

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI

**MİGREN VE GERİLİM TİPİ BAŞAĞRISINDA
VİTAMİN B₆, VİTAMİN B₁₂ VE FOLİK ASİT EKSİKLİĞİNİN ÖNEMİ**

DOKTORA TEZİ

MEHMET ŞENEŞ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. A. Banu Çaycı SİVRİ

ANKARA
Ocak 2013

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI

**MİGREN VE GERİLİM TİPİ BAŞAĞRISINDA
VİTAMİN B₆, VİTAMİN B₁₂ VE FOLİK ASİT EKSİKLİĞİNİN ÖNEMİ**

DOKTORA TEZİ

MEHMET ŞENEŞ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. A. Banu Çaycı SİVRİ

ANKARA

Ocak 2013

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01-2011/59 proje numarası ile desteklenmiştir.

KABUL VE ONAY

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Tıbbi Biyokimya (Tıp) Ana Bilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : 30/01/2013



**Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı**

İmza
**Prof. Dr. A. Banu Çaycı SİVRİ
Gazi Üniversitesi**

İmza
**Prof. Dr. Ayşe BİLGİHAN
Gazi Üniversitesi**

İmza
**Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU
Gazi Üniversitesi**

İmza
**Prof. Dr. Serenay E. ÜLKAR
Ankara Üniversitesi**

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
İÇİNDEKİLER	ii
RESİM VE ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
GRAFİKLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ.....	x
KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Başağrısı Sendromları.....	4
2.1.1. Başağrısı Epidemiyolojisi ve Sınıflandırması	5
2.2. Birincil Başağrısı Sendromları	8
2.2.1. Migren Başağrıları.....	8
2.2.1.1. Migren tanısı ve klinik özellikleri	8
2.2.1.2. Migren sınıflandırması.....	11
2.2.1.2.1. Aurasız migren.....	12
2.2.1.2.2. Auralı migren	13
2.2.1.3. Migren patofizyolojisi.....	14
2.2.1.3.1. Vasküler teori.....	15
2.2.1.3.2. Nörovasküler teori.....	16
2.2.1.4. Migren epidemiyolojisi	18
2.2.2. Gerilim Tipi Başağrısı.....	20
2.2.2.1. Gerilim tipi başağrısı tanısı ve klinik özellikler	20
2.2.2.2. Gerilim tipi başağrısı sınıflandırması	22
2.2.2.3. Gerilim tipi başağrısı patofizyolojisi	23
2.2.2.3.1. Periferik mekanizmalar	24
2.2.2.3.2. Santral mekanizmalar	24
2.2.2.4. Gerilim tipi başağrısı epidemiyolojisi	25
2.3. Vitamin B ₆ , Vitamin B ₁₂ ve Folik Asit	26

2.3.1. Vitamin B ₆ (Piridoksin, Piridoksamin, Piridoksal)	26
2.3.1.1. Vitamin B ₆ biyokimyası	26
2.3.1.2. Vitamin B ₆ emilimi, taşınması, metabolizması ve atılımı	26
2.3.1.3. Vitamin B ₆ fonksiyonları	29
2.3.1.4. Vitamin B ₆ eksikliği	31
2.3.1.5. Vitamin B ₆ eksikliği ve klinik laboratuvar	32
2.3.2. Vitamin B ₁₂	33
2.3.2.1. Vitamin B ₁₂ biyokimyası	34
2.3.2.2. Vitamin B ₁₂ emilimi, taşınması, metabolizması ve atılımı	35
2.3.2.3. Vitamin B ₁₂ fonksiyonları	39
2.3.2.4. Vitamin B ₁₂ eksikliği	41
2.3.2.5. Vitamin B ₁₂ eksikliğinde klinik laboratuvar	42
2.3.3. Folik Asit	45
2.3.3.1. Folik asit biyokimyası	45
2.3.3.2. Folik asit emilimi, taşınması, metabolizması ve atılımı	46
2.3.3.3. Folik asit fonksiyonları	48
2.3.3.4. Folik asit eksikliği	50
2.3.3.5. Folik asit eksikliğinde klinik laboratuvar	51
2.4. Homosistein	53
2.4.1. Homosistein Biyokimyası	53
2.4.2. Homosistein Metabolizması	55
2.4.3. Hiperhomosisteinemi ve Nedenleri	57
2.4.4. Hiperhomosisteineminin Patofizyolojik Mekanizması	58
2.4.5. Homosistein ve Başağrısı Sendromları	60
2.5. Metilmalonik Asit	61
2.5.1. Metilmalonik Asit Biyokimyası	61
2.5.2. Metilmalonik Asit Metabolizması	62
2.5.3. Metilmalonik Asidemi Nedenleri	63

2.5.4. Metilmalonik Asit ve Nörolojik Hasar.....	64
3. GEREÇ VE YÖNTEM	66
3.1. Hasta ve Kontrol Grupları.....	66
3.2. Örnek Alınışı ve Hazırlanışı.....	68
3.3. Kullanılan Ayraçlar ve Cihazlar	69
3.4. Kullanılan Yöntemler	70
3.4.1. Glikoz, Üre, Kreatinin, AST ve ALT Düzeylerinin Ölçüm Yöntemleri.....	70
3.4.2. Vitamin B12, Folik Asit ve Eritrosit İçerik Folik Asit Ölçüm Yöntemleri.....	71
3.4.3. Holo-TC (Aktif B12) Ölçüm Yöntemi	73
3.4.4. Homosistein Ölçüm Yöntemi.....	73
3.4.5. Vitamin B6 Ölçüm Yöntemi	76
3.4.6. MMA Ölçüm Yöntemi	76
3.4.6.1. Elektro Spray İyonizasyon (ESI) LC MS/MS yöntemi.....	77
3.4.6.2. MMA için örnek hazırlama ve ESI LC –MS/MS cihaz ayarları.....	78
3.5. Yöntemlerin Performans Özellikleri	83
3.5.1. Vitamin B12 ve FA Yöntemlerinin Tekrarlanabilirliği	83
3.5.2. Homosistein Ölçüm Yönteminin Tekrarlanabilirliği	83
3.5.3. Holo-TC Ölçüm Yönteminin Tekrarlanabilirliği	83
3.5.4. MMA Ölçüm Yönteminin Performans Özellikleri	84
3.5.4.1. MMA ölçüm yönteminin tekrarlanabilirliği	84
3.5.4.2. MMA ölçüm yönteminin doğruluğu (geri kazanım, %R)	84
3.5.4.3. MMA ölçüm yönteminin minimum saptama sınırı (Limit of Detection, LoD) ve ölçüm sınırı (Limit of Quantitation, LoQ).....	85
3.6. İstatistiksel Analiz.....	85

4. SONUÇLAR.....	86
4.1. Migren (Aurasız+Auralı), Gerilim Tipi Baş ağrısı ve Kontrol Gruplarında Ölçülen Parametreler.....	86
4.2. Migren (Auralı+Aurasız) Gerilim Tipi Baş ağrısı ve Kontrol Gruplarında Ölçülen Değişkenlerin Karşılaştırılması.....	88
4.3. Aurasız, Auralı Migren, Gerilim Tipi Baş ağrısı ve Kontrol Gruplarında Ölçülen Değişkenlerin Karşılaştırılması.....	91
4.4. Migren (Aurasız+Auralı), Gerilim Tipi Baş ağrısı ve Kontrol Gruplarında Ölçülen Değişkenlerin “Boxplot” Grafikleri.....	98
4.5. Aurasız Migren, Auralı Migren, Gerilim Tipi Baş ağrısı ve Kontrol Gruplarında Ölçülen Değişkenlerin “Boxplot” Grafikleri.....	102
4.6. Migren (Aurasız+Auralı), Aurasız Migren, Auralı Migren, Gerilim Tipi Baş ağrısı ve Kontrol Gruplarında Ayırık ve Kontrol ve Hasta Grupları Birleştirildiğinde Ölçülen Değişkenler Arasındaki Korelasyonlar.....	107
4.7. Çalışmada Kullanılan Yöntemlerin Performans Özellikleri	116
4.7.1.1. Vitamin B12 ve Folik Asit Yönteminin Tekrarlanabilirliği.....	116
4.7.2. Holo-TC Yönteminin Tekrarlanabilirliği	117
4.7.3. Homosistein Yönteminin Tekrarlanabilirliği	118
4.7.4. MMA Yönteminin Performans Özellikleri.....	119
4.7.4.1. MMA testinin kalibrasyon eğrisi.....	119
4.7.4.2. MMA testinin çalışma içi ve günler arası tekrarlanabilirliği	120
4.7.4.3. MMA testinin doğruluğu (geri kazanım, %R).....	121
4.7.4.4. MMA testinin minimum saptama sınırı (Limit of Detection, LoD) ve ölçüm sınırı (Limit of Quantitation, LoQ).....	123
4.7.4.5. MMA testi örnek kromatogramları	124

