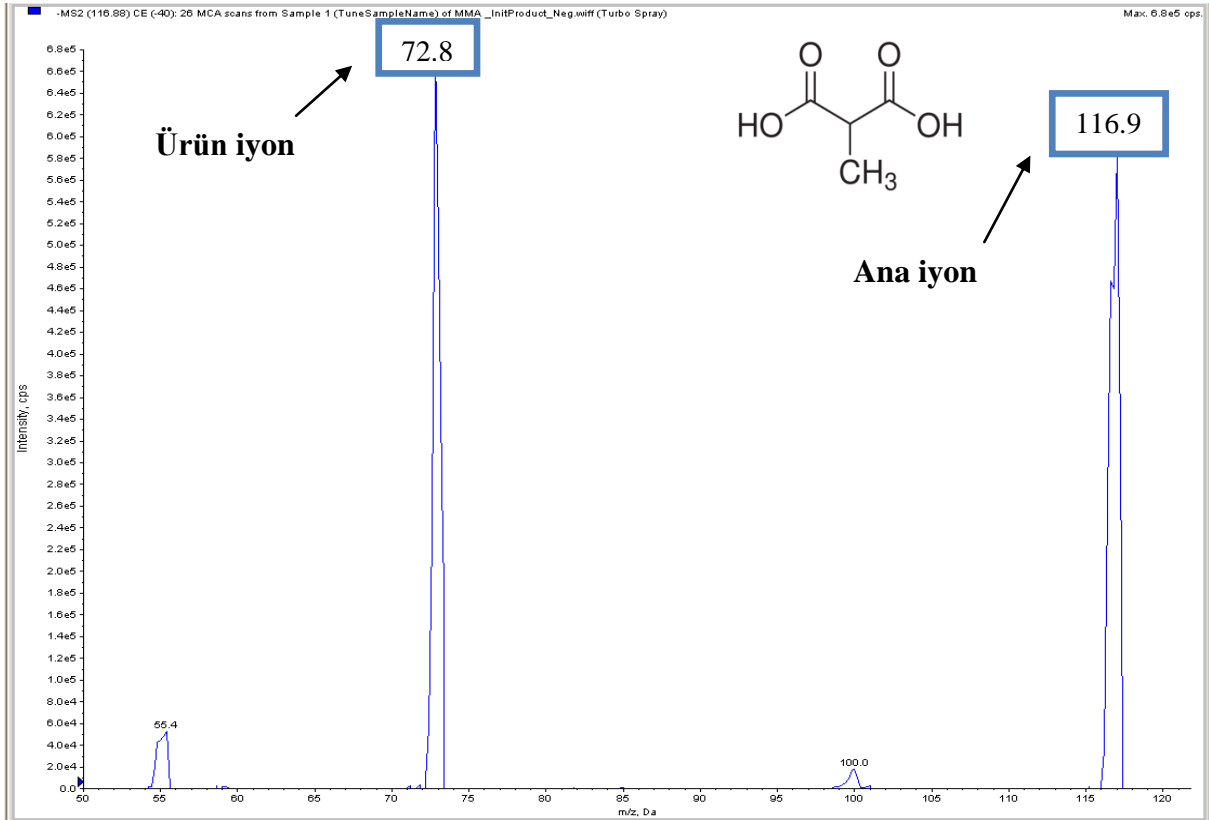
MMA ve d₃-MMA standartlarından hazırlanan infüzyon çözeltileri (100 ppb) ile gerçekleştirilen, çalışma koşullarımızda belirlediğimiz bileşik ve iyonizasyon kaynağı bağımlı parametreler **Tablo 11**'de gösterilmektedir.

Tablo 11. MS/MS sisteminin MMA ve d₃-MMA analizi için optimizasyon koşulları

Parametreler	MMA	d ₃ -MMA
<i>Bileşik-bağımlı</i>		
Ana iyon (m/z)	116.9	119.9
Ürün iyon (m/z)	72.8	75.9
Dwell time (ms)	150	150
DP	-35	-30
EP	-10	-10
CE	-14	-14
CXP	-1	-1
Polarite	Negatif	Negatif
<i>İyonizasyon kaynağı-bağımlı</i>		
Curtain gaz (psi)	10	10
CAD	Medium	Medium
İyon sprej voltajı (V)	-4500	-4500
Sıcaklık (°C)	525	525
Nebulizer gaz (psi)	50	50
Kurutucu gaz (psi)	60	60

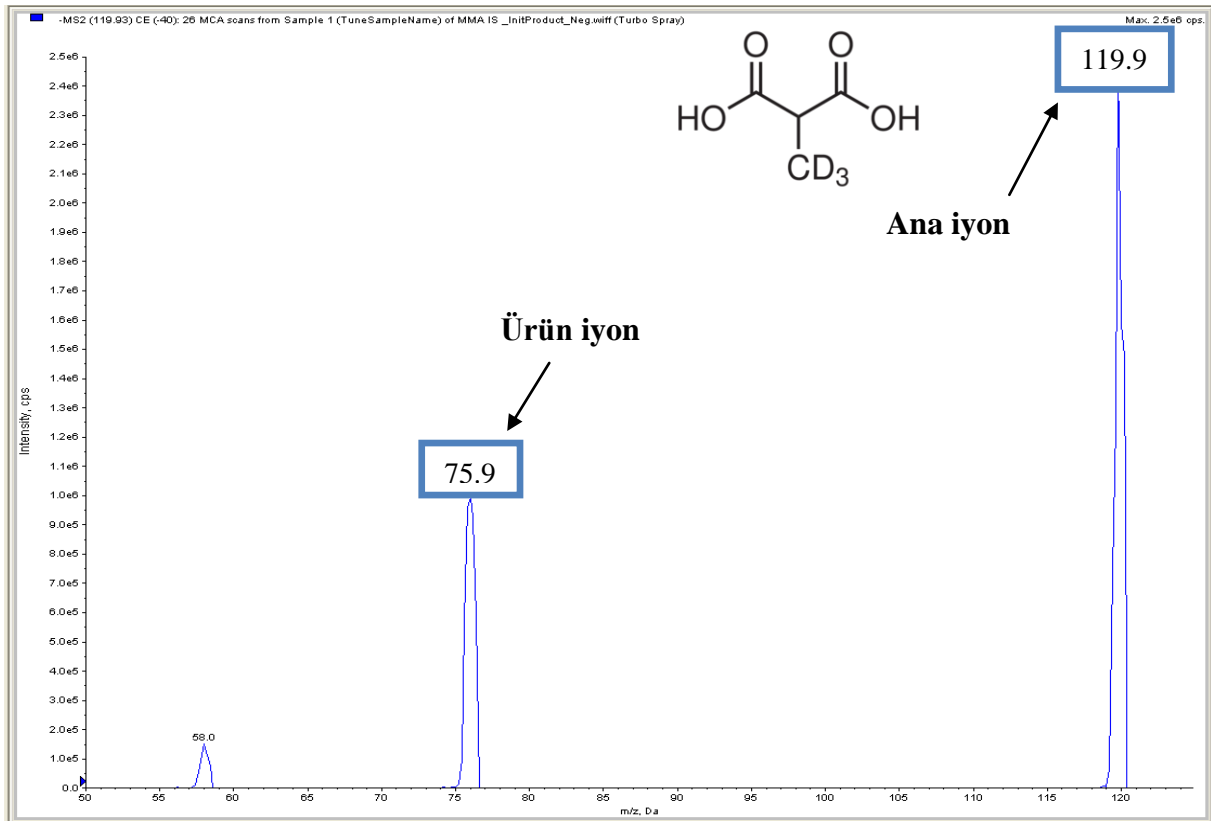
4.1.2. İzlenecek Ana İyon/Ürün İyon İkilerinin Seçimi

Çalışma koşullarımızda MMA ve d₃-MMA için ana iyon ve en yüksek intensiteye sahip ürün iyon ikilisi MMA standardının ve internal standardın MS'e infüzyonu ile belirlendi. Bir dikarboksilik asit olan MMA'nın ana iyonu kütle spektrometresindeki iyonizasyonu sırasında yapısından bir H atomunun ayrılmasıyla oluşur. Çalışmamızda oluşan ana iyon için izlenecek m/z değeri 116.9 olarak belirlendi. MMA ana iyonunun parçalanması ile yapısından bir karboksil grubu (46 Da) ayrılması sonucu oluşan ve en yüksek intensiteyi veren 72.8 iyonu ürün iyon olarak seçildi. MMA için izlenecek MRM ana iyon/ürün iyon ikilisi 116.9→72.8 olarak belirlendi (Şekil 15).



Şekil 15. MMA için ESI-MS/MS ürün iyon kütle spektrumu

Döteryumlu MMA internal standardı, MMA standardından farklı olarak metil ($-\text{CH}_3$) grubundaki ^1H atomlarının yerine ^2H atomu bulundurduğu için moleküler kütlesi MMA'dan üç Da fazladır. Döteryumlu MMA için ana iyon m/z değeri 119.9 olarak belirlendi. Ana iyonun parçalanma karakteristiği MMA ile aynı olduğu için yapısından bir karboksil grubu (HCOOH) kopar. Döteryumlu MMA için karakteristik ürün iyon m/z 75.9 olarak seçildi. Döteryumlu MMA internal standardı için izlenecek MRM ana iyon/ürün iyon ikilisi 119.9 \rightarrow 75.9 olarak belirlendi (**Şekil 16**).

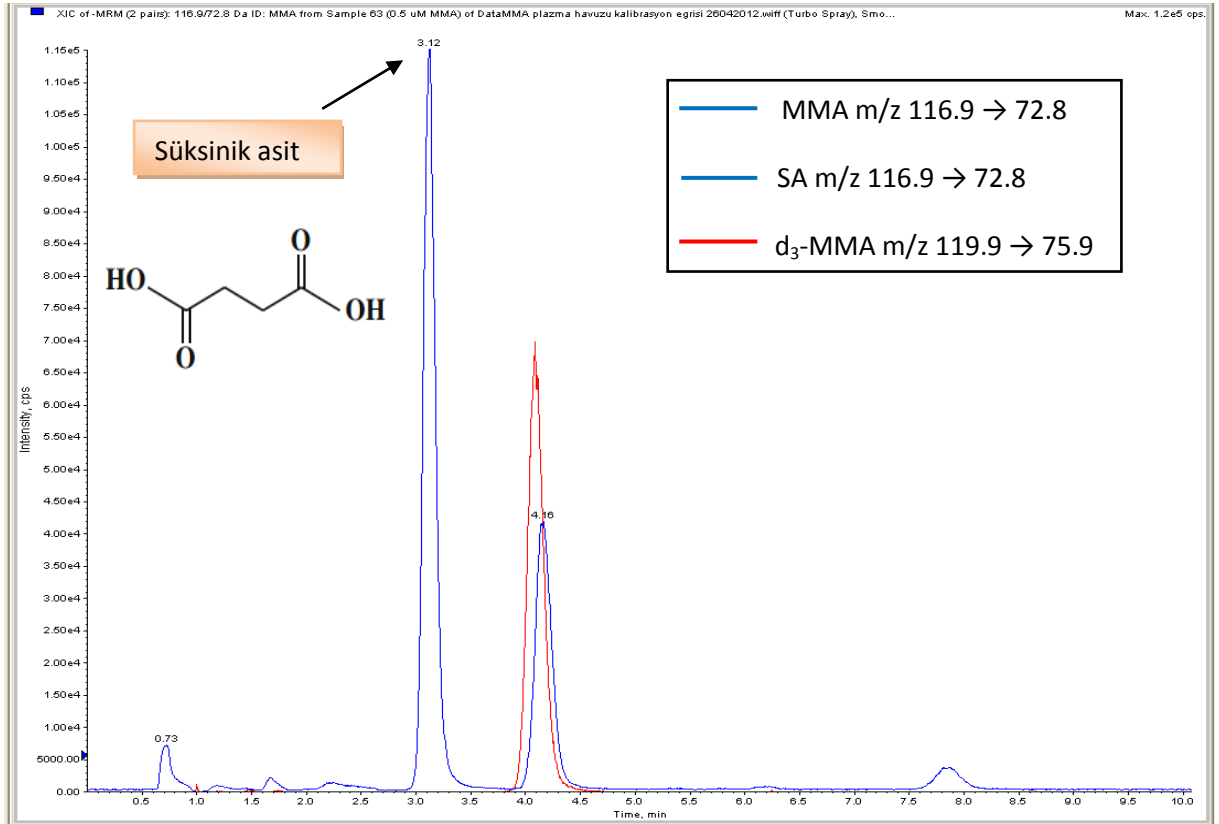


Şekil 16. d₃-MMA için ESI-MS/MS ürün iyon kütle spektrumu

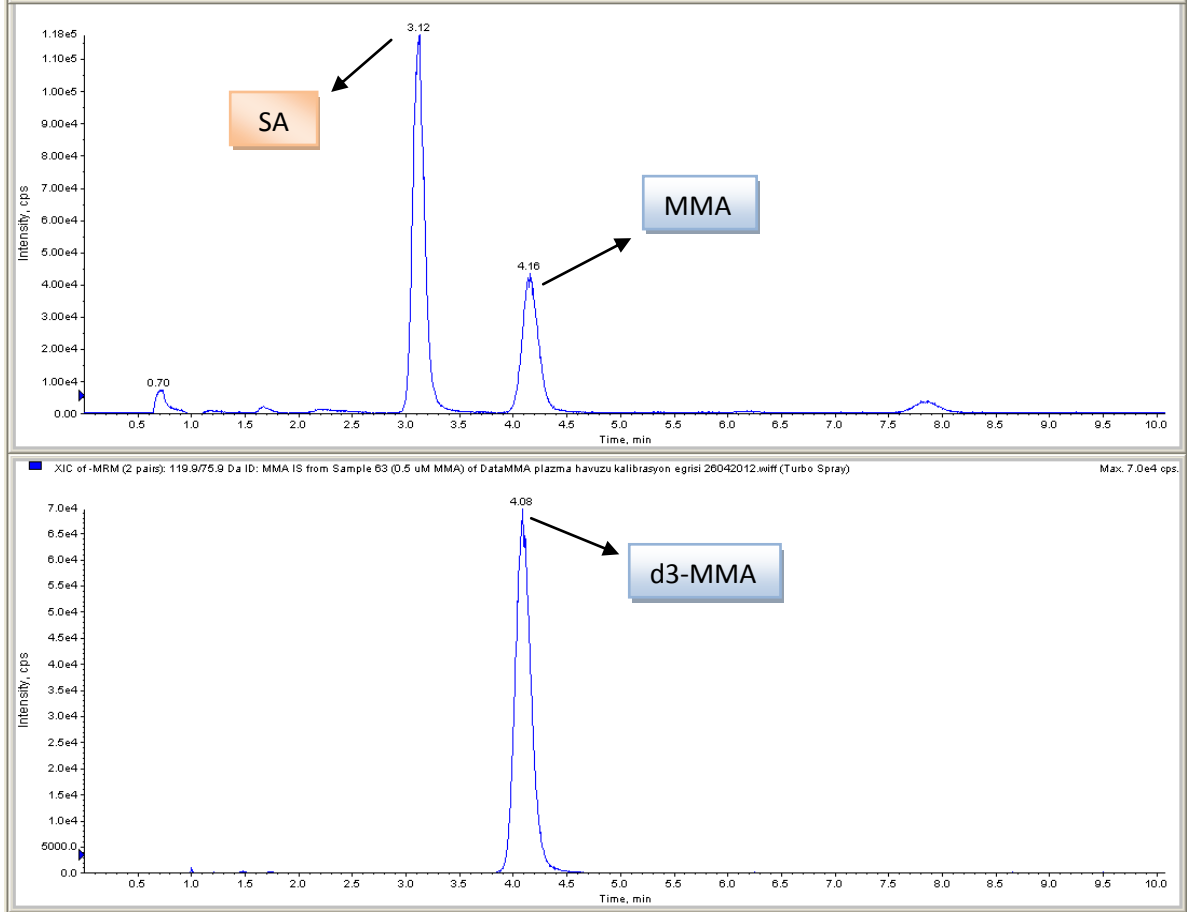
4.1.3. MMA ve d₃-MMA Kromatografik Retansiyon Zamanlarının Belirlenmesi

Şekil 17’de plazma havuzunda hazırlanan ve d₃-MMA içeren (2.1 µmol/L) MMA standardına (0.5 µmol/L) ait total iyon kromatogramı (TIC), Şekil 18’de MMA ve d₃-MMA’ya ait ayrı ayrı iyon kromatogramları (ekstrakte iyon kromatogramı, XIC) gösterilmiştir. MMA ve d₃-MMA için retansiyon zamanları sırasıyla 4.16 dk ve 4.08 dk olarak belirlendi.

MMA’nın yapısal izomeri olan süksinik asit (SA) ve diğer düşük moleküler ağırlıklı organik asitler biyolojik sıvılardaki MMA’nın kütle spektrometrik analizinde potansiyel girişim kaynaklarıdır (19, 103). SA, MMA ile aynı moleküler ağırlığa, aynı ana iyon ve ürün iyon m/z değerine sahiptir. Bu nedenle kütle spektrometrik ayrımları zordur. Ancak, MS öncesinde gerçekleştirilen kromatografik ayırlama sayesinde SA’dan kaynaklanabilecek interferans elimine edilmiş olur. Bizim çalışmamızda da SA’nın alıkonma zamanı 3.12 dk olarak belirlendi. Böylelikle, SA, MMA’dan 1.04 dk fark ile ayrılmış oldu.