4.8. Fonksiyonel Vitamin B12 Eksikliği Tanısında Değişkenlerin ROC Analizi.....	125
4.8.1. Migren (Auralı+Aurasız) Hasta Grubunda Fonksiyonel Vitamin B12 Eksikliği Değişkenleri İçin ROC Analizi	126
4.8.2. Aurasız Migren Hasta Grubunda Fonksiyonel Vitamin B12 Eksikliği Değişkenleri İçin ROC Analizi.....	127
4.8.3. Auralı Migren Hasta Grubunda Fonksiyonel Vitamin B12 Eksikliği Değişkenleri İçin ROC Analizi	129
4.8.4. Gerilim Tipi Baş ağrısı Hasta Grubunda Fonksiyonel Vitamin B12 Eksikliği Değişkenleri İçin ROC Analizi	130
5. TARTIŞMA.....	132
5.1. Migren ve Gerilim Tipi Baş ağrısında Vitamin B6 Düzeyleri	134
5.2. Migren ve Gerilim Tipi Baş ağrısında Serum Vitamin B12, Folik Asit, Eritrosit İçerik Folik Asit, Homosistein ve MMA Düzeyleri	137
5.3. MMA'nın Migren ve Gerilim Tipi Baş ağrısı Patogenezinde Olası Rolü	148
5.4. MMA Ölçüm Yönteminin Performans Değerlendirmesi	151
5.5. Sonuç.....	153
6. ÖZET	155
7. SUMMARY.....	157
8. KAYNAKLAR	159
9. ETİK KURUL İZNİ	186
10. TEŞEKKÜR.....	188
11.ÖZGEÇMİŞ.....	190

RESİM VE ŞEKİLLER LİSTESİ

Resim 1. İngiliz karikatürist ve ressam George Cruikshank (1792-1878) tarafından 1819 yılında çizilen “Başağrısı” karikatürü.	4
Şekil 1. Vitamin B6’nın altı vitameri ve birbirlerine dönüşümü.	27
Şekil 2. Tek karbon metabolizmasına bakış.	30
Şekil 3. Kobalamin yapısı.	34
Şekil 4. İnsanda vitamin B12 transportu ve emilimi.....	37
Şekil 5. Metiyonin sentaz reaksiyonu.....	40
Şekil 6. L-Metilmalonil KoA mutaz reaksiyonu.	40
Şekil 7. Folik asit yapısı.	46
Şekil 8. Folik asit metabolizması.....	49
Şekil 9. Metiyonin, homosistein, sistein ve sistatyonin formülleri	54
Şekil 10. Metiyonin metabolizması.....	56
Şekil 11. Metilmalonik asit iskelet formülü	61
Şekil 12. Metilmalonik asit oluşum yolağı.	63
Şekil 13. Serum MMA örnek hazırlama protokolü.....	79

GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik 1. Migren (aurasız+auralı), gerilim tipi baş ağrısı ve kontrol grubunda serum vitamin B12 düzeyleri.....	98
Grafik 2. Migren (aurasız+auralı), gerilim tipi baş ağrısı ve kontrol grubunda serum folik asit düzeyleri.	99
Grafik 3. Migren (aurasız+auralı), gerilim tipi baş ağrısı ve kontrol grubunda hesaplanmış eritrosit içi folik asit düzeyleri.....	99
Grafik 4. Migren (aurasız+auralı), gerilim tipi baş ağrısı ve kontrol grubunda düzeltilmiş eritrosit içi folik asit düzeyleri.....	100
Grafik 5. Migren (aurasız+auralı), gerilim tipi baş ağrısı ve kontrol grubunda plazma vitamin B6 düzeyleri	100
Grafik 6. Migren (aurasız+auralı), gerilim tipi baş ağrısı ve kontrol grubunda serum homosistein düzeyleri	
Grafik 7. Migren (aurasız+auralı), gerilim tipi baş ağrısı ve kontrol grubunda serum MMA düzeyleri	101
Grafik 8. Migren (aurasız+auralı), gerilim tipi baş ağrısı ve kontrol grubunda serum Holo-TC düzeyleri	102
Grafik 9. Aurasız migren, auralı migren, gerilim tipi baş ağrısı ve kontrol grubunda serum vitamin B12 düzeyleri.....	103
Grafik 10. Aurasız migren, auralı migren, gerilim tipi baş ağrısı ve kontrol grubunda serum folik asit düzeyleri	103
Grafik 11 Aurasız migren, auralı migren, gerilim tipi baş ağrısı ve kontrol grubunda hesaplanmış eritrosit içi folik asit düzeyleri	104
Grafik 12. Aurasız migren, auralı migren, gerilim tipi baş ağrısı ve kontrol grubunda düzeltilmiş eritrosit içi folik asit düzeyleri.....	104
Grafik 13. Aurasız migren, auralı migren, gerilim tipi baş ağrısı ve kontrol grubunda plazma vitamin B6 düzeyleri	105
Grafik 14. Aurasız migren, auralı migren, gerilim tipi baş ağrısı ve kontrol grubunda serum homosistein düzeyleri	105
Grafik 15. Aurasız migren, auralı migren, gerilim tipi baş ağrısı ve kontrol grubunda serum MMA düzeyleri.....	106

Grafik 16. Aurasız migren, auralı migren, gerilim tipi baş ağrısı ve kontrol grubunda serum Holo-TC düzeyleri	106
Grafik 17. MMA kalibrasyon eğrisi	120
Grafik 18. Tandem MS ile hasta serumunda MMA ölçümünden elde edilen kromatogram. Retansiyon zamanı 3.6 dakika.....	124
Grafik 19. Tandem MS ile hasta serumunda MMA ölçümünden elde edilen kromatogram. Retansiyon zamanı 3.6 dakika.....	125
Grafik 20. Migren hasta grubunda vitamin B12 eksikliği ile ilişkili değişkenlerin (vitamin B12, Holo-TC, MMA, homosistein) ROC eğrileri.....	127
Grafik 21. Aurasız migren hasta grubunda vitamin B12 eksikliği ile ilişkili değişkenlerin (vitamin B12, Holo-TC, MMA, homosistein) ROC eğrileri.....	128
Grafik 22 Auralı migren hasta grubunda vitamin B12 eksikliği ile ilişkili değişkenlerin (vitamin B12, Holo-TC, MMA, homosistein) ROC eğrileri.....	130
Grafik 23. Gerilim tipi baş ağrısı hasta grubunda vitamin B12 eksikliği ile ilişkili değişkenlerin (vitamin B12, Holo-TC, MMA, homosistein) ROC eğrileri.....	131

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. IHS (2004) başağrısı sınıflandırması (ICHD-2).....	7
Tablo 2. Migrende görülen başlıca prodromal belirtiler.....	9
Tablo 3. ICHD-2'ye göre migren altgrupları	12
Tablo 4. Aurasız migren tanı kriterleri.....	13
Tablo 5. Auralı migren tanı kriterleri.....	14
Tablo 6. Gerilim tipi başağrısı tanı kriterleri	21
Tablo 7. İnsanda folik asitin 5 majör fonksiyonu	49
Tablo 8. Hiperhomosisteinemi nedenleri.....	58
Tablo 9. Hasta ve kontrol gruplarına ait demografik bilgiler	67
Tablo 10. Zivak Technologies TandemGOLD kütle spektrometri sisteminde MMA ölçümü için LC parametreleri.....	80
Tablo 11. Zivak Technologies TandemGOLD kütle spektrometri sisteminde MMA ölçümü için MS/MS parametreleri.....	82
Tablo 12. Zivak Technologies TandemGOLD kütle spektrometri sisteminde MMA kütle geçişleri.....	82
Tablo 13. Aurasız migren, auralı migren, gerilim tipi başağrısı ve kontrol gruplarında ölçülen parametreler ve değerleri	87
Tablo 14. Migren hasta grubu (aurasız+auralı) ile kontrol grubu arasında değişkenlerin karşılaştırılması.....	89
Tablo 15. Migren hasta grubu (aurasız+auralı) ile gerilim tipi başağrısı hasta grubu arasında değişkenlerin karşılaştırılması.....	90
Tablo 16. Aurasız migren hasta grubu ile kontrol grubu arasında değişkenlerin karşılaştırılması.....	92
Tablo 17. Auralı migren hasta grubu ile kontrol grubu arasında değişkenlerin karşılaştırılması.....	93
Tablo 18. Gerilim tipi başağrısı hasta grubu (aurasız+auralı) ile kontrol grubu arasında değişkenlerin karşılaştırılması	94

Tablo 19. Aurasız ve auralı migren hasta grupları arasında değişkenlerin karşılaştırılması.....	95
Tablo 20. Aurasız migren ve gerilim tipi baş ağrısı hasta grupları arasında değişkenlerin karşılaştırılması.....	96
Tablo 21. Auralı migren ve gerilim tipi baş ağrısı hasta grupları arasında değişkenlerin karşılaştırılması.....	97
Tablo 22. Migren (aurasız+auralı) hasta grubunda ölçülen değişkenler arasındaki korelasyonlar.....	107
Tablo 23. Aurasız migren hasta grubunda ölçülen değişkenler arasındaki korelasyonlar	109
Tablo 24. Auralı migren hasta grubunda ölçülen değişkenler arasındaki korelasyonlar	111
Tablo 25. Gerilim tipi baş ağrısı hasta grubunda ölçülen değişkenler arasındaki korelasyonlar.....	112
Tablo 26. Kontrol grubunda ölçülen değişkenler arasındaki korelasyonlar	113
Tablo 27. Hasta ve kontrol grupları birleştirildiğinde ölçülen değişkenler arasındaki korelasyonlar.....	115
Tablo 28. Serum vitamin B12 ve folik asite ait %VK değerleri	116
Tablo 29. Holo-TC için düşük ve yüksek kontrol örneklerine ait çalışma içi ve gün içi tekrarlanabilirlik değerleri.....	118
Tablo 30. Homosisteinin günler arası %VK değerleri.....	119
Tablo 31. MMA ölçümü için Tandem MS sisteminin kalibrasyonunda kullanılan kalibratörler ve konsantrasyonları.....	119
Tablo 32. MMA için çalışma içi %VK değerleri	121
Tablo 33. MMA için çalışmalar arası %VK değerleri.....	122
Tablo 34. MMA için %geri kazanım (%R) değerleri	123
Tablo 35. Migren (aurasız+auralı) hasta grubunda vitamin B12 eksikliğiyle ilişkili parametrelerin ROC analizinde eğri altında kalan alan (AUC)değerleri.....	126

Tablo 36. Aurasız migren hasta grubunda vitamin B12 eksikliğiyle ilişkili parametrelerin ROC analizinde eğri altında kalan alan (AUC) değerleri.....	128
Tablo 37. Auralı migren hasta grubunda vitamin B12 eksikliğiyle ilişkili parametrelerin ROC analizinde eğri altında kalan alan (AUC) değerleri.....	129
Tablo 38. Gerilim tipi baş ağrısı hasta grubunda vitamin B12 eksikliğiyle ilişkili parametrelerin ROC analizinde eğri altında kalan alan (AUC) değerleri.....	131

KISALTMALAR

5-HIAA: 5-Hidroksi indol asetikasit

5-HTP: 5-Hidroksi triptofan

5-MTHF: 5-metil tetrahidro folat

5,10-MTHF: 5,10-metilen tetrahidro folat

AADC: Aromatik L-amino asit dekarboksilaz

ADP: Adenozin difosfat

ALT: Alanin aminotransferaz

AST: Aspartat aminotransferaz

ATP: Adenozin trifosfat

cAMP: Siklik adenozin monofosfat

BHMT: Betain: homosistein metil transferaz

CGRP: Kalsitonin gen ilişkili peptid

DEFA: Düzeltilmiş eritrosit içi folat

DHF: Dihidrofolat

DNA: Deoksiribonükleik asit

EFA: Eritrosit içi folik asit

ESI LC-MS/MS: Elektrosprey iyonizasyon sıvı kromatografi ardışık kütle spektrometri

FA: Folik asit

FAD: Flavin adenin dinükleotid

Hcy: Homosistein

HEFA: Hesaplanmış eritrosit içi folat

HHcy: Hiperhomosisteinemi

Holo-TC: Holo- transkobalamin

HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografi

ICHD: Uluslar arası Başağrısı Hastalıkları Sınıflandırması

IF: İntrinsik faktör

IHS: Uluslar Arası Başağrısı Cemiyeti

iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

LoD: Minimum saptama sınırı

LoQ: Ölçüm sınırı

MMA: Metilmalonik asit

MCM: Metilmalonil KoA mutaz

MS: Metiyonin sentaz

MTHFR: Metilentetrahidrofolat redüktaz

NO: Nitrik oksit

PL: Piridoksal

PLP: Piridoksal fosfat

PN: Piridoksin

PNP: Piridoksin fosfat

PM: Piridoksamin

PMP: Piridoksamin fosfat

%R: Yüzde geri kazanılabilirlik

ROS: Reaktif oksijen türleri

SAH: S-adenozil homosistein

SAM: S-adenozil metiyonin

TC: Transkobalamin

THF: Tetrahidrofolat

%VK: % Varyasyon katsayısı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Migren ve gerilim tipi baş ağrısı, etiyolojileri tam olarak bilinmeyen, birincil baş ağrısı sendromları arasında yer alır. Her iki hastalık grubu da önemli bir sağlık ve sosyoekonomik sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Benzer tetikleyici faktörlere ve patofizyolojik mekanizmalara sahip olmalarına rağmen, migrende görülen öncü belirtiler ya da nörolojik aura semptomları gerilim tipi baş ağrısında görülmez. Ağrı özellikleri de birbirinden farklıdır. Bununla birlikte literatürde bu iki sendromun, tetikleyici ve patofizyolojik mekanizmalar açısından birlikte değerlendirildiği az sayıda çalışma vardır.

Her iki hastalık grubunda da ağrıyı kesmek veya ağrı sıklığını ve yoğunluğunu azaltmak için çeşitli ilaçlar kullanılmaktadır (triptanlar, non-steroid antienflamatuvarlar, ergotamin, betablokerler v.b.). Bunların yanında ilaçtan çok mikrobesein olarak düşünülen bazı minerallerin, koenzimlerin ve vitaminlerin de, özellikle migrende, koruyucu tedavide etkin olduğu veya potansiyel yaklaşım olarak değerlendirilebileceğini gösteren çalışmalar vardır.

Vitamin B6, vitamin B12 ve folik asit (FA) organizmada son derece önemli fonksiyonlara sahiptir ve eksikliklerinde çeşitli patolojik durumlar ortaya çıkar. Beyin dokusu özellikle tek karbon metabolizmasında yer alan bu mikrobeseinlerin eksikliklerine son derece duyarlıdır. Miyelin ve nörotransmitterler gibi nöroaktif maddelerin transmetilasyonu, bu vitaminlerin eksikliğinde bozulur.

Vitamin B6 organizmada 100-150 metabolik reaksiyonda (dekarboksilasyon, transaminasyon, rasemizasyon reaksiyonları) koenzim olarak görev yapmaktadır. Ayrıca gen ekspresyonu ve antioksidan savunma mekanizmalarında da görevli olduğu bilinmektedir. Tek karbon metabolizmasının transsülfürasyon reaksiyonlarında sistatyonin sentaz ve sistatyonaz enzimlerinin fonksiyon görmeleri için gerekli kofaktördür. Bu enzimler metiyoninin sisteine dönüştürülmesi reaksiyonlarında görev alırlar. Dolayısıyla vitamin B6 eksikliğinde homosisteinin (Hcy) arttığı düşünülür.

Vitamin B12 tek karbon metabolizmasında yer alan ve Hcy'i metiyonine dönüştüren metiyonin sentaz enziminin kofaktörüdür. Aynı zamanda amino asitlerin ve yağ asitlerinin metabolizması sonucu oluşan metilmalonil KoA'yı süksinil KoA'ya dönüştüren metilmalonil KoA mutaz (MCM) enziminin esansiyel koenzimidir. Vitamin B12 eksikliği durumunda her iki yolaktaki enzimler çalışmaz ve homosistein ile metilmalonik asit (MMA) birikimi meydana gelir.

FA organizmada nükleotid biyosentezinden Hcy remetilasyonuna kadar bir çok reaksiyon için esansiyeldir ve tek karbon ünitelerinin transferinde temel koenzimdir. FA eksikliğinde tek karbon metabolizmasındaki metilasyon mekanizması bozulur ve Hcy birikir. Ayrıca deoksiribonükleik asit (DNA) sentezi ve onarılması da bozulur.

Yapılan çalışmalarda migren hastalarında Hcy düzeylerinin artışıyla ilgili çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Yüksek Hcy düzeylerinin neden olduğu endotel disfonksiyonu, migren gelişmesi ve ilerlemesinde etkin rol oynayabilir. Hcy'nin endotel üzerine direkt hasarlandırıcı etkisi ve

oksidatif durumu deęiřtirmesiyle endotel hasarına neden olduęu dūřūnūlmektedir.

MMA'in nōrotoksik etkiye sahip olduęu çeřitli çalıřmalarla gōsterilmiřtir. MMA'nın sūksinat dehidrogenaz, betahidroksibūtirat dehidrogenaz ve dięer elektron transport zincir elemanları inhibe ettięi, azalmıř karbondioksit ūretimi ve oksijen tūketimi, artmıř laktat ve azalmıř Adenozin trifosfat/Adenozin difosfat (ATP/ADP) oranı ile iliřkili olduęu in vitro çalıřmalarla gōsterilmiřtir. Migrende de mitokondriyal fosforilasyon potansiyelinin azaldıęı tespit edilmiřtir.

Hem vitamin B12 hem de FA, eksikliklerinin deęerlendirilmesi açısından, otomatize immūnokimyasal yōntemlerle rutin olarak ōlūlmektedirler. Ancak bu yōntemler yeterli duyarlılık ve ōzgūllūkten yoksundurlar. Serum FA ōlūmū yerine, diyetteki dalgalanmalardan daha az etkilenmesi ve serumdan yaklařık 40-100 katı daha yūkksek konsantrasyona sahip olması nedeniyle, eritrosit folat (EFA) ōlūmū ōnerilmesine raęmen ōlūmū zahmetli ve preanalitik varyasyonu yūkksektir. Vitamin B6 ise plazmada çok dūřūkk konsantrasyonlarda bulunan vitamerlerden oluřmaktadır. Bu nedenle yūkksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi zahmetli ve ōzel teknik gerektiren yōntemlerle ōlūlebilmektedir. Dolayısıyla bu vitaminlerin eksikliklerinin deęerlendirilmesinde daha duyarlı ve ōzgūl analitlerin varlıęına ihtiyaç duyulmaktadır.

Plazma Hcy ōlūmū bu vitaminlerin eksikliklerinin deęerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak Hcy yūkkseklięi her ū vitamin dūzeyiyle de iliřkili olabileceęinden ōzgūllūęu zayıftır.

Vitamin B12 eksikliđinin deęerlendirilmesinde nispeten daha yeni bir analit olan holotranskobalamin (Holo-TC) umut vaad eden test olarak dūřunūlmektedir. MMA ise vitamin B12 eksikliđinin deęerlendirilmesinde, Hcy'e gōre daha spesifik ve preanalitik deęiřkenlerden daha az etkilenmesi nedeniyle ūstūn olduęu dūřunūlmektedir.