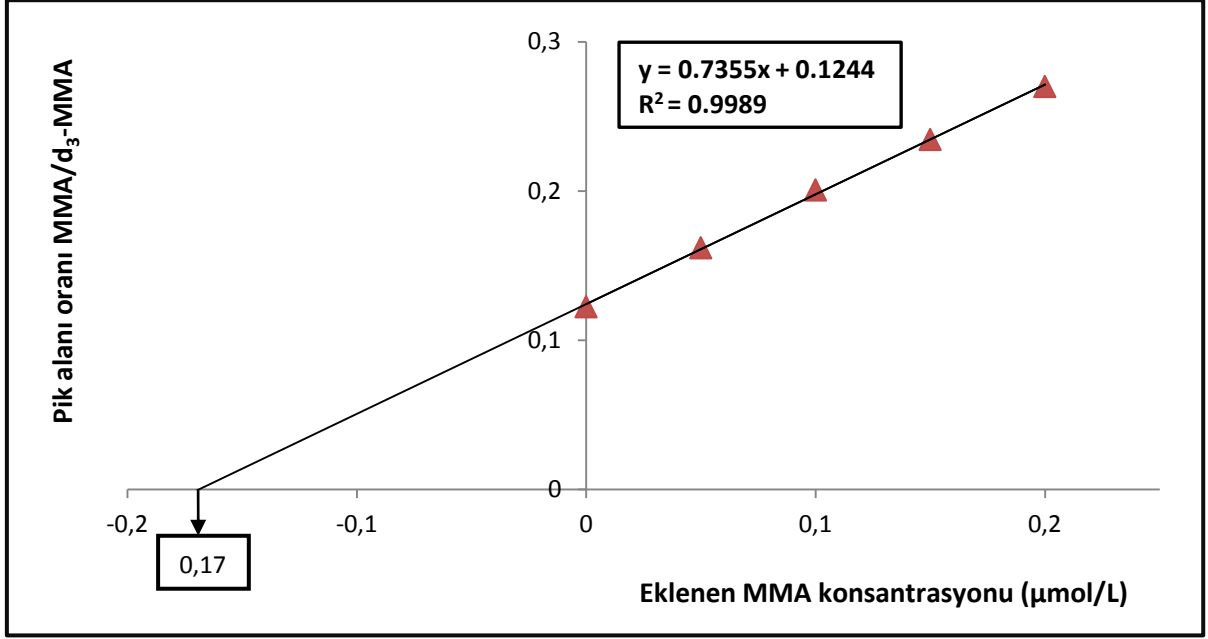
Şekil 17. MMA’nın plazma havuzu ile hazırlanan 0.5 µmol/L standardına ait total iyon kromatogramı (MMA; RT: 4.16 dk, d₃-MMA; RT: 4.08 dk, SA; RT: 3.12 dk)



Şekil 18. MMA'nın plazma havuzu ile hazırlanan 0.5 µmol/L standardına ait ekstrakte iyon kromatogramı

4.2. Plazma Havuzunun Endojen MMA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Standart ekleme yöntemi ile plazma havuzunun endojen MMA konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla, eklenen konsantrasyonlara karşı MMA/d₃-MMA pik alanı oranlarına göre grafik çizildi (Şekil 19). Elde edilen grafiğin regresyon denkleminde y'ye 0 değeri verilerek plazma havuzunun endojen MMA miktarı 0.17 µmol/L olarak bulundu.



Şekil 19. Standart ekleme yöntemi için hazırlanan grafik

4.3. MMA Kalibrasyon Eğrileri ve Karşılaştırılması

4.3.1. MMA Kalibrasyon Eğrileri

Standart dilüenti olarak su ya da plazma havuzu kullanılarak hazırlanan ve ardışık üç günde üçer tekrarlı olarak çalışılan kalibrasyon standartlarına ait LC-MS/MS’de elde edilen MMA/d₃-MMA pik alanı oranları ve kalibrasyon eğrileri sırasıyla **Tablo 12**, **Tablo 13** ve **Şekil 20**, **Şekil 21**’de gösterilmiştir. Plazma havuzu ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi, plazma havuzunun standart ekleme yöntemi ile bulunan endojen MMA konsantrasyonu (0.17 µmol/L) tüm standartlardan çıkartılarak çizildi.

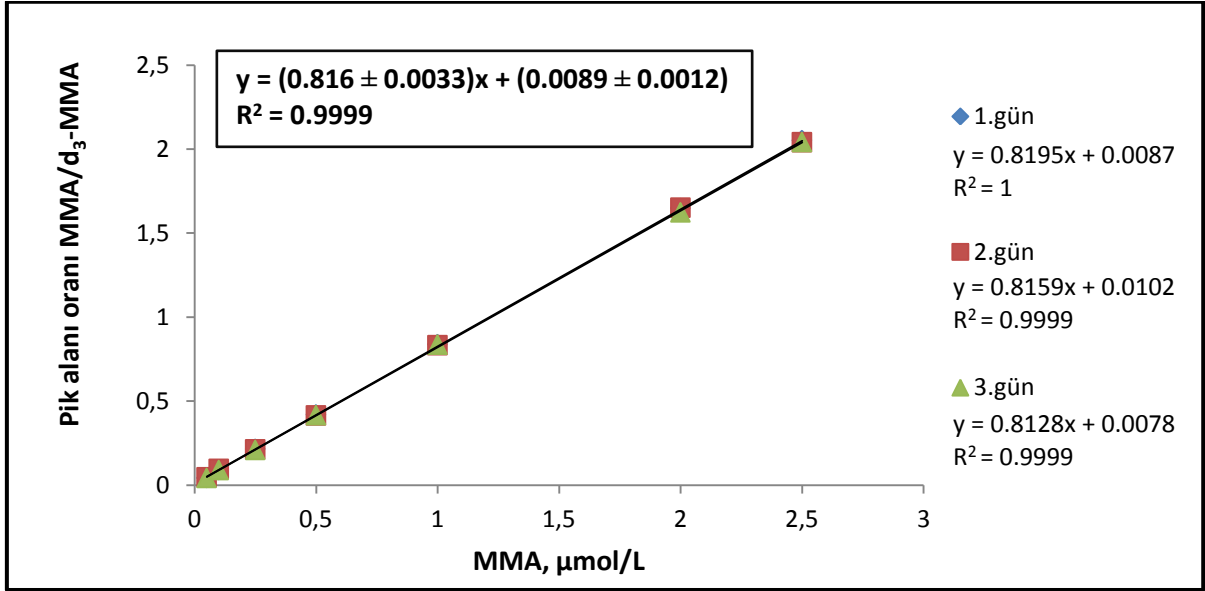
Tablo 12. Su ile hazırlanan MMA kalibrasyon eğrisi çalışmasının sonuçları

Konsantrasyon (µmol/L)	MMA/d ₃ -MMA pik alanı oranı (n=3)			Ortalama pik alanı (n=9)
	1.gün	2.gün	3.gün	
0.05	0.04	0.05	0.04	0.04
0.1	0.09	0.10	0.09	0.09
0.25	0.22	0.21	0.21	0.21
0.5	0.42	0.41	0.42	0.42
1	0.84	0.83	0.84	0.84
2	1.65	1.65	1.62	1.64
2.5	2.05	2.04	2.04	2.05

Tablo 13. Plazma havuzu ile MMA kalibrasyon eğrisi çalışmasının sonuçları

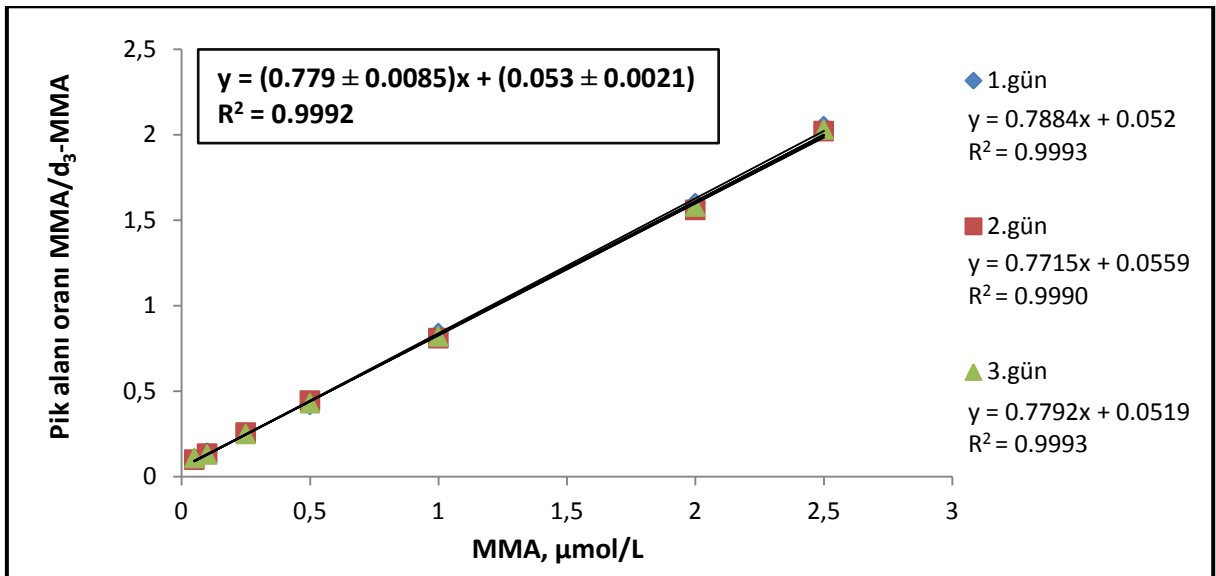
Konsantrasyon (µmol/L)	MMA/d ₃ -MMA pik alanı oranı (n=3)			Ortalama pik alanı (n=9)
	1.gün	2.gün	3.gün	
0.05	0.10	0.10	0.11	0.10
0.1	0.14	0.14	0.13	0.14
0.25	0.26	0.26	0.25	0.26
0.5	0.42	0.45	0.43	0.43
1	0.84	0.81	0.82	0.82
2	1.60	1.56	1.58	1.58
2.5	2.05	2.02	2.03	2.03

Su ile hazırlanan MMA kalibrasyon eğrisine ait regresyon denklemi $y = (0.816 \pm 0.0033)x + (0.0089 \pm 0.0012)$ ve korelasyon katsayısı (R^2) değeri 0.9999'dur. Eğimin varyasyon katsayısı (CV) %0.41, kesimin CV'si %13.62 ve korelasyon katsayısının CV'si %0.005 olarak bulunmuştur.



Şekil 20. MMA'nın su ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi

Plazma havuzu ile hazırlanan kalibrasyon eğrisine ait regresyon denklemi $y = (0.779 \pm 0.0085)x + (0.053 \pm 0.0021)$ ve korelasyon katsayısı (R^2) değeri 0.9992'dir. Eğimin, kesimin ve korelasyon katsayısının CV'leri sırasıyla %1.08, %4.28 ve %0.017'dir.



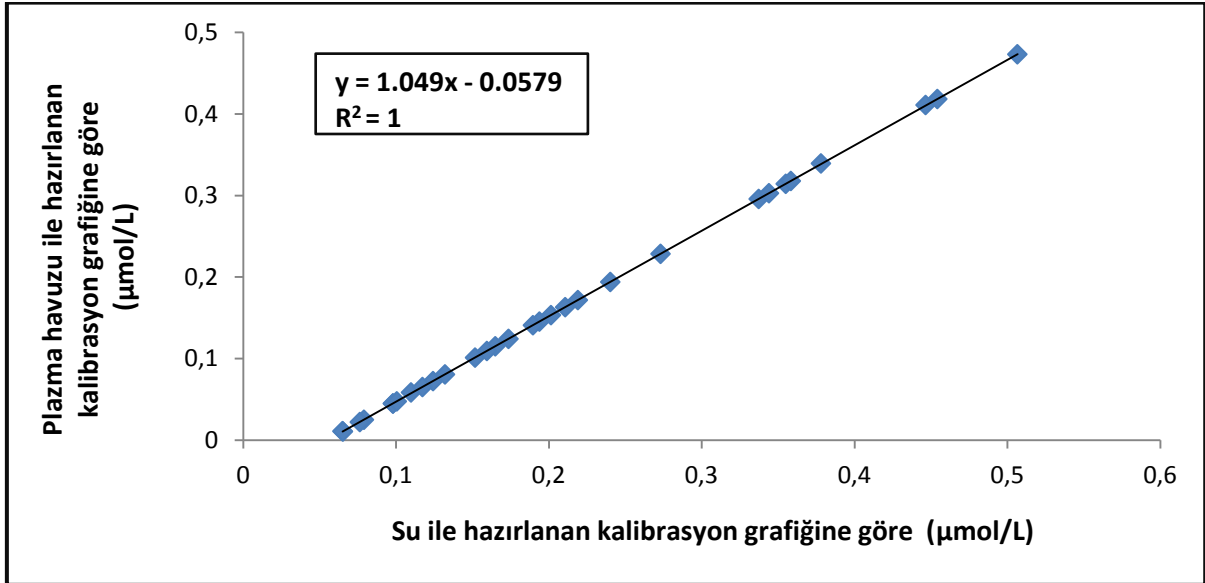
Şekil 21. MMA'nın plazma havuzu ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi

4.3.2. MMA Kalibrasyon Eğrilerinin Karşılaştırılması

Her iki kalibrasyon eğrisine ait R^2 değerleri 0.9990'dan büyük idi. İki kalibrasyon eğrisinin eğimleri arasında önemli bir fark bulunmadı. (suda 0.816 ± 0.0033 , plazma havuzunda 0.779 ± 0.0085). Ancak, plazma havuzu ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinin eğimi su ile hazırlanan eğrinin eğimine göre göreceli olarak düşük bulundu. Eğimin bu göreceli düşüklüğü plazma gibi kompleks bir matrikste hazırlanan kalibrasyon eğrisi için beklenen bir durumdur.

Ayrıca çalışmamızda 57 plazma örneğinin MMA konsantrasyonu her iki kalibrasyon eğrisi ile hesaplandı (**Şekil 22**). Suda hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre elde edilen sonuçlara karşı plazma havuzunda hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre elde edilen sonuçlar grafiğe geçirildi. İki kalibrasyon eğrisi ile de hesaplanan sonuçlar birbiri ile uyumlu bulundu (Eğim 1.049 ve $R^2 = 1$).

Sonuç olarak, her iki kalibrasyon eğrisi bu çalışma için uygun bulunmuştur. Ancak, olası interferanslara karşı ve literatürdeki çalışmalarda ağırlıklı olarak plazma havuzu veya diyalize plazma ile hazırlanmış kalibrasyon eğrilerinin tercih edilmesi nedeniyle çalışmanın geri kalan kısmı plazma havuzu ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi esas alınarak gerçekleştirildi (19, 35, 103-105, 107).



Şekil 22. Plazma örneklerindeki MMA konsantrasyonlarının iki farklı kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılması

4.4. Yöntem Geçerlilik Çalışmaları

4.4.1. Analitik Duyarlılık

MMA analizi için kullanılan yöntemin analitik duyarlılığı, üç tekrarlı çizilen kalibrasyon eğrisinin eğim ortalaması \pm SS ile ifade edildi (**Şekil 21**). Kalibrasyon eğrisinin eğimi 0.779 ± 0.0085 , varyasyon katsayısı (CV) %1.08 olarak hesaplandı. Korelasyon katsayısı (R^2) ise 0.9992 bulundu. Bu sonuçlar MMA analiz yönteminin yeterli lineeriteye sahip olduğunu ve düşük standart sapma değeri de analitik prosedürün tekrarlanabilirliğinin yeterliliğini göstermiş oldu.

4.4.2. Doğruluk

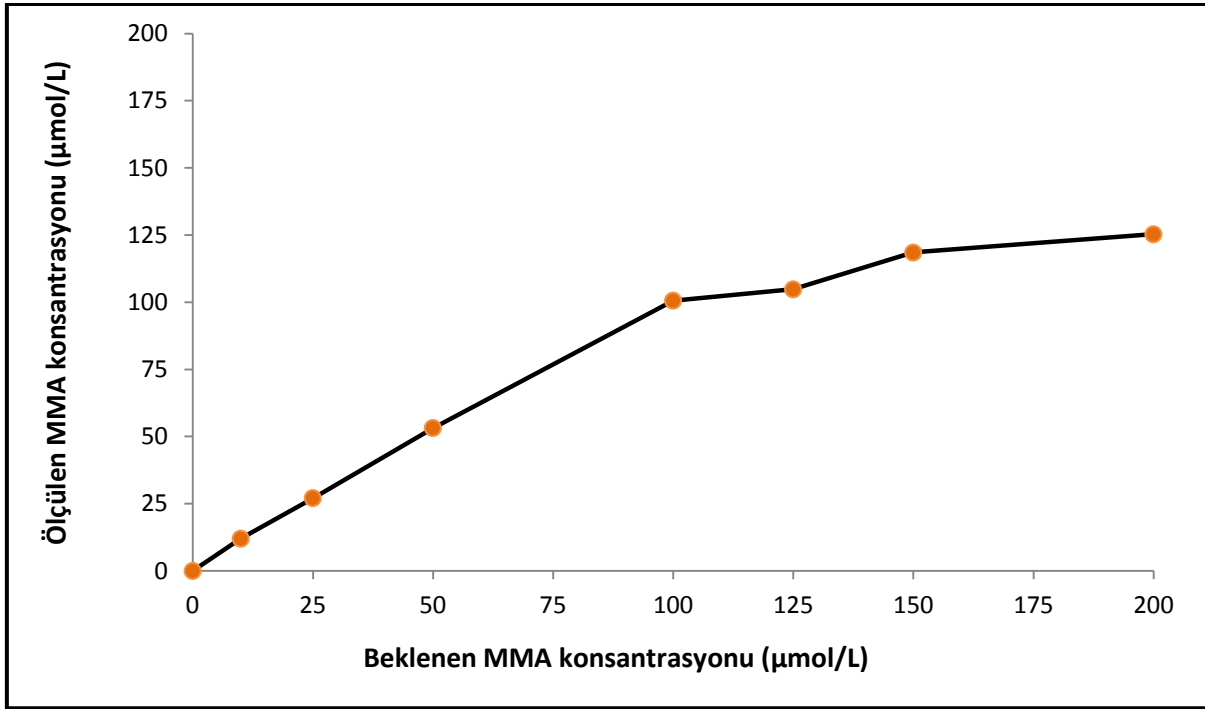
MMA'nın plazma havuzu ile hazırlanan 0.05–2.5 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonları arasındaki standartların ardışık üç günde üç tekrarlı olarak çalışılması ile elde edilen % doğruluk değerleri **Tablo 14**'de verilmiştir. Tüm standartların doğruluğu $\%100 \pm 4$ arasında bulunmuştur.