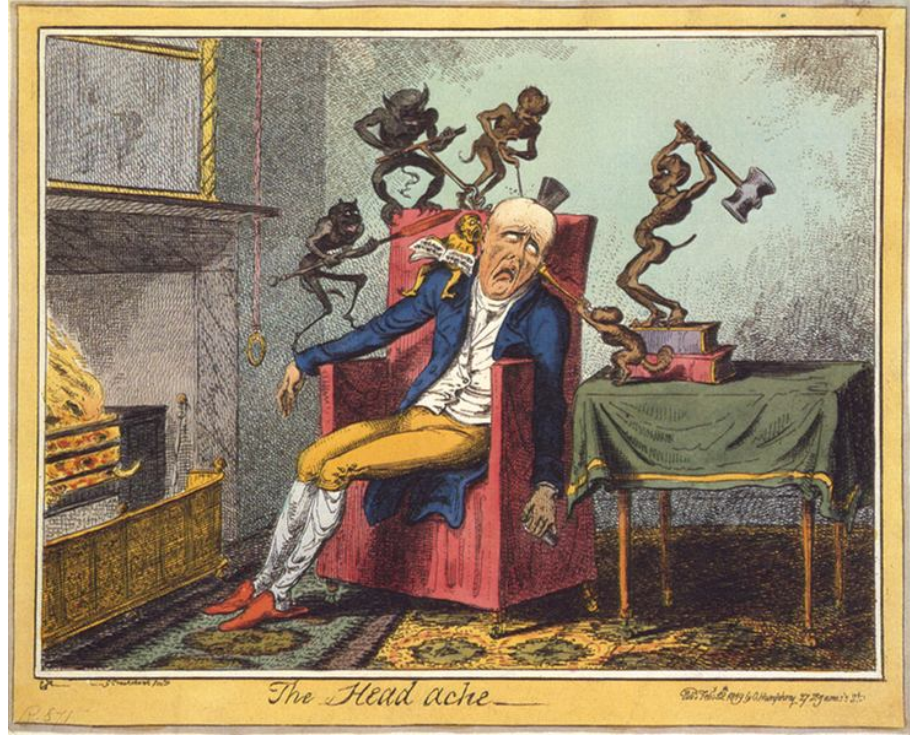
Biz de çalışmamızda migren (aurasız ve auralı migren) ve gerilim tipi başağrısı hasta gruplarında:

- Plazma vitamin B6, serum vitamin B12, Holo-TC, serum ve eritrosit içi FA, Hcy ve MMA dūzeylerini ōlerek bu vitaminlerin ve doku dūzeylerinin eksikliklerini deęerlendirmeyi;
- Fonksiyonel vitamin eksikliğinin gōstergesi olarak kabul edilen Hcy (vitamin B6, B12 ve folik asit eksikliği) ve MMA'in (vitamin B12 eksikliği) her iki hastalık grubunun patogeneziyle ilişkilerinin olup olmadığını;
- Fonksiyonel vitamin B12 eksikliğinin gōstergesi olarak hangi parametrenin (serum vitamin B12, Holo-TC, Hcy, MMA) bu hastalık grupları için daha etkin kullanılabileceğini;
- Serum MMA ōlūmūnde kullanılan elektrosprey iyonizasyon sıvı kromatografi ardıřık kūtle spektrometri (ESI LC-MS/MS) yōnteminin performans ōzelliklerini deęerlendirmeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Başağrısı Sendromları

Baş ağrısı veya sefalji, toplumda çok sık görülen, dolayısıyla toplumun çok geniş bir kısmını etkileyen, bazen iş gücü kaybına neden olan, bazen de hayatı tehdit edebilecek hastalıkların belirtisi olması nedeniyle, üzerinde önemle durulması gereken bir konudur. Baş ağrısı bazen altta yatan bir lezyonun veya bir hastalığın belirtisi olarak görülürken bazen de ağrı için tanımlayıcı bir sebep gösterilemez.¹



Resim.1. İngiliz karikatürist ve ressam George Cruikshank (1792-1878) tarafından 1819 yılında çizilen bir “Baş ağrısı” karikatürü.

2.1.1 Başağrısı Epidemiyolojisi ve Sınıflandırılması

Başağrısı, tekrarlayan en yaygın ağrı tipi olduğu kadar aynı zamanda nörolojide en sık karşılaşılan semptomudur. Hemen hemen her birey ara sıra başağrısı yaşamasına rağmen, insidansı, prevalansı ve süresi değişkenlik gösteren, başağrısı hastalıkları tanımlanmıştır.² Başağrısı sendromları genellikle iki geniş kategoride sınıflandırılır: birincil (primer) başağrıları ve ikincil (sekonder) başağrıları. İkincil başağrı tipinde ağrı, beyin tümörü veya kafa travması gibi diğer durumlara bağlıdır; birincil başağrılarında ise ağrı bu durumlara bağlı değildir.

Benign başağrılarının %90'dan fazlası migren, gerilim tipi ve küme başağrısı gruplarına girer. Populasyona dayalı çalışmalarda gerilim tipi başağrısının bir yıllık sıklığı %38 olarak bulunmuştur.³ Brezilya'da yapılan bir çalışmada migren, tek semptom olarak, başağrısı ile gelen hastaların %45'inde birincil başağrısı hastalığı olarak dikkat çekmektedir.⁴ İngiltere'de yapılan bir diğer çalışmada ise başağrısı ile gelen hastaların %85'inin migren tanısı aldıkları vurgulanmıştır.⁵ Küme başağrısı önemli derecede yetersizliğe yol açar ve hastaların çoğu tıbbi desteğe ihtiyaç duyarlar. Bununla birlikte küme başağrısı prevalansının popülasyonda çok düşük olması (<%1), nadiren tanı konulmasına neden olur.

Başağrısı terminolojisi ve sınıflandırmasıyla ilgili literatürde çeşitli tartışmalar vardır. Başağrısı oluşturabilen hastalıklar göz önüne

alındığında, başağrısı sınıflandırması ve tanısı için sistematik bir yaklaşımın gerekliliği ortaya çıkar.

Uluslararası Başağrısı Cemiyeti (International Headache Society, IHS), 1988 yılında sınıflandırma ve tanı kriterlerini geliştirmiş ve yayınlamış (Uluslararası Başağrısı Hastalıkları Sınıflandırması; ICHD-1) ⁶, bu kriterler 2004 yılında revize edilmiştir (ICHD-2)⁷. IHS sınıflandırması aynı zamanda doğru tanı için hangi klinik özelliklerin olması ve kombinasyonunun ne olması gerektiği konusunu da detaylandırmıştır. Sınıflandırmanın klinikte günlük kullanımı pratik değildir. Bununla birlikte kriterler epidemiyolojik çalışmalar ve bilimsel araştırmalar için uygundur. ⁸ICHD-2'ye göre birincil ve ikincil başağrıları sınıflandırması Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. IHS (2004) Başağrısı Sınıflandırması (ICHD-2).⁷

<i>Birincil başağrıları</i>	<i>İkincil başağrıları</i>
1. Migren 1.1. Aurasız migren 1.2. Auralı migren 1.3. Migren öncülü olan çocukluk çağı periyodik sendromlar 1.4. Retinal migren 1.5. Migren komplikasyonları 1.6. Olası migren	5. Baş ve/veya boyun travmasına bağlı başağrısı
	6. Kranial veya servikal vasküler hastalıklara bağlı başağrısı
	7. Non vasküler intrakraniyal hastalıklara bağlı başağrısı
	8. Maddeye veya onun kesilmesine bağlı başağrısı
	9. Enfeksiyonlara bağlı başağrısı
	10. Hemostaz hastalıklarına bağlı başağrısı
2. Gerilim tipi başağrısı 2.1. Sık olmayan epizodik gerilim tipi başağrısı 2.2. Sık epizodik gerilim tipi başağrısı 2.3. Kronik gerilim tipi başağrısı 2.4. Olası gerilim tipi başağrısı	11. Baş, boyun, göz, kulak, burun, sinüsler, diş, ağız ve diğer fasiyal veya kranial yapılara bağlı baş veya fasiyal ağrı
3. Küme başağrısı ve diğer trigeminal otonomik sefaljiler 3.1. Küme başağrısı 3.2. Proksimal hemikrania 3.3. Konjunktival ejeksiyon ve yırtılmalı kısa süreli unilateral nöraljiform başağrısı atakları 3.4. Olası trigeminal otonomik sefalji	12. Psikiyatrik hastalıklara bağlı başağrısı
	13. Kranial nöraljiler ve fasiyal ağrıların santral nedenleri
4. Diğer birincil başağrıları 4.1. Birincil splanma başağrısı 4.2. Birincil öksürük başağrısı 4.3. Birincil egzersize bağlı başağrısı 4.4. Seksüel aktiviteyle ilişkili başağrısı 4.5. Hipnik başağrı 4.6. Birincil thunderclap başağrısı 4.7. Hemicrania continua 4.8. Yeni günlük-geçici başağrısı	14. Diğer başağrıları, nöraljiler veya diğer santral ilişkili fasiyal ağrılar.

2.2. Birincil Başağrısı Sendromları

Birincil başağrısı sendromları migren, gerilim tipi başağrısı, küme başağrısı ve diğer birincil başağrıları kapsamaktadır.

2.2.1. Migren başağrıları

Migren, çeşitli nörolojik, gastrointestinal ve otonomik değişikliklerle karakterize birincil, epizodik, kronik bir hastalıktır. Günlük pratikte nörologların karşılaştığı en sık şikayetlerden birisidir. Tıbbi ve popüler literatürde migren için başağrısı tetikleyicileri, bileşenleri (başağrısı, aura, prodrom, bulantı, kusma v.b), iyileşmesi ve ailevi eğilim gibi özellikler tanımlanmıştır.⁹

2.2.1.1. Migren tanısı ve klinik özellikleri

Migren tanısı başağrısı özelliklerinin ve ilişkili diğer belirtilerin hasta veya yakınları tarafından retrospektif olarak bildirilmesine dayanmaktadır. Hastaların fizik ve nörolojik muayeneleri ile laboratuvar

bulguları normaldir ve daha çok ikincil başağrı nedenlerini dışlamak için kullanılır.

Migren başağrı ataklarında başlıca dört dönem vardır: prodrom fazı, aura fazı, başağrısı fazı ve iyileşme fazı.¹⁰

Prodrom fazı: Başağrısından saatler veya günler öncesinde ortaya çıkar. Hastaların %20-60'ında görülür. Migrende görülen başlıca prodrom faz belirtileri Tablo 2.de verilmektedir.

Tablo 2. Migrende görülen başlıca prodromal belirtiler.⁷

Ruhsal belirtiler	Nörolojik belirtiler	Genel Sistemik belirtiler
Huzursuzluk Uykuya meyil Depresyon Hiperaktivite Öfori Aşırı konuşma Yerinde duramama	Fotofobi Fonofobi Konsantrasyon eksikliği Esneme Aşırı uyku Disfazi	Ensede gerginlik hissi Aşırı yeme isteği Üşüme İştahsızlık Beceriksizlik Diyare veya konstipasyon Susama Sık idrara çıkma Sıvı retansiyonu

Aura fazı: Migren atağının öncesinde, sırasında ve nadiren de sonrasında görülen fokal nörolojik belirtilerdir. Belirtiler genellikle 5-20 dakikada gelişir,

ortalama 20 dakikada sonlanır ve nadiren 60 dakikayı aşar. Aura görsel, duysal veya motor fenomenler şeklinde olabilir bazen dil ve beyin sapı işlevini etkileyebilir.⁷ En yaygın formu görsel auradır.¹¹ Aura genellikle görme alanı içinde yer alan hilal şeklinde, parlak, düzensiz kenarlı, ışıldayan özelliklere sahiptir. Görsel auralar arasında skotomlar, basit ışık çakmaları veya geometrik şekiller sayılabilir. Bunlar görme alanı boyunca hareket edip orta hattı aşabilir.

En sık görülen ikinci aura şekli duysal semptomlardır. Auralı hastaların yaklaşık üçte birinde görülür.¹² Semptomlar genellikle parestezi şeklindedir. Parestezi sırasında uyuşukluk ellerde başlar, kola doğru yayılır. Ardından yüze atlayarak dudakları ve dili etkiler. Bacaklar nadiren etkilenir.¹³ Duysal auralar genellikle görsel bir aurayı takiben ortaya çıkar. Hastaların %18'inde motor belirtiler vardır ve sıklıkla duysal belirtilerle birliktedir, çoğu zaman tek taraflıdır. %17-20 hastada afazik aura (konuşma bozuklukları) bildirilmiştir.^{11,13}

Başağrısı fazı: Migren başağrısı genellikle tek taraflıdır (%40 hastada çift taraflı). Tek taraflı başladıktan sonra yaygın hale de gelebilir. Başağrısı gece veya gündüz başlayabilir, ancak en sık olarak sabaha karşı ile öğlen arasında görülür. Yavaş yavaş başlayıp 2-12 saat içerisinde maksimum şiddete ulaşarak atak haline dönüşür. Tedavi edilmezse yavaş yavaş azalarak geçer. Atak süresi ortalama 24 saattir (yetişkinlerde 4-72 saat, çocuklarda 1-48 saat arasında değişebilir). Hastaların %85'i ağrıyı zonklayıcı olarak tanımlamakta, basit fiziksel aktivite ve baş hareketleriyle arttığını ifade etmektedir. %90 hastada bulantı olmasına rağmen bunların

ancak üçte birinde kusma görülmektedir. Hastaların çoğunda atak sırasında fotofobi veya fonofobi ve bunların beraberinde karanlık ve sessiz ortamda yatma isteği rapor edilmiştir.¹³

İyileşme fazı: Ağrı giderek azalır ve kaybolur. Hastada konsantrasyon güçlüğüyle birlikte yorgunluk, isteksizlik, huzursuzluk ve kaygı vardır. Kafa derisinde hassasiyet ve duygu durum değişiklikleri görülebilir. Bazı hastalarda atak sonrası coşku veya öfori gelişebilir. Bazılarında ise depresif durum ve bitkinlik hissi ortaya çıkabilir.¹³

2.2.1.2. Migren sınıflandırması

ICHD-2 sınıflandırmasına ⁷ göre migren altı majör gruba (Tablo 3.) ayrılmaktadır. En önemli iki grubu aurasız ve auralı migren oluşturmaktadır.

Tablo 3. ICHD-2'ye göre migren alt grupları. ⁷

ICHD-2 Migren Sınıflandırması	
Sınıf	Tanımı
1.1.	Aurasız migren
1.2.	Auralı migren
1.2.1.	Tipik auralı migren baş ağrısı
1.2.2.	Tipik auralı non-migren baş ağrısı
1.2.3.	Baş ağrısız tipik aura
1.2.4.	Ailesel hemiplejik migren
1.2.5.	Sporadik hemiplejik migren
1.2.6.	Baziler-tip migren
1.3.	Çoğunlukla migren öncülü olan çocukluk çağı periyodik sendromları
1.3.1.	Siklik kusmalar
1.3.2.	Abdominal migren
1.3.3.	Çocukluk çağı benign paroksizmal vertigosu
1.4.	Retinal migren
1.5.	Migren komplikasyonları
1.5.1.	Kronik migren
1.5.2.	Status migrenosus
1.5.3.	Enfarktüs olmaksızın geçici aura
1.5.4.	Migrenöz enfarktüs
1.6.	Olası migren
1.6.1.	Aurasız olası migren
1.6.2.	Auralı olası migren

2.2.1.2.1. Aurasız migren

ICHD-2'ye göre aurasız migren tanısını koyabilmek için her biri 4-72 saat süren ve dört ağrı özelliğinden (tek taraflı, zonklayıcı nitelikte, orta-ağır şiddette ve fiziksel aktiviteyle artan bir ağrı) en az birini gösteren beş atak gerekmektedir. Atak sırasında bulantı ve/veya kusma, fonofobi ve fotofobiden en az biri bulunmalı ve tekrarlayan epizodik atakların olması gerekir. Fotofobi, fonofobi ve rutin fiziksel aktivite ile artan zonklayıcı nitelikteki ağrı, aynı şekilde bulantıyla birlikte tipik tek taraflı ağrı, aurasız migren için tanı kriterlerini karşılamasına rağmen bu

bulgulara neden olan diğer hastalıklar tanı konulmadan önce dışlanmalıdır. Beyin tümörlerinden sinüzite, glokoma kadar pek çok organik hastalığın migreni taklit eden başağrılarına neden olabileceği unutulmamalıdır.⁶

Tablo 4. Aurasız migren tanı kriterleri.⁷

ICHD-2'ye Göre Aurasız Migren İçin Tanı Kriterleri
A. B-D kriterlerini karşılayan en az beş atak
B. 4-72 saat süren ve <15 gün/ay görülen başağrısı atakları
C. Aşağıdaki özelliklerden en az ikisini taşıyan başağrısı: 1. Tek taraflı lokasyon 2. Zonklayıcı nitelikte 3. Orta-ağır şiddette 4. Fiziksel aktiviteyle başlayan veya artan
D. Başağrısı sırasında aşağıdakilerden en az biri olmalı: 1. Bulantı ve/veya kusma 2. Fotofobi ve fonofobi
E. Başka bir hastalığa bağlı olmaması

2.2.1.2.2. Auralı Migren

ICHD-2' ye göre auralı migren tanısı için gerekli olan kriterler tablo 5'te verilmiştir. Auralı migrende görülen başağrısı ve ilişkili semptomlar aurasız migrendekine çok benzer. Auralı migreni olan hastaların bir çoğunda aurasız ataklar görülebilir.

Tablo 5. Auralı migren tanı kriterleri.⁷

ICHD-2'ye Göre Auralı Migren Tanısı İçin Gerekli Kriterler

- A. B kriterlerini karşılayan en az iki atak
- B. Motor zayıflık olmadan, tamamen düzelebilen görsel ve/veya duysal ve/veya konuşma semptomları
- C. Aşağıdaki kriterlerden en az ikisi:
 - 1. Eş zamanlı pozitif (ör. titreşen ışıklar, ışık çakmaları ve çizgiler) ve/veya negatif (ör. görme kaybı) özellikli görsel semptomlar ve/veya pozitif (ör. karıncalanma ve uyuşma) ve/veya negatif (ör. hissizlik) özellikli duysal semptomlar.
 - 2. 5 dakikadan daha fazla süren kademeli olarak gelişen en az bir semptom ve/veya ardışık görülen farklı semptomlar.
 - 3. Her semptom ≥ 5 dakika ve ≤ 60 dakika devam etmeli
- D. Aura sırasında veya auradan sonra 60 dakika içerisinde başlayan Aurasız migren için tanı kriterleri B-D'yi karşılayan baş ağrısı.
- E. Başka bir hastalığa bağlı olmaması

ICHD-2 sınıflamasına göre auralı migren altı alt gruba ayrılmaktadır (bkz. Tablo 3).