Tablo 14. MMA'nın plazma havuzu ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi standartlarının doğruluğu

Gerçek konsantrasyon ($\mu\text{mol/L}$)	% Doğruluk (n=3)			Ortalama % doğruluk (n=9)
	1.gün	2.gün	3.gün	
0.05	94.4	102.1	114.3	103.6
0.1	105.7	96.8	92.1	98.2
0.25	105.3	103.0	99.2	102.5
0.5	96.1	99.9	94.6	96.9
1	97.5	97.8	98.4	97.9
2	98.5	98.1	98.7	98.4
2.5	102.3	102.0	102.7	102.3

4.4.3. Doğrusallık

MMA doğrusallık çalışması için 10-200 $\mu\text{mol/L}$ aralığındaki yedi farklı standart kullanıldı. Her standart üç tekrarlı çalışıldı. Doğrusallık grafiği beklenen MMA konsantrasyona karşı ölçülen MMA konsantrasyonu olarak çizildi (Şekil 23). Çizilen grafikten yöntemin 100 $\mu\text{mol/L}$ 'ye kadar doğrusal olduğu belirlendi.



Şekil 23. MMA yönteminin doğrusallık grafiği

4.4.4. Kesinlik

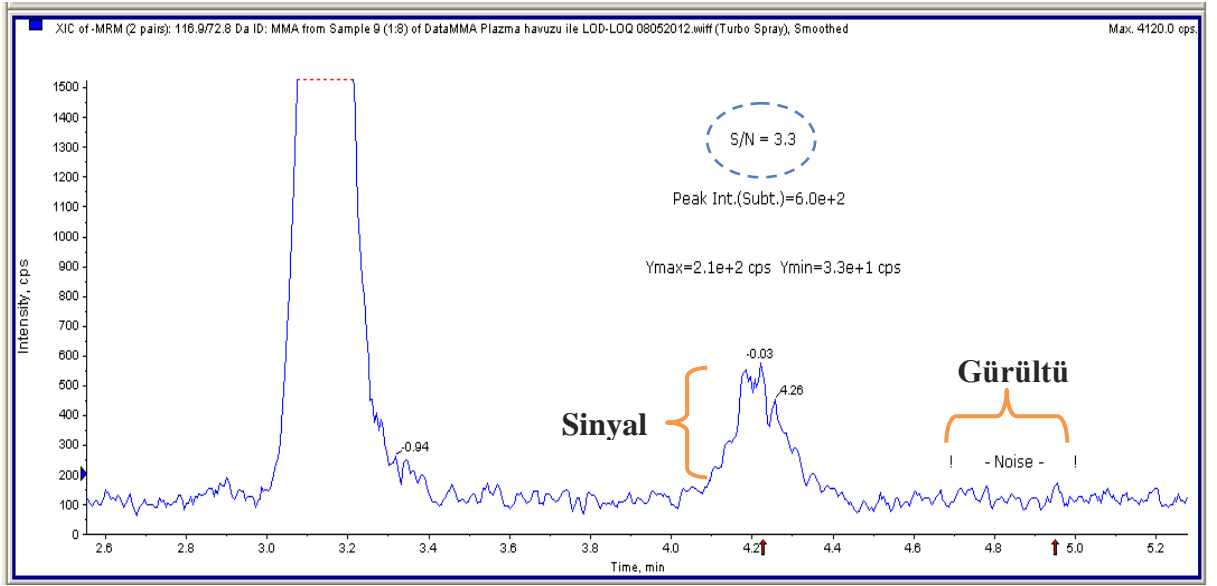
Düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda hazırlanan kalite kontrol örnekleri kullanılarak gerçekleştirilen kesinlik çalışmasında her bir kalite kontrol örneği için gün içi kesinlik %4'ün altında, günler arası kesinlik ise %6'dan küçük olarak bulundu (Tablo 15).

Tablo 15. MMA kalite kontrol örnekleri ile yapılan gün içi ve günler arası kesinlik çalışması

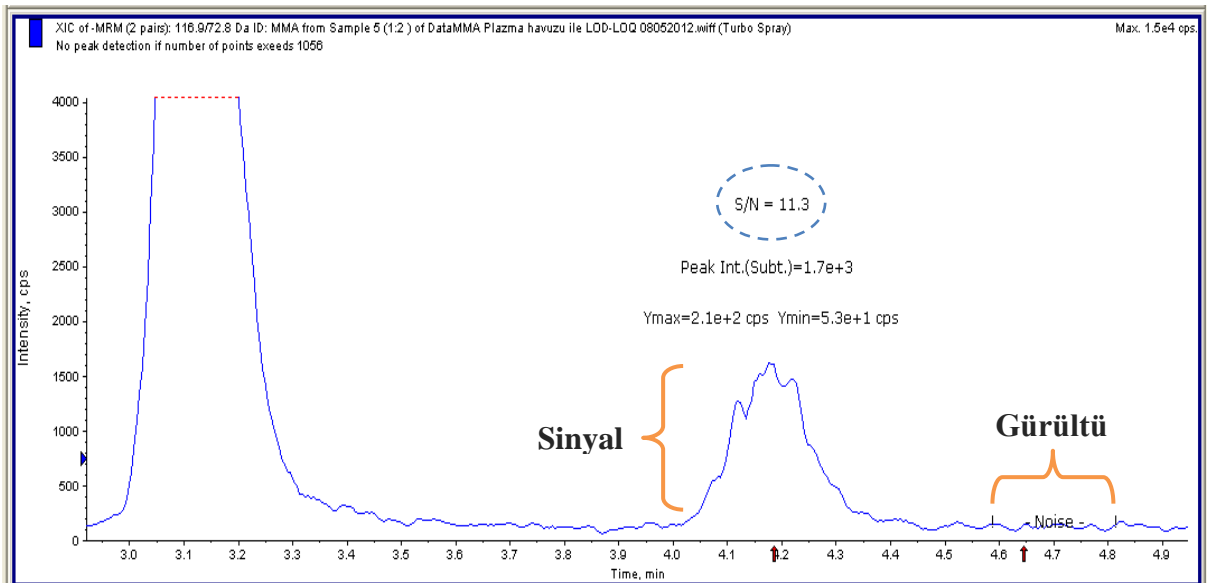
Kalite kontrol düzeyi	Gün içi kesinlik (n=10)	Günler arası kesinlik (n=10)
	%CV	%CV
Düşük (0.3 $\mu\text{mol/L}$)	2.40	5.19
Orta (1.5 $\mu\text{mol/L}$)	3.80	5.69
Yüksek (2.5 $\mu\text{mol/L}$)	3.24	5.36

4.4.5. Tespit Limiti ve Kantitasyon Limiti

LC-MS/MS’de MMA için sinyal/gürültü oranının (S/N)>3 olduğu konsantrasyon, tespit limiti; S/N>10 olduğu konsantrasyon ise kantitasyon limiti olarak belirlendi. Plazma havuzunun 1:8 dilüsyonlu örneğinin üç tekrarlı çalışılması sonucunda S/N oranı 3.3 olarak bulundu (Şekil 24). Plazma havuzunun 1:2 dilüsyonlu örneğinin üç tekrarlı çalışılması ile S/N oranı 11.3 olarak belirlendi (Şekil 25). Tespit limiti 0.021 µmol/L, kantitasyon limiti 0.085 µmol/L olarak hesaplandı (Tablo 16).



Şekil 24. LOD için plazma havuzunun 1:8 dilüsyonu ile elde edilen S/N oranı



Şekil 25. LOQ için plazma havuzunun 1:2 dilüsyonu ile elde edilen S/N oranı

Tablo 16. MMA yönteminin tespit ve kantitasyon limitleri

Dilüsyon faktörü	Plazma havuzu (n=3)	
	S/N oranı	MMA konsantrasyonu (µmol/L)
1	22.5	0.17
2	11.3	0.085
4	5.4	0.043
8	3.3	0.021

4.4.6. Geri Kazanım

Düşük (0.17 µmol/L) ve yüksek konsantrasyonlu (0.89 µmol/L) iki plazma örneği içine 0.24 µmol/L standardın eklenmesiyle elde edilen geri kazanım sırasıyla %87.6 ve %86.4 olarak bulundu (**Tablo 17**).

Tablo 17. MMA yönteminin geri kazanımı

Eklenen (µmol/L)	Düşük konsantrasyonlu plazma örneği (n=3)		Yüksek konsantrasyonlu plazma örneği (n=3)	
	Ölçülen (µmol/L)	% Geri kazanım	Ölçülen (µmol/L)	% Geri kazanım
0	0.17	-	0.89	-
0.24	0.38	87.6	1.10	86.4

4.5. Fenilketonüri ve Kontrol Gruplarına Ait Bulgular

4.5.1. FKÜ ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması

4.5.1.1. Tanımlayıcı bulgular

Çalışmaya 31 hasta ve 26 sağlıklı çocuk dahil edildi. 20 FKÜ'li (%64.5) erkek, 11 (%35.5) kız hastadan oluşan olgu grubunun yaşlarının ortancası 10.0 yıl bulundu. Kontrol grubunda ise yaşları ortancası 8.25 yıl olan 11'i (%42.3) erkek, 15'i (%57.7) kız toplam 26 çocuk bulunmaktaydı. FKÜ'li hastalar ile kontrol grubu arasında yaş ve cinsiyet açısından fark yoktu (sırasıyla $p=0.431$, $p=0.115$) (**Tablo 18**).

Çalışmamız için hazırlanan veri kayıt formlarına hasta ve kontrollerin vücut ağırlıkları, boyları ve boya göre ağırlık yüzdeleri kaydedildi. Kontrol grubundaki bir hastanın antropometrik bilgileri alınamadı. Bu nedenle 25 birey üzerinden değerlendirildi. FKÜ'li hastalar ile kontroller arasında vücut ağırlığı, boy ve boya göre ağırlık yüzdeleri arasında anlamlı bir fark yoktu (**Tablo 18**).

Tablo 18. FKÜ'li hasta ve kontrol gruplarının demografik ve antropometrik özellikleri

Gruplar		Yaş (yıl)	Ağırlık (kg)	Boy (cm)	Boya göre ağırlık (%)
FKÜ	n	31	31	31	31
	Ortanca	10.0	31.0	134.5	98.0
	Min-Maks	5.0-18.0	15.6-69.0	104.0-174.0	85.0-144.0
Kontrol	n	26	25	25	25
	Ortanca	8.25	26.0	130.0	98.0
	Min-Maks	5.0-17.5	19.0-63.0	110.0-171.0	73.0-119.0
p		0.431	0.433	0.993	0.463

Min-Maks: En düşük-en yüksek değer
 $p<0.05$ ise istatistiksel olarak anlamlıdır.

4.5.1.2. Biyokimyasal bulgular

Fenilketonürlü hastalarla kontrol grubu B12 vitamini durumu ile ilişkili biyokimyasal parametreler açısından karşılaştırılması **Tablo 19'**da gösterilmiştir. FKÜ'li hastalarda kontrol grubuna göre MCV ve folik asit değerleri anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.004$, $p<0.001$). Serum B12 vitamini, plazma MMA ve Hcy düzeyleri açısından iki grup arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$).

Her iki grupta yer alan referans aralıkların dışındaki olgu sayılarının belirlenmesinde, referans aralık olarak, MMA için 0.076-0.271 $\mu\text{mol/L}$ (152-154), Hcy için yaş ve cinsiyete bağlı olarak 2.24–15.06 $\mu\text{mol/L}$ (151) kullanıldı. İncelenen diğer parametreler için çocuklar için düzenlenen referans aralığı esas alındı (151). FKÜ'li grupta sadece 4 olguda B12 vitamin düzeyi düşük, 9 olguda MMA düzeyi yüksek, 3 olguda ise Hcy düzeyi yüksek bulundu. Kontrol grubundakilerin B12 düzeyleri normaldi; ancak 8 kişide MMA düzeyi, 3 kişide de Hcy düzeyi yüksek bulundu. MCV ve folik asit düzeyleri açısından incelendiğinde FKÜ ve kontrol grupları arasında anlamlı fark olmakla birlikte, her iki grupta da normal sınırlar dışında değerlere rastlanmadı.

İki grup arasında ferritin, hemoglobin, hematokrit, lökosit, trombosit düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 19. FKÜ ve kontrol gruplarının B12 vitamini durumu ile ilişkili biyokimyasal parametreler açısından değerlendirilmesi

Biyokimyasal parametreler		FKÜ (n=31)	Kontrol (n=26)	p
B12 vitamini (pg/mL)	Ortanca	376.0	391.0	0.659
	Min-Maks	135.0-820.0	209.0-725.0	
Düşük B12 vitamini (kişi sayısı)		4	0	
MMA (µmol/L)	Ortanca	0.129	0.149	0.841
	Min-Maks	0.011-0.739	0.011-0.578	
Yüksek MMA (kişi sayısı)		9	8	
Hcy (µmol/L)	Ortanca	5.44	5.86	0.798
	Min-Maks	3.04-15.10	2.75-12.02	
Yüksek Hcy (kişi sayısı)		3	3	
MCV (fL)	Ortanca	84.80	81.95	0.004
	Min-Maks	75.40-95.10	74.00-88.70	
Yüksek MCV (kişi sayısı)		0	0	
Folik asit (ng/mL)	Ortanca	16.30	10.15	0.000
	Min-Maks	5.40-20.00	5.20-18.80	
Düşük Folik asit (kişi sayısı)		0	0	

Min-Maks: En düşük-en yüksek değer
p<0.05 ise istatistiksel olarak anlamlıdır.

4.5.2. Diyete Uyuma Göre Sınıflandırılan FKÜ Olgularının ve Kontrol Grubunun Karşılaştırılması

Tüm fenilketonürlü hastalar proteinden zengin olan hayvansal gıdaların yasaklandığı fenilalanin kısıtlı diyet almakta idi. Bu diyete göre serum fenilalanin düzeyini belirli aralıkta tutmak için belirli miktarda sebze, meyve ve tahıl tüketilebilmekte; büyüme için gerekli olan enerji ve protein açığı ise aminoasit karışımları ile yapılan mamalarla karşılanmaktadır.

FKÜ'li hastalar son bir yıl içerisinde ölçülen serum fenilalanin düzeylerinin ortalamalarına göre “diyete uyan” ve “diyete uymayan” olmak üzere iki alt gruba ayrıldı. Tedavide hedeflenen serum fenilalanin aralıkları 0-12 yaşları arasındaki çocuklar için 2-6 mg/dL, >12 yaş çocuklar için 2-10 mg/dL olarak belirlendi. Diyete uyum gösterenler fenilalanin kısıtlı diyete uyan, vitamin ve minerallerce zenginleştirilmiş amino asit karışımlarını içeren özel mamaları alan, belirli miktarda sebze, meyve, tahıl tüketen ve serum fenilalanin düzeyi hedef aralıkta bulunanlardı. Diyete uyum göstermeyenler ise amino asit karışımlarını düzenli kullanmadığı ve kısıtlı verilen meyve, sebze ve tahıllarda bir miktar kaçak yaptığı düşünülen, dolayısı ile serum fenilalanin düzeyi istenilen değerin üzerinde seyreden hastalardı. FKÜ'li hastaların %32.3'ü (n=10) kısıtlı diyete uyum gösterirken, %67.7'si (n=21) diyete uymayan hastalardan oluşmakta idi.

4.5.2.1. Tanımlayıcı bulgular

Diyete uyan FKÜ alt grubunda yaşlarının ortancası 9.75 yıl olan 2 (%20.0) kız, 8 (%80.0) erkek hasta, diyete uymayan FKÜ alt grubunda ise yaşları ortancası 10.0 yıl olan 9 (%42.9) kız ve 12 (%57.1) erkek hasta bulunmaktaydı. 15 (%57.7) kız ve 11 (%42.3) erkek çocuktan oluşan kontrol grubunun yaş ortancası 8.25 yıl idi. Diyete uyuma göre belirlenen FKÜ alt grupları ve kontrol grubu arasında yaş, cinsiyet, ağırlık, boy ve boya göre ağırlık yüzdeleri açısından anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (**Tablo 20**).