2.2.1.3. Migren patofizyolojisi

Migren, birçok farklı fenotip gösteren karmaşık bir bozukluktur. Nedeni ve patofizyolojisi çok iyi anlaşılmış değildir. Bugünkü bilgiler, migrenden sorumlu olan primer nöronal disfonksiyonun, migrenin dört fazı olan prodrom, aura, baş ağrısı ve iyileşmenin de dahil olduğu, intrakraniyal ve ekstrakraniyal bir dizi değişikliğe neden olmaktadır.¹⁴ Genetik özellikler ve tetikleyici etkenlerle karşılaşma oranları hastadan hastaya önemli oranda değişiklik gösterir. Migren nörobiyolojisi

karmaşıktır, ancak migrene özgü genetik mutasyonların tanımlanması ile önemli ilerlemeler sağlanmıştır. ¹⁴

Migren baş ağrısı genetik yatkınlığı olan kişilerde endojen ve/veya eksojen faktörlerle tetiklenen nörovasküler olaylar sonucunda ortaya çıkar. Bu olaylar zinciri sırasında trigeminal vasküler sistem aktivasyonu migren baş ağrısının esasını teşkil eder. Migren patofizyolojisinde vasküler ve nörovasküler olmak üzere iki teori ileri sürülmüştür. ¹⁴

2.2.1.3.1.Vasküler teori

Kranial damarlardaki vazospazm ve vazodilatasyonu takiben migren ataklarının ortaya çıktığını ileri süren teoridir. ¹⁵ 1940-50'li yıllarda vasküler teori migren baş ağrılarının patofizyolojisini açıklamak adına ortaya atılmıştır. İntrakranial vazokonstriksiyon ile indüklenen iskeminin auradan sorumlu olduğuna ve vazokonstriksiyona reaksiyon olarak oluşan vazodilatasyon ve ardından gelişen perivasküler noziseptif sinirlerin aktivasyonunun baş ağrısına neden olduğu düşünülmektedir. ¹⁵

Bununla birlikte bu teori migrenin prodrom fazı ve ilişkili özelliklerini, migren tedavisinde kullanılan ve kan damarları üzerine herhangi bir etkisi olmayan ilaçların etkinliğini ve pek çok hastada aura gelişmemesinin nedenlerini açıklayamamaktadır.¹⁵

2.2.1.3.2. Nörovasküler teori

Migren baş ağrısında nöronal aktivasyona ikincil olarak vasküler değişiklikler meydana gelmektedir. Nöronal olaylar sonucunda ağrıya duyarlı kan damarları dilate olmakta, bu da daha fazla trigeminal sinir aktivasyonu ve ağrıya neden olmaktadır.¹⁵

Elde edilen bilgiler ışığında vasküler teoriden çok nörovasküler teori önem kazanmıştır.^{16,17} Migren ve diğer birincil baş ağrılarının patogeneğinde, baş ağrısı duyusunu taşıyan trigeminal sinir ve vasküler innervasyonu son derece önemlidir.

Trigeminal sinir, trigeminovasküler sistemde serebral ve intrakraniyal damarlar ve meningesleri innerve eder. Trigeminal sinirin üç dalı oftalmik dal, maksiler dal ve mandibular dalı oluşturmaktadır. Oftalmik dal pia-araknoid ve dura materdeki damarları, intrakranial damarların proksimalini yoğun bir biçimde innerve eder. Trigeminal aksonlar ve nosiseptörler perivasküler yerleşimlidir. Bu nedenle meninksler ve büyük

damarlar ağrıya duyarlı iken beyin parenkiminde ağrı duyusu yoktur. Çünkü bu bölge trigeminal inervasyondan yoksundur. Trigeminal sinir liflerinin bir kısmı hem orta serebral arter (pia-araknoid) hem de orta meningeal arteri (dural damarlar) inerve eder.¹⁸ Trigeminal sinirin periferik aksonları aktive olduğu zaman ağrı duyusu trigeminal nukleus caudalise (TNC) iletilir. Aktivasyon aynı zamanda aksonların antidromik olarak içerdiği nöropeptidlerin (kalsitonin gen ilişkili peptid, substance P, nörokinin A) ve nitrik oksitin (NO) salınımına neden olur. Bunların perivasküler alana salınması ile vazodilatasyon, kan akım artışı ve nörojenik inflamasyon meydana gelir. Oluşan vazodilatasyon ve ödem perivasküler trigeminal aksonların daha fazla uyarılmasına ve daha fazla ağrıya neden olur.¹⁹

Substans P, nörokinin A ve kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP) periferik sinir sisteminde bulunan primer afferent nöronlardan salınırlar.²⁰ Migren atakları sırasında jugular ven plazma örneklerinde CGRP düzeylerinde artış rapor edilmiştir; bu artış trigeminal afferentlerden CGRP salınımındaki artışı göstermektedir. Aslında migren hastalarında CGRP salınım bölgesi çok açık olmasa da periferik trigeminal bölge dışında bir salınım yeri düşünülmemektedir.²¹ Yapılan çalışmalarda substans P'nin esas fonksiyonunun plazma ekstrasvazasyonu, CGRP'in ise arteriel vazodilatasyon ve kan akışının artırılması olduğu gösterilmiştir. CGRP intrakraniyal arterlerde en güçlü vazodilatördür. CGRP'nin vazodilatör mekanizması artmış intraselüler siklik adenosin monofosfat (cAMP) ile ilişkilidir. cAMP, CGRP'nin klasik kompetitif reseptör antagonistidir.²¹

Migren başağrısı endojen (ör: aura, stres, uykusuzluk v.b.) ve eksojen (ör: yiyecekler, nitrogliserin v.b.) pek çok faktör ile tetiklenebilir. NO'nın migren ağrılarına neden olduğu değişik çalışmalarda gösterilmiştir.^{22,23} NO donörü olan nitrogliserinin de migren ağrılarını tetiklediği uzun yıllardan beri bilinmektedir. Aslında nitrogliserin herkeste kısa dönem akut başağrılarına neden olmaktadır. Migren hastalarında ise nitrogliserin 4-6 saat sonra tipik migren atağını başlatmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu molekülün deney hayvanlarında, geç dönemde, nitrik oksit sentazı (iNOS) ve inflamatuvar sitokinleri (IL-1 β ve IL-6) indüklediği gösterilmiştir. Bu aktivasyon beyin veya başka bir organda değil, sadece trigeminal sinirden yoğun inervasyon alan dura materde bulunan perivasküler makrofajlarda ortaya çıkmaktadır.²⁴

1970'li yıllardan beri migren patogeneğinde serotoninin rol oynadığı düşünülmektedir.²⁵ Kanıt olarak 1965 ve 1967 yıllarında yapılan iki çalışma gösterilmektedir.^{26,27} Bu çalışmalarda migren atağının başlangıcında trombositlerdeki 5-HT düzeylerinin hızla düştüğü ve idrarda serotoninin başlıca metaboliti olan 5-hidroksi-indol asetik asit (5-HIAA)'ın atılımının arttığı gösterilmiştir. Bunların yanında serotonin reseptörleri, alt tipleri ve dağılımlarının keşfi de serotoninle ilişkili patofizyolojinin aydınlatılmasında yardımcı olmuştur. Vazokonstriktör özellikleri nedeniyle kullanılan ergot alkaloidlerin serotonin reseptörlerinden 5-HT- 1BD reseptörlerinin agonisti olduğunun anlaşılmasından sonra triptanlar etkin migren ilacı olarak kullanılmaya başlanmıştır.^{28,29,30} Bu reseptörler trigeminal sinir uçlarında yoğun miktarda bulunmaktadır. Dolayısıyla kullanılan agonistler trigeminal aktivasyonu ve dolaylı olarak nöropeptid salınımını ve inflamasyonu inhibe etmektedir.³⁰

2.2.1.4.Migren epidemiyolojisi

Gelişmiş ülkelerde yapılan baş ağrısı prevalans çalışmalarında, migren baş ağrılarının erişkin kadınlarda %12-24, erkeklerde ise %5-12 oranlarında görüldüğünü göstermektedir.^{31,32,33} Ülkemizde yapılan baş ağrısı prevalans çalışmasında ise 15-55 yaş grubunda migren prevalansı %16.4 olarak bulunmuş olup, oran kadınlar için %22, erkekler için ise %11 olarak belirlenmiştir.³⁴ Migrenle karşılaşma sıklığı çocukluk döneminde anlamlı bir cinsiyet farkı göstermezken, puberteden sonra kadınlarda artmakta ve erişkin nüfusta, kadın-erkek oranı 2/1'e ulaşmaktadır. Toplumumuzda migrenin en çok görüldüğü yaş grubu 30-39 yaş olarak bulunmuştur. Bu dönemde migrenin cinsiyet dağılımı, genel oranların çok üstüne çıkarak, kadınlarda erkeklerin 3-4 katına ulaşması dikkat çekicidir.³⁵

Auralı ve aurasız migren formlarını epidemiyolojik çalışmalarda belirlemek çok kolay değildir. Bununla birlikte güvenilir yayınlar migrenlilerin %25-30'unun auralı migrene sahip olduğunu söylemektedir.³⁵

Migrenin genetik geçişli bir primer baş ağrısı olduğu bilinmektedir. Nitekim aile bireylerinden birinde migren olması, o ailenin diğer fertlerinin migrenle karşılaşma olasılığını, ailesinde migren olmayanlara göre 2-4 kat artırmaktadır.³⁵

2.2.2 Gerilim Tipi Başağrsı

IHS, “Gerilim Tipi Başağrsı” terimini 1988 yılında kabul etmiştir.⁶ En sık karşılaşılan primer başağrsı sendromu olmasına rağmen hastaların çoğu doktora başvurmazlar. Önemli bir sağılık ve sosyoekonomik sorun olarak karşımıza çıkmaktadır.⁷

2.2.2.1. Gerilim tipi başağrsı tanısı ve klinik özellikleri

IHS gerilim tipi başağrsısını migrenden ayırmıştır. Migrende görülen öncül belirtiler ya da nörolojik aura semptomları gerilim tipi başağrsısında görülmez. Tipik ağırı özellikleri migrenden farklıdır. Tek taraflı değildir, zonklayıcı değildir, migren kadar şiddetli değildir ve rutin fiziksel aktiviteyle artmaz. Genellikle künt, basınçlı veya sıkıştırıcı karakterdedir. İki taraflıdır. Başağrsı kafatasından kafa arkasına, boyuna veya nadir olarak temporomandibular ekleme uzanabilir.⁶

Tablo 6. Gerilim tipi başağrısı tanı kriterleri.⁷

Gerilim Tipi Başağrısı İçin ICHD-2 Tanı Kriterleri
A. Aşağıda belirtilen B-E kriterlerini karşılayan en az 10 başağrısı olayı; başağrısı <1 gün/ay (sık olmayan epizodik), 1-14 gün/ay (sık epizodik), ≥ 15 gün/ay (kronik).
B. 30 dakikadan 7 güne kadar devam eden başağrısı.
C. Aşağıdaki başağrısı özelliklerinden en az ikisi: 1. Basınç veya sıkıştırıcı (zonklayıcı olmayan) kalitede. 2. Hafif veya orta şiddette (günlük aktiviteyi azaltan ancak engellemeyen). 3. İki taraflı lokalizasyon. 4. Merdiven çıkma veya benzer fiziksel aktivitelerle artmayan
D. Aşağıdakilerin tamamı: 1. Bulantı veya kusma yok (iştahsızlık görülebilir) 2. Fotofobi ve fonofobi yoktur, veya biri varsa diğeri yoktur.
E. Herhangi bir metabolik veya yapısal hastalık kanıtı olmayacak.

Gerilim tipi başağrısında hastalar, başağrı şiddetini hafif, orta ve şiddetli olarak ifade etmektedirler. Bununla birlikte ağrı frekansının sıklığında artma ile ağrı şiddeti artabilir.³⁶ 1991 yılında Rasmussen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ³⁷ gerilim tipi başağrılı hastaların %41'i başağrısı nedeniyle günlük aktivitelerini yerine getiremediklerini ifade etmişlerdir. Bu benign başağrıları benzer yapısal veya metabolik diğer başağrıları ile karıştırmamak için, ICHS-2 kriterleri benzer en az 10 başağrısı hikayesinin olmasını istemektedir.

Belirtilen diğer semptomlar arasında yorgunluk, uyku bozukluğu ve sersemlik olabilir. Gerilim tipi baş ağrısında tetikleyici faktörler migrendekinden daha az belirgin veya seyrekir. Tetikleyici faktörler arasında en sık karşılaşılanı uykusuzluktur.³⁸ Duygusal stres ve menstürasyon, gerilim tipi baş ağrısını, migrende olduğu gibi tetikleyebilir veya artırabilir.³⁹

Gerilim tipi baş ağrısı tanısına spesifik fizik muayene veya laboratuvar bulgusu yoktur. Tanı klinik izlem ile konur. Yapısal veya metabolik nedenlerle gelişen baş ağrıları da gerilim tipi baş ağrısına benzer klinik bulgu verebilir.

2.2.2.2. Gerilim tipi baş ağrısı sınıflandırması⁷

ICHHD-2'ye göre gerilim tipi baş ağrısı üç ana alt gruba ayrılmıştır.

1. Sık olmayan epizodik gerilim tipi baş ağrısı, baş ağrısı epizodu <1 gün/ay.
2. Sık epizodik gerilim tipi baş ağrısı, baş ağrısı epizodu 1-14 gün/ay
3. Kronik gerilim tipi baş ağrısı, baş ağrısı epizodu $\geq$ 15 gün/ay

Bu sınıflandırma son derece önemlidir. Altta yatan patofizyolojik mekanizma, yaşam kalitesi üzerine etkisi ve alt grupların tedavileri farklıdır, periferik ağrı mekanizmaları epizodik gerilim tipi baş ağrılarında daha önemliyken santral mekanizmalar kronik tipte önem kazanmaktadır.⁴⁰

2.2.2.3. Gerilim tipi baş ağrısı patofizyolojisi

Gerilim tipi baş ağrısı patogenezi muhtemelen multifaktöriyeldir, ancak kesin mekanizması belli değildir. Gerilim tipi baş ağrısının yoğunluk ve sıklığındaki geniş değişkenlik, altta yatan ağrı mekanizmalarının dinamik olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla bu ağrı mekanizmaları sadece bireyler arasında değil, bir ataktan diğerine aynı bireyde de değişkenlik gösterebilmektedir.

Gerilim tipi baş ağrısında ağrının periferden mi yoksa santral sinir sisteminden mi kaynaklandığı tartışma konusudur. Ağrının klinik olarak miyofasiyal dokulardan kaynaklanıyor olduğu izlenimi alınmaktadır. Modern ağrı fizyolojisine göre ise hem periferik hem de santral mekanizmaların katkısının olması ihtimali yüksektir.⁴¹

2.2.2.3.1. Periferik mekanizmalar

Bu hastalarda artmış kas hassasiyeti en belirgin bulgudur. Ana mekanizma periferik nosiseptörlerin aktivasyonu gibi görünmektedir. Periferik mekanizmalarla ilgili çok sağlam kanıtlar olmamasına rağmen müsküler faktörlerin önemli olabileceği belirtilmektedir. Gerilim tipi baş ağrısı yoğunluğu ve sıklığı perikranial kas hassasiyetiyle doğru orantılıdır. Kas hassasiyetinin kaynağı bilinmemesine rağmen çizgili kaslardaki, tendon eklemlerdeki ve fasiadaki kan damarlarının etrafındaki nosiseptörlerin ağrı kaynağı olduğu düşünülmektedir.^{41,42}

2.2.2.3.2. Santral mekanizmalar

Gerilim tipi baş ağrısı hastalarında stres ve mental gerginlik en sık tetikleyici faktörler olarak rapor edilmektedir. Merkezi sinir sistemindeki ağrı duyarlılığı kronik gerilim tipi baş ağrısı hastalarında artarken epizodik gerilim tipi baş ağrısı hastalarında normaldir. Kronik gerilim tipi baş ağrısı hastalarında azalmış ağrı, ısı ve elektrik eşiği, gelen sinyallerin merkezde hatalı yorumlanması olası göstergesidir. Bu da santral sensitizasyon nedeniyle olmaktadır.⁴³

NO gerilim tipi başağrısı patofizyolojisinde anahtar role sahiptir. Gerilim tipi başağrıların tedavisinde NO sentaz inhibitörlerinin kullanılması ağrı yoğunluğunun ve kas sertliğinin azaltılmasında plasebo grubuna göre daha etkin olmuştur.^{44,45}

Migrenin aksine genetik faktörlerin gerilim tipi başağrısı patogenezinde minör rolü olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte genetik faktörlerin kronik gerilim tipi başağrısında epizodik tipten daha önemli olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.⁴⁶

2.2.2.4. Gerilim tipi başağrısı epidemiyolojisi

Gerilim tipi başağrısı genel popülasyonda en sık rastlanılan birincil başağrısı tipidir. Avrupa ve ABD’de genel popülasyon çalışmalarında prevalansı %30-80 arasında değişmektedir. Kadınlarda erkeklerden daha sık görülür ve yaşla birlikte prevalansı azalır. ABD’de yapılan bir çalışmada prevalansın dördüncü dekada pik yaptığı tespit edilmiştir.⁴⁷ Farklı çalışmalarda gerilim tipi başağrısının 60 yaşın üzerindeki yaşlı popülasyonda da problem olmaya devam ettiği gösterilmiştir.^{47,48} Türkiyede gerilim tipi başağrısı prevalansı yaklaşık %35 dolayındadır.³⁹

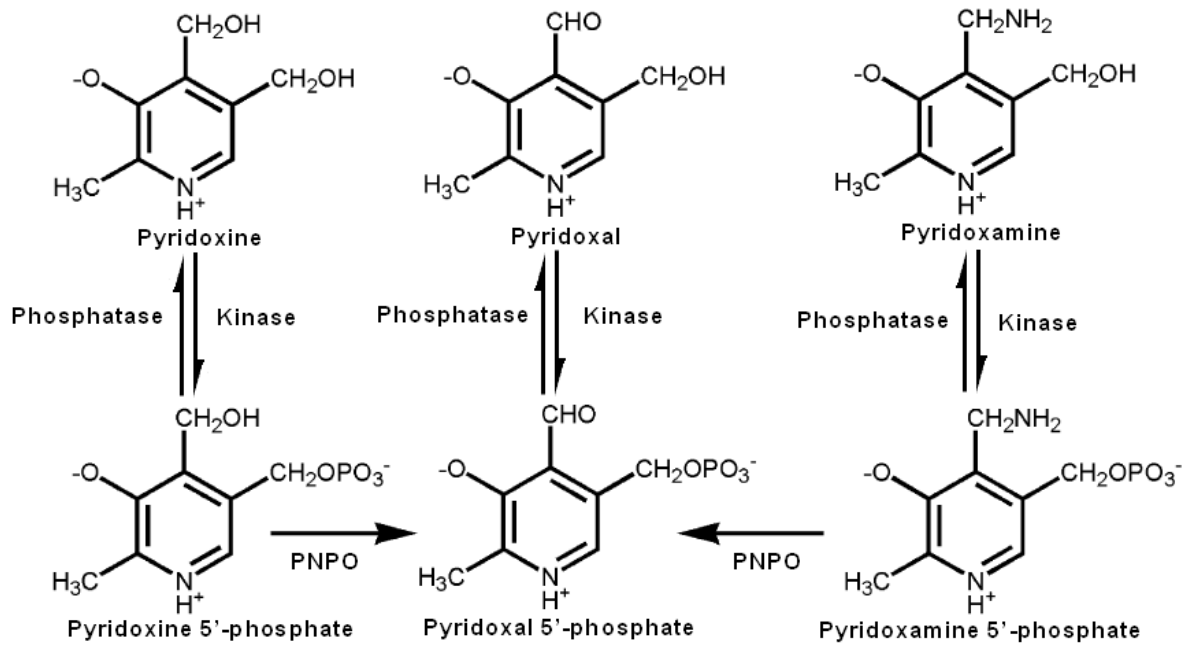
2.3.Vitamin B₆, Vitamin B₁₂ ve FA

2.3.1.Vitamin B₆ (Piridoksin, Piridoksamin ve Piridoksal)

Vitamin B₆ suda çözünen B kompleks vitamin grubundandır. Piridoksin, piridoksamin ve piridoksal vitamin B₆'nın üç doğal formudur. Bunlar amino asitlerin, glikojen ve sfingoid bazların metabolizmasında koenzim olarak fonksiyon görürler.