Tablo 20. FKÜ alt gruplarının ve kontrol grubunun demografik ve antropometrik özellikleri

Gruplar		Yaş (yıl)	Ağırlık (kg)	Boy (cm)	Boya göre ağırlık (%)
Diyete uyan FKÜ	n	10	10	10	10
	Ortanca	9.75	34.10	134.75	108.50
	Min-Maks	5.50-18.00	19.50-69.00	110.00 -174.00	91.00-144.00
Diyete uymayan FKÜ	n	21	21	21	21
	Ortanca	10.0	30.0	130.0	96.8
	Min-Maks	5.0-14.0	15.6-58.0	104.0-165.0	85.0-138.0
Kontrol	n	26	25	25	25
	Ortanca	8.25	26.0	130.0	98.0
	Min-Maks	5.0-17.5	19.0-63.0	110.0-171.0	73.0-119.0
p		0.367	0.340	0.695	0.086

Min-Maks: En düşük-en yüksek değer
p<0.05 ise istatistiksel olarak anlamlıdır.

4.5.2.2. Biyokimyasal bulgular

B12 vitamini durumu ile ilişkili incelenen biyokimyasal parametreleri açısından diyeteye uyan, diyeteye uymayan ve kontrol gruplarının üçlü karşılaştırılmalarında yalnızca MCV ve folik asit değerleri açısından anlamlı fark bulunmuştur (sırasıyla p=0.010, p<0.001).

Üç grup ikili olarak karşılaştırıldığında;

- Diyeteye uyan FKÜ'li alt grupta uymayan gruba göre fenilalanin düzeyleri anlamlı olarak düşük bulundu (p<0.001).
- Diyeteye uyan FKÜ alt grubunda kontrol grubuna göre folik asit düzeyleri anlamlı yüksek saptandı (p<0.001).
- Diyeteye uymayan FKÜ alt grubunda kontrol grubuna göre MCV ve folik asit düzeylerinin anlamlı yüksek olduğu saptandı (sırasıyla; p=0.002 ve p<0.001).

Diyete uyan FKÜ alt grubunda B12 vitamin eksikliği olan 1 kişi, MMA düzeyi yüksek olan 2 kişi ve Hcy düzeyi yüksek olan 1 kişi bulunmaktaydı. Diyeteye uymayan FKÜ alt grubunda ise 3 kişide B12 eksikliği, 7 kişide MMA düzeyi yüksek ve 2 kişide ise Hcy düzeyi

yüksek bulundu (**Tablo 21**). İncelenen diğer rutin biyokimyasal parametreler açısından üç grup arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 21. Diyete uyan, diyete uymayan ve kontrol gruplarının B12 vitamini durumu ile ilişkili biyokimyasal parametreler açısından ikili karşılaştırmaları

Biyokimyasal parametreler		Diyete uyan FKÜ (n=10)	Diyete uymayan FKÜ (n=21)	Kontrol (n=26)	p
Fenilalanin (mg/dL)	Ortanca	4.40*	10.00	-	0.000*
	Min-Maks	2.80-8.00	7.00-14.00	-	
B12 vitamini (pg/mL)	Ortanca	444.0	351.0	391.0	p>0.05
	Min-Maks	198.0-820.0	135.0-767.0	209.0-725.0	
Düşük B12 vitamini (kişi sayısı)		1	3	0	
MMA (µmol/L)	Ortanca	0.13	0.14	0.15	p>0.05
	Min-Maks	0.04-0.68	0.01-0.74	0.01-0.58	
Yüksek MMA (kişi sayısı)		2	7	8	
Hcy (µmol/L)	Ortanca	5.13	6.03	5.86	p>0.05
	Min-Maks	3.42-13.41	3.04-15.10	2.75-12.02	
Yüksek Hcy (kişi sayısı)		1	2	3	
MCV (fL)	Ortanca	84.35	85.50 [§]	81.95	0.002 [§]
	Min-Maks	75.40-95.10	78.30-92.60	74.00-88.70	
Yüksek MCV (kişi sayısı)		0	0	0	
Folik asit (ng/mL)	Ortanca	16.20 [†]	16.60 [§]	10,15	0.000 ^{†§}
	Min-Maks	6.80-19.60	5.40-20.00	5.20-18.80	
Düşük Folik asit (kişi sayısı)		0	0	0	

Min-Maks: En düşük-en yüksek değer

* Diyete uymayan FKÜ alt grubu ile karşılaştırıldığında

† § Kontrol ile karşılaştırıldığında

$p<0.05$ ise istatistiksel olarak anlamlıdır.

4.5.3. Korelasyon Analizleri

4.5.3.1. FKÜ Grubunda Korelasyon Analizi

FKÜ grubunda (n=31) incelenen tüm biyokimyasal parametreler arasında yapılan korelasyon analizinde; serum B12 vitamini ve MMA düzeyleri ile diğer parametreler arasında bir korelasyon bulunmazken, Hcy düzeyi ile fenilalanin ve MCV arasında orta düzeyde anlamlı pozitif korelasyon ($r=0.472$, $p=0.007$ ve $r=0.393$, $p=0.029$), folik asit ile orta düzeyde anlamlı bir negatif korelasyon ($r= - 0.355$, $p=0.050$) bulunmuştur (**Tablo 22**).

Tablo 22. FKÜ grubunda biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyonlar

		FA	Hb	Hct	MCV	WBC	Plt	Folik asit	Fe	B12	MMA
Hb	r = p =	0.112 0.549									
Hct	r = p =	0.145 0.436	0.847 0.000								
MCV	r = p =	0.352 0.052	0.465 0.008	0.400 0.026							
WBC	r = p =	-0.078 0.677	0.124 0.506	0.002 0.992	-0.225 0.224						
Plt	r = p =	0.155 0.405	-0.142 0.447	-0.197 0.289	-0.009 0.961	0.093 0.620					
Folik asit	r = p =	-0.154 0.408	-0.127 0.495	-0.228 0.217	0.000 0.999	0.057 0.761	0.122 0.515				
Fe	r = p =	-0.139 0.456	0.457 0.010	0.341 0.061	0.353 0.052	0.085 0.649	0.069 0.713	0.170 0.359			
B12	r = p =	-0.113 0.546	-0.066 0.724	-0.150 0.421	-0.305 0.095	0.286 0.119	0.100 0.594	0.041 0.825	-0.066 0.724		
MMA	r = p =	0.080 0.669	0.091 0.628	0.165 0.374	0.194 0.297	-0.113 0.546	0.143 0.441	0.038 0.840	0.021 0.910	-0.328 0.072	
Hcy	r = p =	0.472 0.007	0.362 0.046	0.400 0.026	0.393 0.029	-0.139 0.454	-0.142 0.445	-0.355 0.050	0.200 0.280	-0.240 0.194	0.037 0.844

FA: Fenilalanin, **Hb:** Hemogram, **Hct:** Hematokrit, **MCV:** Ortalama eritrosit hacmi, **WBC:** Lökosit, **Plt:** Trombosit, **Fe:** Ferritin, **B12:** B12 vitamini, **MMA:** Metilmalonik asit, **Hcy:** Homosistein

4.5.3.2. Kontrol Grubunda Korelasyon Analizi

Kontrol grubunda (n=26) incelenen tüm biyokimyasal parametreler arasında yapılan korelasyon analizi sonucunda; MMA ile homosistein ve hemoglobin arasında orta düzeyde anlamlı pozitif korelasyon (sırasıyla $r=0.464$, $p=0.017$ ve $r=0.431$, $p=0.028$), trombosit ile güçlü düzeyde anlamlı negatif korelasyon bulunmuştur ($r= - 0.552$, $p=0.003$). Serum B12 vitamini ile MMA arasında ise negatif yönde bir korelasyon bulundu, fakat anlamlı değildi ($r= - 0.380$, $p=0.056$) (**Tablo 23**).

Tablo 23. Kontrol grubunda biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyonlar

		Hb	Hct	MCV	WBC	Plt	Folik asit	Fe	B12	MMA
Hct	r = p =	0.981 0.000								
MCV	r = p =	0.556 0.003	0.525 0.006							
WBC	r = p =	0.214 0.293	0.167 0.416	0.062 0.764						
Plt	r = p =	-0.190 0.351	-0.224 0.270	-0.344 0.086	0.229 0.260					
Folik asit	r = p =	-0.159 0.439	-0.120 0.560	-0.020 0.924	-0.307 0.127	0.237 0.244				
Fe	r = p =	0.454 0.020	0.475 0.014	0.600 0.001	0.076 0.713	-0.121 0.554	-0.033 0.874			
B12	r = p =	-0.212 0.298	-0.210 0.303	-0.356 0.074	0.098 0.632	0.078 0.704	0.140 0.495	-0.018 0.931		
MMA	r = p =	0.431 0.028	0.430 0.028	0.238 0.241	-0.191 0.349	-0.552 0.003	-0.270 0.182	-0.059 0.775	-0.380 0.056	
Hcy	r = p =	0.294 0.145	0.286 0.157	0.200 0.327	-0.035 0.864	-0.157 0.443	-0.120 0.559	-0.137 0.504	-0.311 0.123	0.464 0.017

FA: Fenilalanin, **Hb:** Hemogram, **Hct:** Hematokrit, **MCV:** Ortalama eritrosit hacmi, **WBC:** Lökosit, **Plt:** Trombosit, **Fe:** Ferritin, **B12:** B12 vitamini, **MMA:** Metilmalonik asit, **Hcy:** Homosistein

4.5.3.3. FKÜ ve Kontrol Grupları Birlikte Ele Alınarak Yapılan Korelasyon Analizi

FKÜ ve kontrol grupları birleştirilerek (n=57) yapılan korelasyon analizinde; B12 vitamini ile MMA ve MCV arasında orta düzeyde anlamlı negatif korelasyon bulundu (sırasıyla $r = -0.343$, $p=0.009$ ve $r = -0.301$, $p=0.023$). B12 vitamini ile Hcy arasında da orta düzeyde negatif korelasyon bulundu, fakat anlamlı değildi ($r = -0.256$, $p=0.055$) (**Tablo 24**).

Tablo 24. FKÜ ve kontrol grubu birlikte ele alındığında incelenen biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyonlar

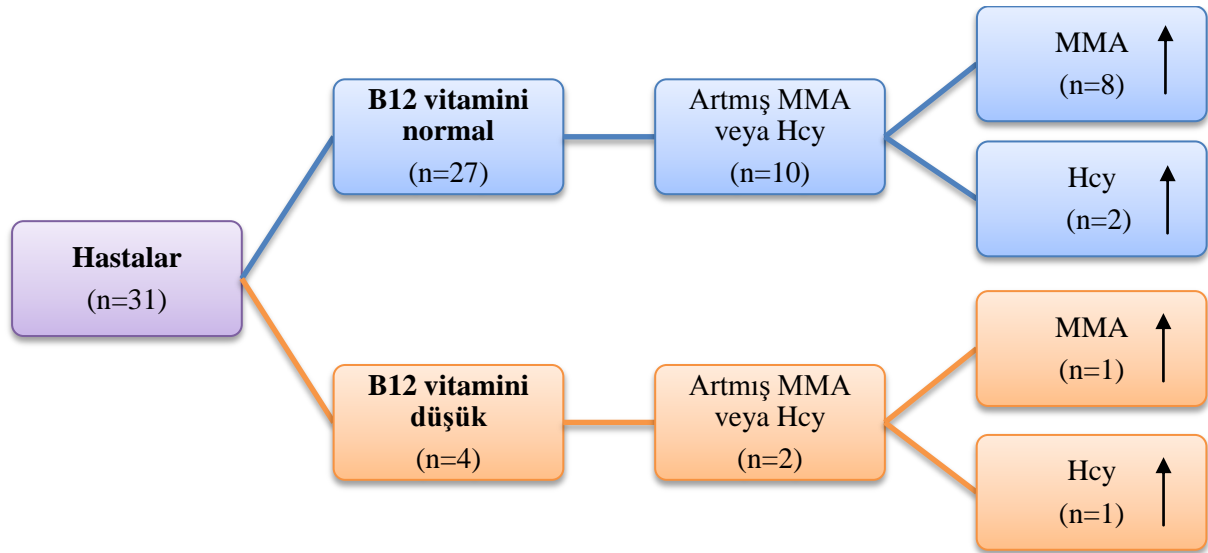
		Hb	Hct	MCV	WBC	Plt	Folik asit	Fe	B12	MMA
Hct	r = p =	0.892 0.000								
MCV	r = p =	0.430 0.001	0.405 0.002							
WBC	r = p =	0.135 0.318	0.048 0.723	-0.062 0.645						
Plt	r = p =	-0.148 0.272	-0.203 0.130	-0.148 0.273	0.109 0.420					
Folik asit	r = p =	-0.155 0.250	-0.149 0.269	0.241 0.071	0.065 0.630	0.051 0.708				
Fe	r = p =	0.427 0.001	0.366 0.005	0.456 0.000	0.115 0.395	-0.005 0.971	0.205 0.125			
B12	r = p =	-0.111 0.410	-0.168 0.211	-0.301 0.023	0.230 0.086	0.094 0.487	0.050 0.710	-0.055 0.687		
MMA	r = p =	0.214 0.110	0.358 0.006	0.207 0.123	-0.128 0.342	-0.099 0.462	-0.045 0.742	0.004 0.978	-0.343 0.009	
Hcy	r = p =	0.323 0.014	0.261 0.050	0.365 0.005	-0.086 0.527	-0.159 0.237	-0.109 0.418	0.148 0.271	-0.256 0.055	0.164 0.222

FA: Fenilalanin, **Hb:** Hemogram, **Hct:** Hematokrit, **MCV:** Ortalama eritrosit hacmi, **WBC:** Lökosit, **Plt:** Trombosit, **Fe:** Ferritin, **B12:** B12 vitamini, **MMA:** Metilmalonik asit, **Hcy:** Homosistein

4.5.4. Fonksiyonel B12 Eksikliğinin Belirlenmesinde Metabolik Biyobelirteçlerin Serum B12 Vitamini Ölçümüne Göre Tanı Değerlerinin Karşılaştırılması

FKÜ ve kontrol grupları serum B12 vitamini, plazma MMA ve plazma Hcy referans aralığına göre düşük, normal ve yüksek olmak üzere üçer alt gruba ayrıldı. Referans aralık olarak; B12 vitamini için 200-835 pg/mL, MMA için 0.076-0.271 µmol/L, Hcy için yaş ve cinsiyete bağlı olarak 2.24–15.06 µmol/L kullanıldı.

FKÜ'li hastalar arasında normal B12 vitamin düzeylerine sahip 27 kişiden 10 kişinin (%37.0) MMA ve/veya Hcy düzeylerinin yüksek olduğu saptandı. Bu 10 kişinin 8'inde sadece MMA düzeyi, 2'sinde ise sadece Hcy düzeyi yüksek bulundu. B12 vitamin düzeyi düşük olarak belirlenen 4 kişiden 2'sinin MMA veya Hcy düzeyleri yüksek bulundu (**Şekil 26**). Fonksiyonel B12 vitamin eksikliği olduğu belirlenen 14 olguya ait değerler **Tablo 25**'de gösterilmektedir. B12 vitamin düzeyleri normal olup, MMA değerleri yüksek olan olguların genel olarak düşük normal B12 vitamin düzeylerine sahip oldukları; bu olgularda Hcy değerlerinin ise normal sınırlarda olduğu gözlemlendi.



Şekil 26. FKÜ grubunda fonksiyonel B12 vitamin eksikliği olan olgu sayıları

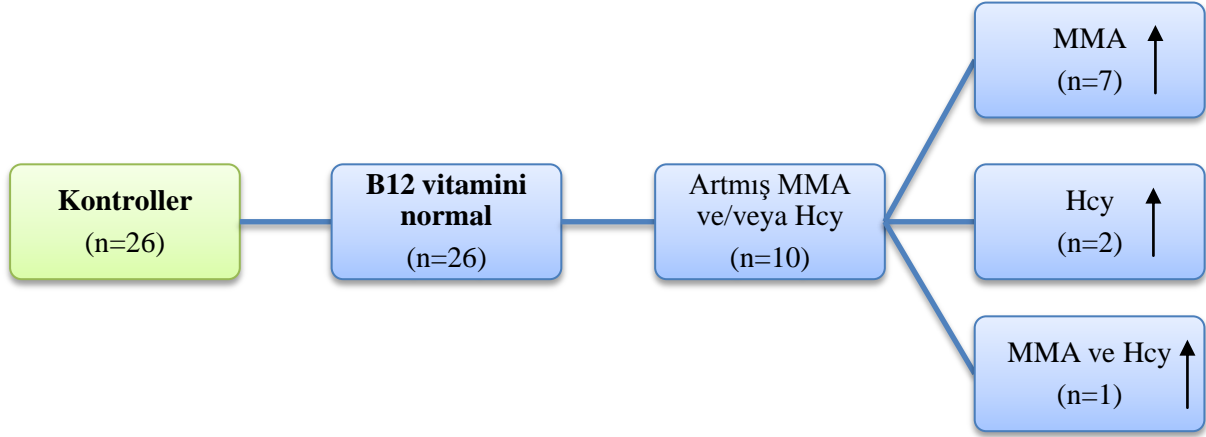
Tablo 25. Fonksiyonel B12 vitamin eksikliği olan FKÜ'li olgulara ait değerler

	Serum B12 vitamini (RA: 200-835 pg/mL)	Plazma MMA (RA: 0.076-0.271 µmol/L)	Plazma Hcy (RA: 2.24-15.06 µmol/L)*
1	198 ↓	0.194	7.23
2	166 ↓	0.141	7.44
3	198 ↓	0.684 ↑	5.21
4	135 ↓	0.011	15.1 ↑
5	527	0.138	13.4 ↑
6	527	0.116	8.95 ↑
7	327	0.739 ↑	7.59
8	257	0.347 ↑	10.7
9	399	0.459 ↑	13.8
10	571	0.277 ↑	3.86
11	273	0.579 ↑	4.56
12	376	0.353 ↑	7.80
13	210	0.410 ↑	6.60
14	240	0.339 ↑	4.11

RA: Referans aralık

*Yaş ve cinsiyete bağlı referans aralığı

Sağlıklı kontrollerin hepsi normal B12 vitamin düzeyine sahiplerdi. Ancak, kontrollerin %38.5'inde (n=10) fonksiyonel B12 vitamin eksikliğinin göstergeleri olan MMA ve/veya Hcy düzeyleri yüksek bulundu. 10 kişiden 7'sinde sadece MMA, 2'sinde sadece Hcy, 1'inde ise her iki parametre birden yüksekti (**Şekil 27, Tablo 26**).



Şekil 27. Kontrol grubunda fonksiyonel B12 vitamin eksikliği olan kişi sayısı

Tablo 26. Fonksiyonel B12 vitamin eksikliği olan sağlıklı kontrollere ait değerler

	Serum B12 vitamini (RA: 200-835 pg/mL)	Plazma MMA (RA: 0.076-0.271 µmol/L)	Plazma Hcy (RA: 2.24-15.06 µmol/L)*
1	407	0.115	6.01 ↑
2	369	0.072	7.84 ↑
3	216	0.473 ↑	8.47
4	405	0.578 ↑	6.65
5	240	0.296 ↑	9.85
6	419	0.314 ↑	3.49
7	373	0.578 ↑	8.81
8	316	0.303 ↑	5.05
9	479	0.418 ↑	9.0
10	209	0.318 ↑	12.02 ↑

RA: Referans aralık

*Yaş ve cinsiyete bağlı referans aralığı

FKÜ ve kontrol grupları birlikte ele alınarak (n=57), fonksiyonel B12 vitamin eksikliği metabolik biyobelirteçlerinin serum B12 vitaminine göre tanı koymadaki üstünlüklerini karşılaştırmak amacıyla ki-kare McNemar testi ve MH Olasılıklar Oranı kullanıldı. Plazma Hcy'in tanı koymadaki değeri, gerekli istatistiksel koşulu sağlayamaması nedeniyle yapılamadı. Fonksiyonel B12 vitamin eksikliğini gösterilmesinde plazma MMA'nın serum B12 vitamini göre tanı değeri belirlendi (**Tablo 27**).

Plazma MMA'nın B12 vitamin eksikliği tanısı koyduğu kişi sayısı 16 iken, serum B12 vitamininin tanı koyduğu kişi sayısı 3'tür. Yapılan ki-kare McNemar testi ve MH Olasılıklar Oranı hesaplamasına göre, plazma MMA ölçümünün serum B12 ölçümüne göre anlamlı olarak 5.33 kat (%95 GA=1.62-17.49) daha fazla B12 vitamin eksikliği tanısı koyduğu bulunmuştur.

Tablo 27. B12 vitamin eksikliğini gösterilmesinde plazma MMA ve serum B12 vitaminin tanı değerlerinin karşılaştırılması

		Serum B12 vitamini	
		B12 vitamin eksikliği Var	B12 vitamin eksikliği Yok
Plazma MMA	B12 vitamin eksikliği Var	1	16
	B12 vitamin eksikliği Yok	3	37

$\chi^2_{\text{McNemar}} = 7.58$ Serbestlik derecesi=1 p<0.05
MH Olasılıklar Oranı (OR) = 16/3=5.33
Miettinen Güven Aralığı 1.62< OR <17.49

5. TARTIŞMA

B12 vitamin eksikliği dünyada yaygın bir problemdir. Yetersiz diyetel alım, B12 vitamin eksikliğinin başlıca nedenlerindendir. Fenilalanin kaynaklarından kısıtlı diyet alan fenilketonüri (FKÜ) hastaları, çocuklar, yaşlılar, kronik alkolikler ve katı vejeteryanların yanı sıra diyetel alım yetersizliği nedeniyle ortaya çıkan B12 vitamin eksikliği riski altındadırlar. FKÜ'li hastalar yaşam boyu sürdürmeleri gereken diyet tedavisi nedeniyle, B12 vitamininin ana kaynakları olan fenilalaninden zengin hayvansal gıdaları tüketemezler. Bu hastalar büyüme için gerekli olan enerji ve protein açığına vitamin ve minerallerle zenginleştirilen, aminoasit karışımları ile karşılamaktadır. Bu karışımları belirlenen miktarlarda düzenli olarak alan hastalarda B12 vitamin eksikliğinin gelişmesi beklenmez. Ancak, FKÜ diyet tedavisinin bir parçası olan bu amino asit karışımlarının biyoyararlılığı konusunda yeterli bilgi bulunmamaktadır (9, 10). Diğer yandan, özellikle adolesan ve yetişkinlik döneminde diyetleri gevşetilerak doğal protein alımına kısıtlı olarak izin verilen hastalarda daha sık olmak üzere, diyet tedavisi uygulanan tüm FKÜ hastalarında B12 vitamin eksikliği görülebilmektedir (11-16).

B12 vitamin eksikliği tanısında en sık kullanılan laboratuvar testi kanda B12 vitamini konsantrasyonu belirlenmesidir (57, 61). MCV düzeyleri geleneksel olarak ölçülen bir parametre olmasına karşın, B12 eksikliğinin geç evresinde bulgu vermesi ve folik asit eksikliğinden de etkilenmesi nedeniyle duyarlı ve özgül bir belirteç değildir (36, 44). HoloTC ise dolaşımdaki aktif B12 durumunu göstermesi ile yeni bir doğrudan belirteç olarak son yıllarda üzerinde durulan bir parametredir. Ancak, holoTC'nin tanısıl değereri konusundaki çelişkili bilgiler ve yetersiz çalışmalar nedeniyle kullanımı sınırlıdır (75-77). Yukarıda sözü edilen belirteçler ciddi eksiklik durumundan-sınırdaki normal B12 durumuna kadar olan dar aralığı yansıtmaktadır. B12 vitamin eksikliğinin fonksiyonel belirteçleri olan MMA ve Hcy ise yetersiz B12 vitamin konsantrasyonlarında birikmekte ve klinik belirti göstermeyen erken değeriklikleri yansıtmaktadır (17). Ancak, Hcy B12 vitamin eksikliği dışında folik asit ve B6 vitamin eksikliklerinden de etkilenmesi nedeniyle MMA'ya göre daha az özgül bir metabolik biyobelirteçtir (18, 52, 56, 64).

Dolaşımdaki MMA düzeyleri, kan B12 vitamini konsantrasyonu düşük ya da düşük normal olan kişilerde yararlı bir doğrulamayı tanı testidir. 20 yıldan daha fazla bir süredir serum/plazma ve idrarda MMA ölçümü B12 vitamin eksikliğinin bir belirteci olarak

kullanılmaktadır (107). MMA analizi için farklı örnek ekstraksiyon işlemleri, türevlendirme yapılarak ya da yapılmaksızın uygulanan farklı örnek hazırlık yöntemleri ve kapiller elektroforez, HPLC ve GC-MS gibi çeşitli analitik teknikler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin başlıca sınırlılıkları, türevlendirme ve uzun ekstraksiyon işlemlerine gereksinim duyulması, kullanılan örnek hacminin fazla olması, uzun analiz süresi ve sınırlı duyarlılık ve özgüllükleridir (19, 106, 107). Son yıllarda klinik laboratuvarlarda MMA analizinde, diğer yöntemlere göre daha yüksek kurulum maliyeti ve deneyimli kullanıcı gereksinimine karşın, zahmetsiz örnek hazırlık aşaması, az örnek miktarı kullanımı, düşük analiz maliyeti, kısa analiz süresi ve yüksek analitik duyarlılık ve özgüllüğü nedeniyle MRM-LC-MS/MS yönteminin kullanımı giderek artmaktadır (18, 19, 70, 105, 158).

Çalışmamızda B12 vitamin eksikliğinin fonksiyonel biyobelirteçler ile araştırılması amacıyla, B12 vitamin eksikliği riski altında olan FKÜ'li hastalar ve herhangi bir hastalığı olmayan sağlıklı bireyler değerlendirildi. Plazma MMA düzeyleri, stabil izotop işaretli internal standart kullanılarak LC-MS/MS'de MRM modunda, türevlendirme gerektirmeyen örnek hazırlığı ve kısa analiz süresi olan bir yöntem ile belirlendi (104). Literatürde LC-MS/MS ile gerçekleştirilen MMA ölçüm yöntemlerinin çoğunda, SAX (güçlü anyon değiştirici) kolonlar ile katı faz ekstraksiyonu veya farklı organik solventler ile sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemleri sonrasında genellikle türevlendirme yapılmıştır (19, 102, 103, 157, 158, 161). Bu çalışmaların dışındaki diğer çalışmalarda ise protein çöktürme veya ultrafiltrasyon işlemleri sonrasında asit ilavesi yapılmıştır (35, 104, 106, 107). Çalışmamızda kullandığımız Hempen ve ark. (104) tarafından gerçekleştirilen yöntemin aynı metodolojiyi kullanan diğer yöntemlere göre üstünlüğü, türevlendirme gerektirmemesi, daha hızlı analiz süresi ve MMA ile birlikte aynı anda Hcy kantitasyonuna olanak tanınmasıdır.

Laboratuvarımızda kendi koşullarımızda gerçekleştirdiğimiz MMA optimizasyonu çalışmalarında; MRM modunda MMA ve d₃-MMA izlemi için seçilen ana iyon/ürün iyon çiftleri literatür ile uyumlu bulundu (35, 104, 106, 107, 161). MMA ve d₃-MMA'nın kromatografik alıkonma zamanları sırasıyla 4.16 dk ve 4.08 dk olarak belirlendi. Yapılan çalışmalarda kullanılan kolon ve mobil faz akış özellikleri gibi kromatografik koşullara göre alıkonma zamanları, 40 s ile 4.9 dk arasında değişmektedir (19, 35, 102-107, 157, 158, 161).

MMA'nın analizi sırasında dikkat edilmesi gereken önemli bir konu da doğal olarak oluşan ve fizyolojik konsantrasyonu MMA'dan yaklaşık 50 kat daha fazla olan süksinik asit

(SA) girişiminin engellenmesidir. Süksinik asit, MMA'nın yapısal izomeri olması nedeniyle MMA ile aynı m/z değerine sahiptir. Bu nedenle, kromatografik olarak iyi bir şekilde ayrımlanması gerekmektedir. Literatürdeki çalışmaların birçoğunda SA 0.24-0.6 dk fark ile ayrımlanmıştır (35, 104-106, 157, 158). Bizim çalışmamızda ise SA, MMA'dan 1.04 dk önce güvenli bir şekilde ayrımlanmaktadır.

Yöntem optimizasyonu sonrasında MMA için yapılan yöntem geçerlilik çalışmaları değerlendirildiğinde; Bu çalışmaların önemli bir kısmında MMA standartlarının ve kalite kontrol örneklerinin dilüsyonunda kullandığımız plazma havuzunun endojen MMA konsantrasyonu plazma MMA referans aralığı içinde yer almaktaydı. Literatürdeki MMA analiz yöntemlerinde kalibrasyon eğrisi standartlarının dilüsyonunda su (102, 103, 157, 158) ya da serum/plazma havuzu (19, 35, 104-107) kullanılmıştır. Çalışmamızda su ve plazma havuzu kullanarak çizdiğimiz iki farklı kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayıları (R^2) 1'e yakındı ve eğimleri arasında önemli bir fark bulunmadı. Sonuçlarımız bu iki dilüent ile hazırlanan kalibrasyon eğrilerini karşılaştıran literatürdeki tek bir çalışmanın sonuçları ile paralellik göstermektedir (106). Ayrıca 57 plazma örneğinin iki farklı kalibrasyon eğrisi ile hesaplanan MMA konsantrasyonları birbiri ile uyumlu bulundu. Bu sonuçlar doğrultusunda hazırlanan her iki kalibrasyon eğrisi de çalışmamız için uygun bulundu. Ancak literatürde ağırlıklı olarak örnek matriksi ile hazırlanan kalibrasyon eğrilerinin kullanılması nedeniyle ve örnek matriksi ile standart matriksini eş tutarak olası interferansları engellemek amacıyla, çalışmanın geri kalan kısmını plazma havuzu ile hazırlanan kalibrasyon eğrisini kullanarak gerçekleştirdik.

Çalışmamızda üç tekrarlı olarak çizilen kalibrasyon eğrisinin ortalama eğim değeri optimize ettiğimiz yöntemin yüksek analitik duyarlılığını, düşük standart sapma değeri ise analitik prosedürün tekrarlanabilirliğinin yeterliliğini, her bir standart için elde edilen $\%100 \pm 4$ değeri de yöntemin yüksek analitik doğruluğunu göstermektedir.

Kullandığımız yöntemin plazma MMA referans aralığı üst sınırının yaklaşık 400 katına kadar ($100 \mu\text{mol/L}$) doğrusal bulunması, özellikle yüksek MMA düzeylerinin görüldüğü kalıtsal metilmalonik asidürilerin tanısında da bu yöntemin kullanılabilmesinin göstergesidir. Çalışmamızda elde edilen doğrusallık sınırı Hemen ve ark.'nın sonuçları ile uyumlu bulunmuştur (104). Diğer çalışmalardaki doğrusallık sınırı $3\text{-}250 \mu\text{mol/L}$ arasındadır (19, 35, 103-105, 157, 161).

Üç farklı konsantrasyonda hazırlanan kalite kontrol örnekleri ile gerçekleştirilen kesinlik çalışmalarında, gün içi ve günler arasında sırasıyla 4.0 ve 6.0'dan düşük olarak bulunan %CV değerleri yöntemin tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Yöntemimizde 0.021 µmol/L olarak belirlediğimiz tespit limiti literatürdeki çalışmalarda bildirilen tüm değerlerin (0.03-0.1 µmol/L) altındadır (19, 103-107). Yöntemin kantitasyon limiti (0.085 µmol/L) ise literatür ile uyumlu bulunmuştur (19, 103, 106, 107, 161).

Düşük ve yüksek konsantrasyonlu iki plazma örneği için sırasıyla %87.6 ve %86.4 olarak bulunan geri kazanım sonuçları yöntemin yüksek doğruluğunu göstermektedir. Literatürde yapılan yöntem çalışmalarında MMA geri kazanımı %66-120 arasında değişmektedir (19, 102-107, 157, 158).

Sonuç olarak; MMA analizi için laboratuvarımızda gerçekleştirdiğimiz yöntem geçerlilik çalışmalarının sonuçları optimize edilen yöntemin güvenilir bir şekilde uygulanabilir olduğunu göstermektedir. Ayrıca elde edilen sonuçlar literatürdeki diğer yöntem çalışmaları ile de uyumlu bulunmuştur.

Fenilketonüri ve kontrol grupları B12 vitamini durumu ile ilişkili biyokimyasal parametreler açısından incelendiğinde; İki grup arasında B12 vitamini, MMA ve Hcy açısından fark olmamasına karşın, FKÜ grubundaki olguların %12.9'unda B12 vitamini düzeyinin düşük, %29'unda MMA düzeyinin ve %9.7'sinde Hcy düzeyinin yüksek bulunması, bu hastalarda fonksiyonel B12 vitamin eksikliğinin varlığının göz ardı edilmemesi gerektiğini göstermektedir. FKÜ grubunda B12 vitamin düzeyi normal olanların %37'sinde MMA (%29.6) ve Hcy (%7.4) düzeylerinin yüksek, kontrol grubundaki sağlıklı çocukların %30.7'sinde MMA düzeyinin ve %11.5'inde Hcy düzeyinin yüksek bulunması ise B12 vitamin düzeyinin referans aralık içinde olsa da fonksiyonel bir B12 vitamin eksikliği olabileceğinin göstergesidir. İki grup arasında fonksiyonel B12 vitamin eksikliği belirteçleri açısından anlamlı fark bulunamaması, olasılıkla kontrol grubunda olgu grubuna yakın oranda ve serum B12 vitamini konsantrasyonu ölçümü ile tespit edilemeyen fonksiyonel eksiklikten kaynaklanmaktadır. Diğer yandan her iki grupta referans aralık içinde kalmasına karşın, FKÜ grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunan MCV düzeyleri de hastalardaki fonksiyonel B12 vitamini belirteçleri ile elde edilen B12 eksikliği bulgularını destekler niteliktedir. Ayrıca, her iki grupta da folik asit eksikliği olmamasına karşın, folik asit

değerlerinin FKÜ'li grupta kontrole göre anlamlı yüksek bulunması, olgu grubundaki MCV yüksekliğinin folik asit eksikliğinden kaynaklanmadığını ortaya koymaktadır. Bu fark hastaların fenilalanininden kısıtlı diyetlerinin büyük miktarda sebze ve meyve içermesi ile açıklanabilir.

Hanley ve ark.'nın (11) adolesan ve genç yetişkin 37 FKÜ'li hastada yaptıkları çalışmada; hastaların %16.0'sında B12 vitamin düzeyi düşük (<202 pg/mL), diğer %16.0'sında ise B12 vitamin düzeyi düşük normal (202-270 pg/mL) bulunmuştur. Bizim çalışmamızda hastaların %12.9'unda B12 vitamini düzeyi düşük (<200 pg/mL), %19.3'ünde ise düşük normal (200-300 pg/mL) bulunmuştur. Bu çalışmadan farklı olarak ele aldığımız sağlıklı kontrollerde ise B12 vitamin düzeyi düşük olmamasına karşın, subklinik eksikliğin varlığı hastaların %15.4'ünde gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda bu çalışmada değerlendirilen parametrelere ek olarak MMA ve Hcy düzeyleri de ölçülmüştür.

B12 vitamin durumunu ilk kez holoTC, MMA ve Hcy düzeyleri ile değerlendiren Hvas ve ark. (15) 31 FKÜ'li hastada yaptıkları çalışmada, bu parametrelere ek olarak toplam TC (toplam transkobalamin) ve TC doygunluğunu (holoTC/totalTC) da belirlemişlerdir. Çalışmamızdan farklı olarak, bu çalışmaya yalnızca 18-43 yaş arasındaki yetişkin FKÜ'li hastalar dahil edilmiş ve kontrol grubu kullanılmamıştır. Hastaların %29.0'unda B12 vitamini düzeyi düşük (<270 pg/mL), diğer %48.3'ünde holoTC düzeyi düşük (<50 pmol/L), toplam hastaların %32'sinde ise MCV düzeyleri yüksek (>100 fL) tespit edilmiştir. B12 vitamin düzeyi düşük olan hastaların diğerlerine göre MMA düzeylerinde (>0.28 µmol/L) anlamlı yüksek ve toplam TC düzeylerinde anlamlı düşük fark varken, Hcy ve holoTC düzeyleri açısından bir fark bulunmamıştır. FKÜ'li hastaların hiçbirinde folik asit eksikliği bulunmamasına karşın %29.0'unda Hcy düzeyleri yüksek bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da tüm hastaların folik asit düzeyleri normal iken, %11.5'inde Hcy düzeylerinin yüksek bulunması bu çalışma ile paralellik göstermektedir. Bu çalışmada bizim çalışmamıza göre, düşük B12 vitamini düzeyi olan olgu sayısının fazla olmasının nedeni kullanılan B12 vitamin referans aralığının alt sınırının yüksek tutulmasıdır. Ayrıca hastaların bir haftalık diyet öykülerinin alınarak B12 ve B6 vitaminlerinin diyetset alımı kontrol edilmiştir. Hastaların %39'unun önerilenden daha az B12 vitamini, %71'inin ise daha az B6 vitamini aldığı gösterilmiştir.

Vugteveen ve ark. (16) tarafından yapılan ve sadece fonksiyonel B12 vitamin eksikliğinin biyobelirteçlerini değerlendiren retrospektif bir çalışmada; geniş yaş aralığındaki (1-37 yaş) 75 FKÜ'li hasta ele alınmıştır ancak kontrol grubu kullanılmamıştır. Bu çalışmada serum B12 vitamini ve plazma Hcy düzeyleri için yaşa bağlı referans aralık, plazma MMA için ise 0.09-0.34 $\mu\text{mol/L}$ referans aralığı kullanılmıştır. Hastaların %10.7'sinde B12 vitamin düzeyleri referans aralıkların altında iken, geriye kalan hastaların B12 düzeyleri normal sınırlar arasında bulunmuştur. Fonksiyonel B12 vitamin eksikliği (yüksek MMA, yüksek Hcy, ya da her ikisi birlikte yüksek) tüm hastaların %16.0'sında belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise tüm hastaların %38.7'sinde ve ayrıca bu çalışmadan farklı olarak değerlendirdiğimiz sağlıklı kontrollerin %38.5'inde fonksiyonel B12 vitamin eksikliği bulunmuştur. Bu çalışmanın kısıtlı bir yönü, plazma Hcy konsantrasyonlarına etki edebilen folik asitin değerlendirilmemesidir. Bizim çalışmamızda ise FKÜ'li hasta ve kontrol gruplarında folik asit eksikliğinin bulunmaması, Hcy düzeylerinin B12 vitamin eksikliğine bağlı olarak yükseldiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda FKÜ'li grup kan fenilalanin düzeylerine göre “diyete uyan” ve “diyete uymayan” olmak üzere iki alt gruba ayrıldığında ve bu gruplar kendi aralarında ve kontrol grubu ile B12 vitamini durumu açısından karşılaştırıldığında; FKÜ grubundaki B12 vitamin düzeyi düşük olan az sayıdaki hastanın %75.0'inin diyete uymadığı, %25.0'inin ise diyete uyumlu olduğu belirlendi. Benzer şekilde MMA düzeyleri yüksek olan hastaların %77.8'i diyete uyumsuz, %22.2'si uyumlu idi. Yüksek Hcy düzeylerine sahip olan az sayıdaki hastanın %66.7'si ise diyete uymamakta, %33.3'ü uymaktaydı. Diyete uymayan hastalarda uyanlara göre fonksiyonel B12 vitamin eksikliğinin daha fazla görölmesi, bu hastaların fenilalaninden kısıtlı verilen gıdalardan bir miktar kaçak yapmalarının dışında, diyetlerindeki tek B12 vitamin kaynağı olan amino asit karışımlarını düzenli almadıklarını ya da bu karışımların biyoyararlılığının düşük olduğunu düşündürmektedir.

MCV değerlerinin referans aralık içinde olmasına karşın, diyete uymayanlarda kontrole göre anlamlı yüksek bulunması, bu grupta bulunan yüksek MMA ve Hcy oranlarını destekler niteliktedir. Folik asit düzeylerinin diyete uyan ve uymayanlarda kontrole göre yüksek bulunması, yukarıda da belirtildiği gibi FKÜ'li hastaların sağlıklı çocuklara göre daha fazla meyve ve sebze tüketmelerinden kaynaklanmaktadır.

Literatürde FKÜ hastalarında B12 vitamin eksikliğini değerlendiren araştırmalar arasında kontrol grubu kullanılan tek bir çalışmada (13), 11-38 yaşları arasındaki hastalar aldıkları diyete göre kısıtlı, serbest ve kısıtlanmayan olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Normalin altında B12 düzeyleri (<180 pg/mL) olan hastaların %60.0'ı normal diyet, %30.0'u gevşetilmiş diyet ve %10.0'u kısıtlı diyet almaktaydı. Bu çalışmada bizim çalışma sonuçlarımıza benzer şekilde, tüm hastaların folik asit düzeyleri normal ve normalin üstünde olup, her bir grubun folik asit düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Ancak alışmamızda bu çalışmadan farklı olarak diyete uyanların %10.0'unda, uymayanların %9.5'inde Hcy düzeylerinin yüksek bulunması, tüm FK grubunda folik asit düzeylerinin normal olmasına rağmen saptadığımız fonksiyonel B12 vitamin eksikliğini göstermektedir. Bu çalışmada kullanılan kontrol grubuna ait değerler daha önce gerçekleştirilen bir anket çalışması kayıtlarından retrospektif olarak elde edilmiştir. Bizim alışmamızda ise FK'li grup ile yaş ve cinsiyet bakımından uyumlu bir kontrol grubu seçilmiştir. Bu çalışmanın bir diğer sınırlılığı ise B12 vitamini durumunun belirlenmesinde MMA düzeylerinin ölçülmemiş olmasıdır.

Çalışmamızda FK ve kontrol gruplarında tüm biyokimyasal parametrelerin korelasyonları incelendiğinde; FK'li grupta Hcy ile fenilalanin arasında bulunan orta düzeyde anlamlı pozitif korelasyon, diyete uymayan ve yüksek fenilalanin düzeyleri olan FK'li hastalarda fonksiyonel B12 vitamin eksikliğinin varlığını destekler niteliktedir. Vugteveen ve ark.'nın (16) 75 FK'li olguda yaptıkları çalışmada tüm grupta Hcy ve fenilalanin düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamazken, yaşa bağlı referans aralıkları kullanarak oluşturulan alt gruplarda bu iki parametre arasında anlamlı korelasyonlar gösterilmiştir. Bizim elde ettiğimiz bu anlamlı korelasyon 5-18 yaş aralığındaki FK grubunda ilk kez gösterilmiştir. FK'li grupta Hcy ve MCV arasında bulunan orta düzeyde anlamlı pozitif korelasyon B12 vitamini eksikliğinde her iki parametrenin birlikte değişimini destekler niteliktedir. Bu sonuçlarımız Hvas ve ark.'nın çalışmasında elde ettiği sonuçlar ile paralellik göstermektedir (15). Ayrıca alışmamızda saptadığımız Hcy ile folik asit arasındaki orta düzeyde anlamlı negatif korelasyon, iki parametre arasında beklenen ilişkiyi yansıtmaktadır.

Kontrol grubunda fonksiyonel B12 vitamin eksikliğinin belirteçleri olan MMA ve Hcy arasında bulunan orta düzeyde anlamlı pozitif korelasyon, fonksiyonel B12 vitamin eksikliğinde her iki belirtecin konsantrasyonlarında meydana gelen artışı kanıtlar niteliktedir.

MMA ve trombosit düzeyleri arasında bulunan güçlü düzeyde anlamlı negatif korelasyon, fonksiyonel B12 vitamini eksikliğinde artan MMA konsantrasyonu ile, vitamin B12 eksikliğinde nadir görülen azalan trombosit düzeyleri arasındaki ilişki B12 vitamin eksikliğinde beklenen değişiklikleri destekler niteliktedir.

FKÜ ve kontrol grupları birleştirilerek biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyon yeniden incelendiğinde; Grupların tek tek ele alınmasıyla bulunan korelasyonlara ek olarak, B12 vitamini ile MMA ve MCV arasında bulunan orta düzeyde anlamlı negatif korelasyon B12 vitamin eksikliğinde MMA ve MCV düzeylerinde beklenen değişikliği yansıtmaktadır.

Çalışmamızda FKÜ ve kontrol grupları birlikte ele alınarak, fonksiyonel B12 eksikliğini belirlemede bir belirteç olan MMA ölçümünün, serum B12 vitamini ölçümüne göre tanı koymadaki değeri incelendiğinde; Plazma MMA ölçümünün serum B12 ölçümüne göre 5.33 kat (%95 GA=1.62-17.49) daha fazla tanı koyduğu bulunmuştur. Güven aralığının geniş bulunması çalışmaya alınan kişi sayısının az olması nedeniyledir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

1. FKÜ’de uygulanan fenilalaninden kısıtlı diyetle uymayanlarda fonksiyonel B12 vitamin eksikliği riskinin diyetle uyanlara göre daha yüksek olabileceği gösterilmiştir. Bu bulgular başta kurgulanan hipotezi desteklemektedir.
2. Serum B12 vitamin düzeyleri normal sınırlarda olmasına karşın, B12 vitamin eksikliği riski altında olan FKÜ’li hastalarda ve sağlıklı kontrollerde, referans yöntem olan MRM-LC-MS/MS ile gerçekleştirilen plazma MMA ölçümü yanı sıra, plazma Hcy ölçümü ile fonksiyonel B12 vitamin eksikliğinin varlığı gösterilmiştir.
3. Çalışmamız 5-18 yaşları arasındaki çocuk ve adolesanlardan oluşan FKÜ’li hastalarda, yaş uyumlu olarak seçilen kontrol grubu kullanılarak fonksiyonel B12 vitamin eksikliğinin araştırıldığı ilk çalışmadır.
4. FKÜ’li hastalarda ve sağlıklı kontrollerde, B12 vitamin eksikliğinin belirlenmesinde MMA ölçümünün, serum B12 vitamini ölçümüne göre daha fazla tanı koydurucu olduğu ilk kez gösterilmiştir.

Çalışmamızın bulguları ışığında sunulan öneriler aşağıdaki gibidir:

1. FKÜ’li hastalarda, fenilalaninden zengin hayvansal gıdaları tüketemedikleri için B12 vitamini eksikliği görülebilir. Bu hastalarda yılda bir kez yapılan B12 vitamini, folik asit ve Hcy ölçümüne ek olarak duyarlı ve özgül analize olanak tanıyan ve klinik laboratuvarlarda kullanımı giderek yaygınlaşan MRM-LC-MS/MS yöntemi ile MMA ölçümünün yapılması, fonksiyonel B12 vitamin eksikliğin belirlenmesinde yararlı olacaktır.
2. B12 vitamininin besinsel alımında herhangi bir kısıtlamanın olmadığı sağlıklı çocuklarda, FKÜ’li hastalardan daha yüksek oranda fonksiyonel B12 vitamin eksikliği tespit edilmiştir. Bu nedenle B12 vitamin eksikliğinin nörolojik bozukluklar ortaya çıkmadan önce erken aşamada belirlenmesi amacıyla, subklinik B12 vitamin eksikliği olan çocuklarda MMA ve Hcy ölçümünün yapılmasının yarar sağlayacağı düşünülmektedir.
3. B12 vitamin eksikliğinde MMA ölçümünün B12 vitamin ölçümüne göre tanısal değerinin incelenmesinde, örnek sayısı artırılarak güven aralığının daraltılmasıyla daha güvenilir sonuçlar elde etmek mümkün olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Stover PJ. Vitamin B12 and older adults. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010;13:24-7.
2. Ball GFM. *Vitamins: their role in human body*. First Edition. Oxford, Wiley-Blackwell, 2004;383-392.
3. Herrmann W, Obeid R. Causes and early diagnosis of vitamin B12 deficiency. *Dtsch Arztebl Int* 2008;105:680-5.
4. Robert C. Vitamin B12 deficiency. *Am Fam Physician* 2003;67:979-86.
5. Pfeiffer CM, Caudill SP, Gunter EW, Osterloh J, et al. Biochemical indicators of B vitamin status in the US population after folic acid fortification: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000. *Am J Clin Nutr* 2005;82:442-50.
6. Bjørke-Monsen AL, Ueland PM. Cobalamin status in children. *J Inherit Metab Dis* 2011;34:111-9.
7. Wetherilt H, Ackurt F, Brubacher G, Okan B, et al. Blood vitamin and mineral levels in 7-17 years old Turkish children. *Int J Vitam Nutr Res* 1992;62:21-9.
8. Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet* 2010;376:1417-27.
9. Walter JH. Vitamin B12 deficiency and phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2011;104:Suppl:S52-4.
10. Feillet F, Agostoni C. Nutritional issues in treating phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2010;33:659-64.
11. Hanley WB, Feigenbaum A, Clarke JT, Schoonheydt W, et al. Vitamin B12 deficiency in adolescents and young adults with phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1996;155:S145-7.
12. Aung TT, Klieber A, McGinn J, McGinn T. Vitamin B 12 deficiency in an adult phenylketonuric patient. *J Inherit Metab Dis* 1997;20:603-604.
13. Robinson M, White FJ, Cleary MA, Wraith E, et al. Increased risk of vitamin B12 deficiency in patients with phenylketonuria on an unrestricted or relaxed diet. *J Pediatr* 2000;136:545-7.
14. Cleary M, Walter JH. Assessment of adult phenylketonuria. *An Clin Biochem* 2001;38:450-8.
15. Hvas AM, Nexø E, Nielsen JB. Vitamin B12 and vitamin B6 supplementation is needed among adults with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2006;9:47-53.

16. Vugteveen I, Hoeksma M, Monsen ALB, Fokkema MR, et al. Serum vitamin B12 concentrations within reference values do not exclude functional vitamin B12 deficiency in PKU patients of various ages. *Mol Genet Metab* 2011;102:13-17.
17. Yetley EA, Pfeiffer CM, Phinney KW, Bailey RL, et al. Biomarkers of vitamin B-12 status in NHANES: a roundtable summary. *Am J Clin Nutr* 2011;94:313S-321S.
18. Klee GG. Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B(12) and folate. *Clin Chem* 2000;46:1277-83.
19. Carvalho VM, Kok F. Determination of serum methylmalonic acid by alkylative extraction and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 2008;381:67-73.
20. Okuda K. Discovery of vitamin B12 in the liver and its absorption factor in the stomach: a historical review. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:301-8.
21. Smith EL, Fantes KH, Ball S, Waller JG, et al. B12 vitamins (cobalamins). I. Vitamins B12c and B12d. *Biochem J* 1952;52:389-95.
22. Hodgkin DC, Kamper J, Trueblood JG, Prosen RJ. Structure of vitamin B12. *Nature* 1955;176:325-30.
23. Bingöl G. Vitaminler ve enzimler. Ankara, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi yayınları, 1977;20-23.
24. Herbert V. Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin B-12 in humans. *Am J Clin Nutr* 1987;45:671-8.
25. Herbert V. Vitamin B-12: plant sources, requirements, and assay. *Am J Clin Nutr* 1988;48:852-8.
26. Gruber K, Puffer B, Kräutler B. Vitamin B12-derivatives-enzyme cofactors and ligands of proteins and nucleic acids. *Chem Soc Rev* 2011;40:4346-63.
27. Watkins D, Rosenblatt DS. Inborn errors of cobalamin absorption and metabolism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2011;157:33-44.
28. Watanabe F. Vitamin B12 sources and bioavailability. *Exp Biol Med* 2007;232:1266-74.
29. Food and Nutrition Board, Commission on Life Sciences, National Research Council. Recommended dietary allowances. 10th Edition. Washington, National Academy Press, 1989;158-165.

30. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academy of Sciences. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington, National Academy Press, 1998;306-356.
31. Lildballe DL, Fedosov S, Sherliker P, Hin H, et al. Association of cognitive impairment with combinations of vitamin B₁₂-related parameters. *Clin Chem* 2011;57:1436-43.
32. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Second Edition. China, Sun Fung Offset, 2004;279-287.
33. Tanpaiboon P. Methylmalonic acidemia (MMA). *Mol Genet Metab* 2005;85:2-6.
34. Mørkbak AL, Hvas AM, Lloyd-Wright Z, Sanders TA, et al. Effect of vitamin B12 treatment on haptocorrin. *Clin Chem* 2006;52:1104-11.
35. Fasching C, Singh J. Quantitation of methylmalonic acid in plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 2010;603:371-8.
36. Wolters M, Ströhle A, Hahn A. Cobalamin: a critical vitamin in the elderly. *Prev Med* 2004;39:1256-66.
37. Bjørke Monsen AL, Ueland PM. Homocysteine and methylmalonic acid in diagnosis and risk assessment from infancy to adolescence. *Am J Clin Nutr* 2003;78:7-21.
38. Wu LL, Wu JT. Hyperhomocysteinemia is a risk factor for cancer and a new potential tumor marker. *Clin Chim Acta* 2002;322:21-8.
39. Kerr MA, Livingstone B, Bates CJ, Bradbury I, et al. Folate, related B vitamins, and homocysteine in childhood and adolescence: potential implications for disease risk in later life. *Pediatrics* 2009;123:627-35.
40. Andrès E, Loukili NH, Noel E, Kaltenbach G, et al. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *CMAJ* 2004;171:251-9.
41. Schrempf W, Eulitz M, Neumeister V, Siegert G, et al. Utility of measuring vitamin B12 and its active fraction, holotranscobalamin, in neurological vitamin B12 deficiency syndromes. *J Neurol* 2011;258:393-401.
42. Shobha V, Tarey SD, Singh RG, Shetty P, et al. Vitamin B₁₂ deficiency & levels of metabolites in an apparently normal urban south Indian elderly population. *Indian J Med Res* 2011;134:432-9.

43. Markle HV. Cobalamin. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1996;33:247-356.
44. Snow CF. Laboratory diagnosis of vitamin B12 and folate deficiency: a guide for the primary care physician. *Arch Intern Med* 1999;159:1289-98.
45. Carmel R. Malabsorption of food cobalamin. *Baillieres Clin Haematol* 1995;8:639-55.
46. Allen LH. How common is vitamin B-12 deficiency?. *Am J Clin Nutr* 2009;89:693S-6S.
47. Dharmarajan TS, Norkus EP. Approaches to vitamin B12 deficiency; early treatment may prevent devastating complications. *Postgraduate Med* 2001;110:99-105.
48. Seetharam B, Yammani RR. Cobalamin transport proteins and their cell-surface receptors. *Expert Rev Mol Med* 2003;5:1-18.
49. Kayaalp O. Antianemik ilaçlar. In: Kayaalp O. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 10.baskı. Ankara, Hacettepe-Taş, 2002, p.1517-27.
50. Maralcan M, Ellidokuz E. Vitamin B12 eksikliği. *Güncel Gastroenteroloji* 2004;8/3:199-204.
51. Carmel R. Nutritional anemias and the elderly. *Semin Hematol* 2008;45:225-34.
52. Cuskelly GJ, Mooney KM, Young IS. Folate and vitamin B12: friendly or enemy nutrients for the elderly. *Proc Nutr Soc* 2007;66:548-58.
53. Lindenbaum J, Heaton EB, Savage DG, Brust JC, et al. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. *N Engl J Med* 1988;318:1720-1728.
54. Bjorkegren K, Svardsudd K. A population-based intervention study on elevated serum levels of methylmalonic acid and total homocysteine in elderly people: results after 36 months of follow-up. *J Intern Med* 2004;256:446-452.
55. Heaton EB, Savage DG, Brust JC, Garrett TJ, et al. Neurologic aspects of cobalamin deficiency. *Medicine* 1991;70:229-245.
56. Chatthanawaree W. Biomarkers of cobalamin (vitamin B12) deficiency and its application. *J Nutr Health Aging* 2011;15:227-31.
57. Miller JW, Garrod MG, Rockwood AL, Kushnir MM, et al. Measurement of total vitamin B12 and holotranscobalamin, singly and in combination, in screening for metabolic vitamin B12 deficiency. *Clin Chem* 2006;52:278-85.
58. McPhedran P, Barnes MG, Weinstein JS, Robertson JS. Interpretation of electronically determined macrocytosis. *Ann Intern Med* 1973;78:677-83.

59. Carmel R, Herbert V. Deficiency of a vitamin B12-binding alpha globulin in two brothers. *Blood* 1969;33:1-12.
60. Gimsing P, Nexø E. Cobalamin-binding capacity of haptocorrin and transcobalamin: age-correlated reference intervals and values from patients. *Clin Chem* 1989;35:1447-51.
61. Green R. Indicators for assessing folate and vitamin for monitoring the efficacy of intervention strategies. *Am J Clin Nutr* 2011;94:666S-72S.
62. Hølleland G, Schneede J, Ueland PM, Lund PK, et al. Cobalamin deficiency in general practice. Assessment of the diagnostic utility and cost-benefit analysis of methylmalonic acid determination in relation to current diagnostic strategies. *Clin Chem* 1999;45:189-98.
63. Carmel R. Current Concepts In Cobalamin Deficiency. *Annu Rev Med* 2000;51:357–375.
64. Carmel R. Biomarkers of cobalamin (vitamin B-12) status in the epidemiologic setting: a critical overview of context, applications, and performance characteristics of cobalamin, methylmalonic acid, and holotranscobalamin II. *Am J Clin Nutr* 2011;94:348S-358S.
65. Lindenbaum J, Rosenberg IH, Wilson PW, Stabler SP, et al. Prevalence of cobalamin deficiency in the Framingham elderly population. *Am J Clin Nutr* 1994;60:2-11.
66. van Asselt DZ, de Groot LC, van Staveren WA, Blom HJ, et al. Role of cobalamin intake and atrophic gastritis in mild cobalamin deficiency in older Dutch subjects. *Am J Clin Nutr* 1998;68:328-34.
67. Carmel R, Green R, Jacobsen DW, Rasmussen K, et al. Serum cobalamin, homocysteine, and methylmalonic acid concentrations in a multiethnic elderly population: ethnic and sex differences in cobalamin and metabolite abnormalities. *Am J Clin Nutr* 1999;70:904-10.
68. Amos RJ, Dawson DW, Fish DI, Leeming RJ, et al. Guidelines on the investigation and diagnosis of cobalamin and folate deficiencies. *Clin Lab Haematol* 1994;46:101–15.
69. Hvas AM, Nexø E. Diagnosis and treatment of vitamin B12 deficiency-an update. *Haematologica* 2006;91:1506-12.

70. Lamers Y. Indicators and methods for folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status assessment in humans. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011;14:445-54.
71. Kumar SS, Chouhan RS, Thakur MS. Trends in analysis of vitamin B12. *Anal Biochem* 2010;398:139-49.
72. Bor MV, Nexø E, Hvas AM. Holo-transcobalamin concentration and transcobalamin saturation reflect recent vitamin B12 absorption better than does serum vitamin B12. *Clin Chem* 2004;50:1043-9.
73. Nexø E, Hvas AM, Bleie Ø, Refsum H, et al. Holo-transcobalamin is an early marker of changes in cobalamin homeostasis. A randomized placebo-controlled study. *Clin Chem* 2002;48:1768-71.
74. Herrmann W, Schorr H, Obeid R, Geisel J. Vitamin B-12 status, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians. *Am J Clin Nutr* 2003;78:131-6.
75. Carmel R. Measuring and interpreting holo-transcobalamin (holo-transcobalamin II). *Clin Chem* 2002;48:407-409.
76. Hvas AM, Nexø E. Holotranscobalamin—a first choice assay for diagnosing early vitamin B deficiency?. *J Intern Med* 2005;257:289-298.
77. Ulleland M, Eilertsen I, Quadros EV, Rothenberg SP, et al. Direct assay for cobalamin bound to transcobalamin (holo-transcobalamin) in serum. *Clin Chem* 2002;48:526-532.
78. Clarke R, Sherliker P, Hin H, Nexø E, et al. Detection of vitamin B12 deficiency in older people by measuring vitamin B12 or the active fraction of vitamin B12, holotranscobalamin. *Clin Chem* 2007;53:963-970.
79. Obeid R, Herrmann W. Holotranscobalamin in laboratory diagnosis of cobalamin deficiency compared to total cobalamin and methylmalonic acid. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1746-1750.
80. Bor MV, Nexø E, Hvas AM. Holo-transcobalamin concentration and transcobalamin saturation reflect recent vitamin B12 absorption better than does serum vitamin B12. *Clin Chem* 2004;50:1043-9.
81. Miller JW, Garrod MG, Rockwood AL, Kushnir MM, et al. Measurement of total vitamin B12 and holotranscobalamin, singly and in combination, in screening for metabolic vitamin B12 deficiency. *Clin Chem* 2006;52:278-285.

82. Miller JW, Ramos MI, Garrod MG, Flynn MA, et al. Transcobalamin II 775G>C polymorphism and indices of vitamin B12 status in healthy older adults. *Blood* 2002;100:718-20.
83. Dinger M, Veitl M, Skoupy S, Wojcik J, et al. Effect of TCN2 776C>G on vitamin B12 cellular availability in end-stage renal disease patients. *Kidney Int* 2003;64:1095-100.
84. Baker H, Leevy CB, DeAngelis B, Frank O, et al. Cobalamin (Vitamin B12) and holotranscobalamin changes in plasma and liver tissue in alcoholics with liver disease. *J Am Coll Nutr* 1998;17:235-8.
85. Nexo E, Hoffmann-Lücke E. Holotranscobalamin, a marker of vitamin B-12 status: analytical aspects and clinical utility. *Am J Clin Nutr* 2011;94:359S-365S.
86. Nexo E, Christensen AL, Hvas AM, Petersen TE, et al. Quantification of holotranscobalamin, a marker of vitamin B12 deficiency. *Clin Chem* 2002;48:561-2.
87. Ueland PM. Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin Chem* 1995;41:340-2.
88. Persichilli S, Gervasoni J, Iavarone F, Zuppi C, et al. A simplified method for the determination of total homocysteine in plasma by electrospray tandem mass spectrometry. *J Sep Sci* 2010;33:3119-24.
89. Norman EJ. Urinary methylmalonic acid/creatinine ratio defines true tissue cobalamin deficiency. *Br J Haematol* 1998;100(3):614-5.
90. Frankenburg FR. The role of one-carbon metabolism in schizophrenia and depression. *Harv Rev Psychiatry* 2007;15:146-60.
91. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, et al. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993;39:1764-79.
92. Li S, Jia J, Liu G, Wang W, et al. Improved and simplified LC-ESI-MS/MS method for homocysteine determination in human plasma: application to the study of cardiovascular diseases. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008;870:63-7.
93. Rafii M, Elango R, House JD, Courtney-Martin G, et al. Measurement of homocysteine and related metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009;877:3282-91.

94. Tomaiuolo M, Vecchione G, Margaglione M, Pisanelli D, et al. Stable-isotope dilution LC-ESI-MS/MS techniques for the quantification of total homocysteine in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009;877:3292-9.
95. Hanson NQ, Eckfeldt JH, Schwichtenberg K, Aras O, et al. Interlaboratory variation of plasma total homocysteine measurements: results of three successive homocysteine proficiency testing surveys. *Clin Chem* 2002;48:1539-45.
96. Kölkel S, Okun JG. Methylmalonic acid-an endogenous toxin?. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:621-4.
97. Morath MA, Okun JG, Müller IB, Sauer SW, et al. Neurodegeneration and chronic renal failure in methylmalonic aciduria-a pathophysiological approach. *J Inherit Metab Dis* 2008;31:35-43.
98. Manoli I, Venditti CP. Methylmalonic Acidemia. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP (Eds). *GeneReviews™* [Internet], Seattle: University of Washington, Seattle, 1993-2005. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1231>.
99. Hörster F, Hoffmann GF. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of methylmalonic aciduria-recent advances and new challenges. *Pediatr Nephrol* 2004;19:1071-74.
100. Mccann MT, Thompson MM, Gueron IC, Lemieux B, et al. Methylmalonic acid quantification by stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry from filter paper urine samples. *Clin Chem* 1996;42:910-914.
101. Norman EJ, Morrison JA. Screening elderly populations for cobalamin (vitamin B12) deficiency using the urinary methylmalonic acid assay by gas chromatography mass spectrometry. *Am J Med* 1993;94:589-594.
102. Magera MJ, Helgeson JK, Matern D, Rinaldo P. Methylmalonic acid measured in plasma and urine by stable-isotope dilution and electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2000;46:1804-10.
103. Kushnir MM, Komaromy-Hiller G, Shushan B, Urry FM, et al. Analysis of dicarboxylic acids by tandem mass spectrometry. High-throughput quantitative measurement of methylmalonic acid in serum, plasma, and urine. *Clin Chem* 2001;47:1993-2002.
104. Hempen C, Wanschers H, van der Sluijs Veer G. A fast liquid chromatographic tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of total homocysteine and methylmalonic acid. *Anal Bioanal Chem* 2008;391:263-70.

105. Schmedes A, Brandslund I. Analysis of methylmalonic acid in plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2006;52:754-7.
106. Blom HJ, van Rooij A, Hogeveen M. A simple high-throughput method for the determination of plasma methylmalonic acid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:645-650.
107. Lakso HA, Appelblad P, Schneede J. Quantification of methylmalonic acid in human plasma with hydrophilic interaction liquid chromatography separation and mass spectrometric detection. *Clin Chem* 2008;54:2028-35.
108. Savage DG, Lindenbaum J, Stabler SP, Allen RH. Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. *Am J Med* 1994;96:239-246.
109. Gauchan D, Joshi N, Gill AS, Patel V, et al. Does an elevated serum vitamin B(12) level mask actual vitamin B(12) deficiency in myeloproliferative disorders?. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2012 Mar 15.
110. Solomon LR. Diabetes as a cause of clinically significant functional cobalamin deficiency. *Diabetes Care* 2011;34:1077-80.
111. Følling I. The discovery of phenylketonuria. *Acta Paediatr Suppl* 1994;407:4-10.
112. Jervis GA. Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidizing system. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953;82:514-5.
113. Bickel H, Gerrard J, Hickmans EM. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet* 1953;17:812-3.
114. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963;32:338-43.
115. van Spronsen FJ. Phenylketonuria: a 21st century perspective. *Nat Rev Endocrinol* 2010;6:509-514.
116. Loeber JG. Neonatal screening in Europe; the situation in 2004. *J Inherit Metab Dis* 2007;30:430-8.
117. Coşkun T. Kalıtsal metabolik hastalıklar, In: Yurdakök M, Erdem G (Eds), *Neonatoloji*, Ankara: Alp Ofset, 2004,309-343.
118. Ulusoy M, Tunçbilek E. Türkiye'de akraba evlilikleri ve çocuk ölümlerine etkisi. *Nüfusbilim Derg* 1987;9:7-26.

119. Kohli S, Saxena R, Thomas E, Rao P, et al. Prenatal diagnosis of phenylketonuria. *Indian J Med Res* 2005;122:400-3.
120. Scriver CR. The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. *Hum Mutat* 2007;28:831-845.
121. Özgüç M, Özalp I, Coşkun T, Yılmaz E, et al. Mutation analysis in Turkish phenylketonuria patients. *J Med Genet* 1993;30:129-30.
122. Coşkun T. Fenilalanin, In: Coşkun T (Eds), *Aminoasit metabolizması ve bozuklukları*, Ankara, Alp ofset ve matbaacılık 2003,182-236.
123. Guldberg P, Zschocke J, Romano V, Franc B, et al. A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based. *Am J Hum Genet* 1998;63:71-79.
124. Thöny B, Blau N. Mutations in the BH4 -metabolizing genes GTP cyclohydrolase I, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase, sepiapterin reductase, carbinolamine-4a-dehydratase, and dihydropteridine reductase. *Hum Mutat* 2006;27:870-878.
125. Walter JH. Late effects of phenylketonuria. *Arch Dis Child* 1995;73:485-486.
126. Harding CO, Blau N. Advances and challenges in phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2010;33:645-8.
127. van Spronsen FJ, Enns GM. Future treatment strategies in phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2010;99:S90-S95.
128. Giovannini M, Verduci E, Salvatici E, Fiori L, et al. Phenylketonuria: dietary and therapeutic challenges. *J Inherit Metab Dis* 2007;30:145-52.
129. Demirkol M, Gizewska M, Giovannini M, Walter J. Follow up of phenylketonuria patients. *Mol Genet Metab* 2011;104:S31-39.
130. Przyrembel H, Bremer HJ. Nutrition, physical growth, and bone density in treated phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 2000;159:S129-35.
131. Giovannini M, Verduci E, Salvatici E, Paci S, et al. Phenylketonuria: nutritional advances and challenges. *Nutr Metab* 2012;9;7.
132. van Spronsen FJ, van Rijn M, Bekhof J, Koch R, et al. Phenylketonuria: tyrosine supplementation in phenylalanine-restricted diets. *Am J Clin Nutr* 2001;73:153-7.
133. MacDonald A, Rocha JC, van Rijn M, Feillet F. Nutrition in phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2011;104:S10-8.

134. Prince AP, Leklem JE. Vitamin B-6 status of school-aged patients with phenylketonuria. *Am J Clin Nutr* 1994;60:262-8.
135. Koch R, Burton B, Hoganson G, Peterson R, et al. Phenylketonuria in adulthood: a collaborative study. *J Inherit Metab Dis* 2002;25:333-46.
136. Acosta PB. Nutrition studies in treated infants and children with phenylketonuria: vitamins, minerals, trace elements. *Eur J Pediatr* 1996;155:S136-9.
137. Schulpis KH, Karikas GA, Papakonstantinou E. Homocysteine and other vascular risk factors in patients with phenylketonuria on a diet. *Acta Paediatr* 2002;91:905-9.
138. Artuch R, Colomé C, Vilaseca MA, Sierra C, et al. Plasma phenylalanine is associated with decreased serum ubiquinone-10 concentrations in phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2001;24:359-66.
139. Bodley JL, Austin VJ, Hanley WB, Clarke JT, et al. Low iron stores in infants and children with treated phenylketonuria: a population at risk for iron-deficiency anaemia and associated cognitive deficits. *Eur J Pediatr* 1993;152:140-3.
140. Weigel C, Kiener C, Meier N, Schmid P, et al. Carnitine status in early-treated children, adolescents and young adults with phenylketonuria on low phenylalanine diets. *Ann Nutr Metab* 2008;53:91-5.
141. Yi SHL, Kable JA, Evatt ML, Singh RH. A cross-sectional study of docosahexaenoic acid status and cognitive outcomes in females of reproductive age with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2011;34:455-63.
142. Rosell MS, Lloyd-Wright Z, Appleb PN, Sanders TAB, et al. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids in plasma in British meat-eating, vegetarian, and vegan men. *Am J Clin Nutr* 2005;82:327-34.
143. Schulpis KH, Tsakiris S, Karikas GA, Moukas M, et al. Effect of diet on plasma total antioxidant status in phenylketonuric patients. *Eur J Clin Nutr* 2003;57:383-7.
144. Fisberg RM, Da Silva-Femandes ME, Fisberg M, Schmidt BJ. Plasma zinc, copper, and erythrocyte superoxide dismutase in children with phenylketonuria. *Nutrition* 1999;15:449-52.
145. Barretto JR, Silva LR, Leite ME, Boa-Sorte N, et al. Poor zinc and selenium status in phenylketonuric children and adolescents in Brazil. *Nutr Res* 2008;28:208-11.
146. Sierra C, Vilaseca MA, Moyano D, Brandi N, et al. Antioxidant status in hyperphenylalaninemia. *Clin Chim Acta* 1998;276:1-9.

147. Sitta A, Vanzin CS, Biancini GB, Manfredini V, et al. Evidence that L-carnitine and selenium supplementation reduces oxidative stress in phenylketonuric patients. *Cell Mol Neurobiol* 2011;31:429-36.
148. Lombeck I, Jochum F, Terwolbeck K. Selenium status in infants and children with phenylketonuria and in maternal phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 1996;155:S140-4.
149. Brenton DP, Pietz J. Adult care in phenylketonuria and hyperphenylalaninaemia: the relevance of neurological abnormalities. *Eur J Pediatr* 2000;159:114-120.
150. Hogeveen M, van Beynum I, van Rooij A, Kluijtmans L, et al. Methylmalonic acid values in healthy Dutch children. *Eur J Nutr* 2008;47:26-31.
151. Akhun Pınar A, Çocukluk çağında laboratuvar referans değerleri, In: Hasanoğlu E, Düşünsel R, Bideci A (Eds), *Temel pediatri*. 1.basım. Ankara: Güneş tıp kitapçevleri, 2010, 1753-1783.
152. http://www.acibademlabmed.com.tr/test_detay.asp?intTestId=8392102
153. Herrmann W, Schorr H, Bodis M, Knapp JP, et al. Role of homocysteine, cystathionine and methylmalonic acid measurement for diagnosis of vitamin deficiency in high-aged subjects. *Eur J Clin Invest* 2000;30:1083-9.
154. Stabler SP, Allen RH, Dolce ET, Johnson MA. Elevated serum S-adenosylhomocysteine in cobalamin-deficient elderly and response to treatment. *Am J Clin Nutr* 2006;84:1422-9.
155. Grebe SK, Singh RJ. LC-MS/MS in the Clinical Laboratory – Where to From Here?. *Clin Biochem Rev* 2011;32:5–31.
156. Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol* 2008;4:222.
157. Kirchhoff F, Lorenzl S, Vogeser M. An on-line solid phase extraction procedure for the routine quantification of urinary methylmalonic acid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:1647-1650.
158. Pedersen TL, Keyes WR, Shahab-Ferdows S, Allen LH, et al. Methylmalonic acid quantification in low serum volumes by UPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2011;879:1502-6.
159. Food and Drug Administration, US Department of Health and Human Services, *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*, May 2001.

- 160.** Aksakoğlu G. Sağlıkta araştırma ve özümleme. İkinci basım. İzmir, Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlük Basımevi, 2006;247,274-82.
- 161.** Yuan C, Gabler J, El-Khoury JM, Spatholt R, et al. Highly sensitive and selective measurement of underivatized methylmalonic acid in serum and plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal Bioanal Chem 2012 May 23, [Basımda].

8. EKLER

EK 1. ETİK KURUL ONAYI

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2011/05- 10	Tarih:25.02.2011
	Prof.Dr.Hüray İŞLEKEL'in sorumlusu Yük.Lis.Öğr.Merve AKIŞ'ın yürütücüsü olduğu "Fenilketonüriili olgularda fonksiyonel B12 vitamin eksikliğinin metabolik biyobelirteçlerle değerlendirilmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekeçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Kurullar Yönetmeliği , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Ph.D.Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Ph.D.Z.Candan ALGUN	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek okulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Ph.D.Zuhal BAHAR	Ph.D.Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ömer Selahattin TOPALAK	İç Hastalıkları (Gastroenteroloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.İşıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.PhD.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	

EK 2. HASTALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

Fenilketonüri diyetimizle aldığımız fenilalanini tirozin adı verilen bir başka aminoaside çeviren bir enzimin (fenilalanin hidroksilaz) genetik yokluğu sonucu ortaya çıkan bir metabolik hastalıktır. Fenilketonüri ülkemizde yenidoğan tarama programında bulunan ve bu sayede erken tanı alabilen bir hastalıktır. Hastalık tedavi edilmezse ağır zeka geriliği ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle yenidoğan döneminden itibaren tanı alan bütün fenilketonürlü hastalara fenilalaninden kısıtlı diyet tedavisi verilmektedir.

Fenilketonürlü çocuklar diyetlerinde kısıtlı fenilalanin alabilmek için hayvansal doğal protein kaynaklarını (et, süt, yumurta, kuru baklagiller) tüketememektedirler. Bunun yerine protein ve enerji kaynağı olarak fenilalanin içermeyen özel formülalar (mamalar) kullanmaktadırlar. B12 vitamini en fazla hayvansal protein kaynaklarında bulunur. Bu nedenle fenilketonürlü hastalarda B12 vitamini eksikliği ortaya çıkabilir.

Bu çalışmada fenilketonürlü çocuklarda kan B12 düzeyi, B12 vitamini eksikliğinin erken göstergeleri olan kanda metilmalonik asit ve homosistein düzeyleri bakılacaktır. Bu verilerle çocuğunuzun ağırlık, boy, fenilalanin düzeyi, diyetle aldığı enerji ve protein miktarı, kan sayımı parametreleri arasında ilişki kurulacaktır. Öncelikle bu sonuçlarla çocuğunuzda B12 vitamini eksikliği olup olmadığını öğreneceksiniz. Eğer eksiklik varsa çocuğunuza tedavi başlanacaktır. İkinci olarak da dünya literatürü için önemli bir kaynak oluşturacak olan böyle bir araştırmaya katılmış olacaksınız.

Çalışmaya katılım tek kontrolle sınırlıdır ve hastanız hastalığı ve tedavisinin gerektirdiği sıklıkta poliklinik kontrollerine gelmeye devam edecektir, bu çalışma için tekrar çağırılmayacaktır. Kan alınma işlemi sonrasında hastanıza uygulanacak herhangi bir ek işlem bulunmamaktadır.

Kan alma işlemi sırasında kanın damar dışına sızmasına bağlı ciltte morarma ve ağrı olabilir, bu durum çocuğunuz için ciddi bir risk oluşturmayacak; kendiliğinden gerileyecektir. Ayrıca çocuklarda damarların her zaman çok belirgin olmamasından dolayı kan alma işleminin başarısız olma ihtimali mevcuttur, bu durumda işlemin tekrar denmesi gerekebilir. Bunun dışında hastanızın araştırmaya bağlı herhangi bir zarar görmesi söz konusu değildir. Herhangi bir sorunuzun olması halinde bilgi almak için Dr. Nur Arslan veya Dr. İshak Işık ile iletişim kurabilirsiniz. Hastanızın kanları çalışma sonunda imha edilecektir.

Sizinle birlikte yaklaşık 30 hastanın çalışmaya dahil edilmesi planlanmaktadır. Hasta bu çalışmaya katılmayı reddetme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Bu çalışmaya katılmanız veya başladıktan sonra herhangi bir safhasında ayrılmanız daha sonraki tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir. Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Bu çalışma sırasında bakılacak ek parametreler için gerekli olan işlemin masrafı size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir. Bu çalışmada yer aldığınız süre içerisinde kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığı'na açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır.

Yukarıdaki bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün

Adı- soyadı:

Telefon:

Adres:

İmzası:

Gönüllünün veli/vasisi

Adı- soyadı:

Telefon:

Adres:

İmzası:

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı- soyadı: Dr. İshak Işık

Telefon: 0505 222 68 68

İmzası:

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı-soyadı:

Görevi:

İmzası:

Tarih:/...../....

EK 3. KONTROLLER İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

Fenilketonüri diyetimizle aldığımız fenilalanini tirozin adı verilen bir başka aminoaside çeviren bir enzimin (fenilalanin hidroksilaz) genetik yokluğu sonucu ortaya çıkan bir metabolik hastalıktır. Fenilketonüri ülkemizde yenidoğan tarama programında bulunan ve bu sayede erken tanı alabilen bir hastalıktır. Hastalık tedavi edilmezse ağır zeka geriliği ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle yenidoğan döneminden itibaren tanı alan bütün fenilketonürlü hastalara fenilalaninden kısıtlı diyet tedavisi verilmektedir.

Fenilketonürlü çocuklar diyetlerinde kısıtlı fenilalanin alabilmek için hayvansal doğal protein kaynaklarını (et, süt, yumurta, kuru baklagiller) tüketememektedirler. Bunun yerine protein ve enerji kaynağı olarak fenilalanin içermeyen özel formüller (mamalar) kullanılmaktadır. B12 vitamini en fazla hayvansal protein kaynaklarında bulunur. Bu nedenle fenilketonürlü hastalarda B12 vitamini eksikliği ortaya çıkabilir.

Bu çalışmada fenilketonürlü çocuklarda kan B12 düzeyi, B12 vitamini eksikliğinin erken göstergeleri olan kanda metilmalonik asit ve homosistein düzeyleri bakılacaktır. Bu verilerle çocuğunuzun ağırlık, boy, fenilalanin düzeyi, diyetle aldığı enerji ve protein miktarı, kan sayımı parametreleri arasında ilişki kurulacaktır. Bu çalışmaya katılmanız birkaç açıdan önem taşımaktadır: Öncelikle çocuğunuzda B12 vitamini eksikliği olup olmadığı öğrenilecek ve eksiklik saptanırsa tedavisi planlanacaktır. İkincisi dünya literatürüne önemli katkılar sağlayacak böyle bir araştırmaya katılmış olacaksınız. Ayrıca, hasta çocuklarda görülen B12 eksikliğinin sıklığını ve düzeyini anlamamız için sizinki gibi sağlıklı çocuklarla karşılaştırılması gereklidir.

Bu çalışmada, hastanemiz polikliniklerinde muayene edilen ve herhangi bir tarama için (kan sayımı, tiroid testleri, kan şekeri, hepatit taraması vb.) kan alınması planlanan sağlıklı çocuğunuzdan bu testler için alınacak kan örneklerinden yukarıdaki incelemelerde yapılacaktır. Çalışmaya katılım tek seferle sınırlıdır ve çocuğunuz çalışma için tekrar çağırılmayacaktır. Kan alınma işlemi sonrasında çocuğunuza uygulanacak herhangi bir ek işlem bulunmamaktadır. Kan alma işlemi sırasında kanın damar dışına sızmasına bağlı ciltte morarma ve ağrı olabilir, bu durum çocuğunuz için ciddi bir risk oluşturmayacak; kendiliğinden gerileyecektir. Ayrıca çocuklarda damarların her zaman çok belirgin olmamasından dolayı kan alma işleminin başarısız olma ihtimali mevcuttur, bu durumda işlemin tekrar denemesi gerekebilir. Bunun dışında hastanızın araştırmaya bağlı herhangi bir

zarar görmesi söz konusu değildir. Herhangi bir sorunuzun olması halinde bilgi almak için Dr. Nur Arslan veya Dr. İshak Işık ile iletişim kurabilirsiniz. Çocuğunuzun kanları çalışma sonunda imha edilecektir. Sizinle birlikte yaklaşık 30 sağlıklı çocuğun çalışmaya dahil edilmesi planlanmaktadır.

Gönüllü bu çalışmaya katılmayı reddetme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Bu çalışmaya katılmanız veya başladıktan sonra herhangi bir safhasında ayrılmanız daha sonraki tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir. Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Bu çalışma sırasında bakılacak ek parametreler için gerekli olan işlemin masrafı size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.

Bu çalışmada yer aldığımız süre içerisinde kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığı'na açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır.

Yukarıdaki bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün

Adı- soyadı: Telefon:

Adres: İmzası:

Gönüllünün veli/vasisi

Adı- soyadı: Telefon:

Adres: İmzası:

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı- soyadı: Dr. İshak Işık

Telefon: 0505 222 68 68

İmzası:

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı-soyadı: Görevi:

İmzası:

Tarih:/...../.....

EK 4. ÖZGEÇMİŞ

Doğum Yılı:	1986
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 35340, İnciraltı/İZMİR
Telefon :	0 232 412 44 29
GSM	0 505 685 79 37
e-posta :	merve8634@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyokimya	Lisans	2009

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/ sorumluluk/olay/üyelik vb.)

Bilimsel Toplantı Düzenleme Ulusal katılımlı, düzenleme komitesinde görevli olarak “Oksidatif Stres, DNA Hasarı, DNA Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi” teorik ve uygulamalı kursu, 22-25 Mayıs 2012, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir. Uluslararası katılımlı, düzenleme komitesinde görevli olarak “6. ORPHEUS Conference-PhD Quality Indicators for Biomedicine and Health Sciences”, 27-30 Nisan 2011, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir.
“Kalite Kılavuzları Temelinde Laboratuvar Hesaplamaları ve Değerlendirmeleri” konulu teorik ve uygulamalı kurs, 11-12 Mayıs 2012, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara.
“FEBS Education Workshop “Trends in Undergraduate Biomolecular Science Education & Tips for Postgraduate Students and Beyond”, 29-30 Mart 2012, İzmir.
“HPLC Metod Geliştirme” konulu teorik kurs, 27 Ekim 2011, İzmir (Düzenleyen Kuruluş: SEM Laboratuvar Cihazları & HICHROM Limited).
“Kanser Biyolojisinde Güncel Konular” konulu teorik kurs, 31 Mayıs-3 Haziran 2011, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir.
“Proteomics applications on 4000QTRAP” eğitimi, 22-24 Mart 2011, Darmstadt, Germany.
“Klinik Laboratuvarlarda Analitik Kalite Yönetimi ve Referans Aralıkları Hesaplama Kursları”, 16-18 Aralık 2010, İzmir.

“Oksidatif Stres, DNA Hasarı, DNA Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi” teorik kursu, 15-18 Haziran 2010, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir.

“Deney Hayvanları Kullanım Kursu”, Nisan 2010, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir.

Türk Biyokimya Derneği Üyesi, 2011-....

YAYINLARI

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

FEBS Education Workshop “Trends in Undergraduate Biomolecular Science Education & Tips for Postgraduate Students and Beyond” Poster Sunumu. A model of biochemistry dry practical for learning liver functions and bilirubin metabolism in Medical School; student feedback. İşlekel H, **Akış M**, Kant M. 29-30 Mart 2012, İzmir.

FEBS Education Workshop “Trends in Undergraduate Biomolecular Science Education & Tips for Postgraduate Students and Beyond” Poster Sunumu. A biochemistry dry practical based on metabolic acid-base disorder cases as an effective vehicle for comprehension of acid-base balance. İşlekel H, Kant M, **Akış M**. 29-30 Mart 2012, İzmir.

23. Ulusal Biyokimya Kongresi Poster Sunumu. “Akciğer kanserinde doku ve serum VEGF, anjiopietin-1 ve anjiopietin-2 düzeylerinin değerlendirilmesi”. İşlekel H, Yusufoglu N, Kant M, **Akış M**, Şanlı A, Özdemir N. 29 Kasım-2 Aralık 2011, Adana.

23. Ulusal Biyokimya Kongresi Poster Sunumu. “Sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi ile hasarlı DNA nükleozidleri S-cdA ve 8-OH-dG’nin idrarda ölçümü için yöntem geçerlilik çalışması.” Kant M, **Akış M**, Tuna G, İşlekel H, Kırkalı G, Dizdaroğlu M. 29 Kasım-2 Aralık 2011, Adana.

6th ORPHEUS Conference-PhD Quality Indicators for Biomedicine and Health Sciences Poster Sunumu. “The PhD Program in Department of Medical Biochemistry Institute of Health Sciences Dokuz Eylul University.” Kant M, Tuna G, **Akış M**, İşlekel H, Kırkalı G. 27-30 Nisan 2011, İzmir

22. Ulusal Biyokimya Kongresi Sözlü Sunum. “Metilmalonik asit ölçümünde LC-MS/MS-MRM yönteminin geçerliliğinin belirlenmesi.” **Akış M**, Dinç M, İşlekel H. 27-30 Ekim 2010, Eskişehir.