2.3.1.1.Vitamin B₆ biyokimyası

Vitamin B₆ grubu üç doğal formdan oluşur [Piridoksin (PN), piridoksal (PL) ve piridoksamin (PM)]. Bunlar dördüncü karbonlarına bağlı farklı R gruplarıyla birbirlerinden ayrılan 2-metil-3-hidroksil-5-hidroksimetil piridinlerdir (Şekil 1). PN, hidroksimetil grubu; PL, aldehit grubu; PM ise aminometil grubu taşır. Metabolik dönüşüm sırasında her vitamer 5-hidroksimetil kalıntısından piridoksal kinaz kataliziyle fosforillenir ve PNP, PLP ve PMP oluşur. Hayvan dokularındaki major formları PLP ve PMP'dir; bitkisel kaynaklı gıdalar birincil olarak PN ve PNP içerirler, bazen de glikozid formlarında bulunurlar.⁴⁹



Şekil 1. Vitamin B₆'nın altı vitameri ve birbirlerine dönüşümü.

2.3.1.2. Vitamin B₆ emilimi, taşınması, metabolizması ve atılımı

Hayvan dokularının major B₆ formu PLP'dir; daha az bulunan form ise PMP'dir. Hayvansal ve bitkisel kaynaklı gıdalar farklı yollardan absorbe edilen B₆ vitamin türevlerini içerirler (hayvansal besinler esas olarak PLP ve bir miktar PMP, bitkisel besinler ise piridoksin-5'-glikozid içerirler). Bağırsaklardan absorpsiyon, intestinal alkalen fosfataz-ilişkili hidrolizi takiben, mukozal hücrelerden, non-fosforile formda transportunu içerir. Transport doyurulmamış pasif difüzyon mekanizması ile gerçekleşir.⁵⁰ Glikozid formdaki PN'nin absorpsiyonu PLP ve PMP absorpsiyonundan daha az etkindir ve mukozal glukosidazlarca dekonjuge

edilir. Bazı PN glukozidler tam (bütün) olarak absorbe edilir ve çeşitli dokularda daha sonra hidrolizlenir.⁵¹

PN, PL ve PM, PL kinaz kataliziyle PNP, PLP ve PMP'ye dönüştürülür. Çok düşük konsantrasyonlarda bulunan PNP ve PMP, PNP oksidaz etkisiyle PLP'ye okside edilir (Şekil 1). PLP dokularda proteinlere bağlanarak fosfatazların etkisinden korunur. Protein bağlama kapasitesi aşıldığı zaman serbest PLP süratle hidrolizlenir ve B₆'nın nonfosforile formu karaciğer ve diğer dokulardan dolaşıma salınır.⁵²

Hücrelerin çoğu PNP ve PMP'ı, oksijen bağımlı reaksiyon ile PLP'ye (ve hidrojen peroksit) dönüştüren sitozolik FMN bağımlı piridoksin (piridoksamini)-5'-fosfat oksidaz içerir. PLP, hepatosit mitokondrileri gibi subselüler organellere direkt olarak girebilir ve hücrede çeşitli spesifik apoenzimlere, katalitik fonksiyonları için bağlanabilir. Eritrositler PLP'yi konjuge Schiff baz olarak hemoglobinle hücre içinde tutar. Kaslardaki vitamin B₆ vücut depolarının %80'inden sorumludur, çoğu PLP olarak glikojen fosforilaza bağlanır.⁵³

Serbest vitamin salınımı, vitaminin fizyolojik olmayan aşırı nonsature formları absorbe edildiği zaman görülür. Fosfat grupları hücrelerin plazma membranında yerleşmiş olan alkalin fosfatazlarca nonspesifik olarak hidroliz edilir. Bir miktar PLP karaciğer tarafından dolaşıma verilir. Plazmada major PLP bağlayıcı protein albümindir ve

karaciğerden PLP-albümin kompleksi olarak salınır.⁵⁴ Reaktif aldehid grupları, amino grupları ile Schiff bazı oluşturma yeteneğinde sahip olduklarından plazmada bulunan PLP çoğunlukla albüminle olmak üzere proteinlere sıkıca bağlanır. Vitamin B₆'nın katabolizması sonucu oluşan 4-piridoksik asit idrarla atılır. Bu son ürün flavin adenin dinükleotid (FAD) bağımlı bir karaciğer enzimi olan aldehid oksidaz ve çoğu dokularda bulunan NAD spesifik aldehid dehidrogenaz etkisiyle oluşur.⁵³

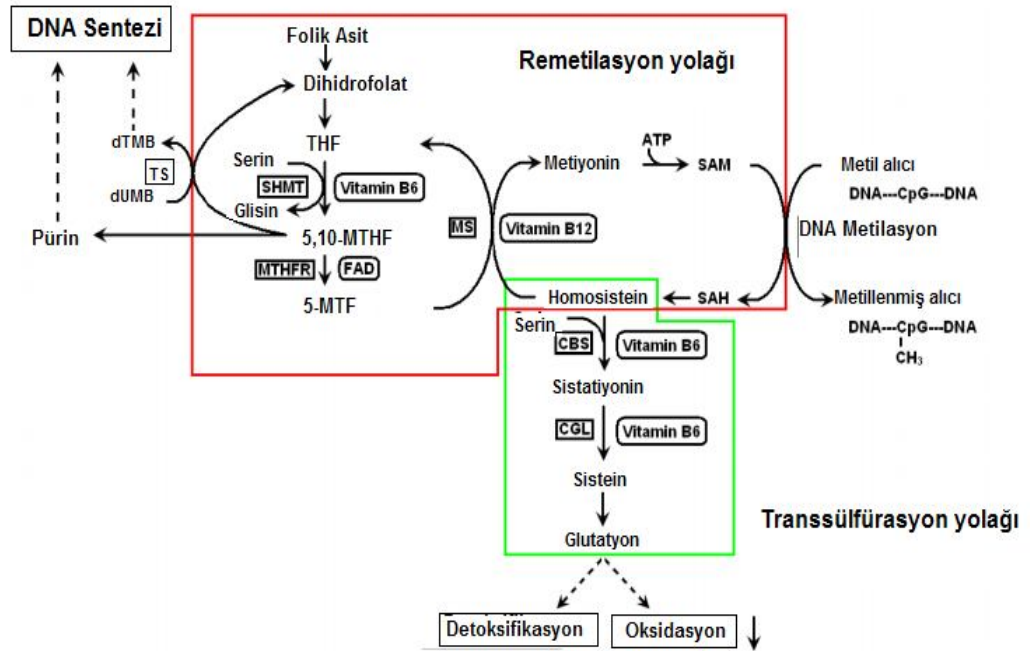
Normal olarak major atılım ürünü, idrardaki B₆ bileşiklerinin yaklaşık yarısını oluşturan 4-PA'dır. Bununla birlikte diğer vitamin B₆ formları da idrarda bulunur.⁵⁵ Vitamin B₆, feçesle daha az oranda atılır. Ancak bağırsak bakterilerinin tarafından sentezlenen vitamin B₆, bu yolla atılımın değerlendirilmesini zorlaştırır.⁵⁵

2.3.1.3. Vitamin B₆ fonksiyonları

PLP aminotransferazlar, dekarboksilazlar, rasemazlar ve dehidratazları içeren amino asit metabolizmasıyla ilişkili 100-150 kadar enzimin koenzimidir. Sadece aminoasit ve nörotransmitter metabolizmasında⁵⁶ değil, insan vücudundaki diğer sistemlerde de görev alır. Karbonhidrat metabolizması⁵⁶ tek karbon metabolizması⁵⁷, yağ asit metabolizması, hem sentezi, gen ekspresyonu⁵⁸ ve immün sistemin regülasyonunda⁵⁹ da fonksiyonu vardır. Aynı zamanda vitaminin anti-oksidatif ve karsinogenezis üzerine etkileri de gösterilmiştir. PLP'ın karbonil grubu, lizinin ε-amini ile Schiff bazı oluşturarak proteinlere bağlanır.

Pratik olması açısından PLP ihtiyacı duyan tüm reaksiyonların başlangıç basamağında ilgili amino asitin α -amino grubu ile PLP'ın karbonil grubu arasında Schiff bazı oluşur.⁵⁹

Tek- karbon metabolizması, amino asit metabolizmasında tek karbon gruplarının değiştiği, bir çift reaksiyondan oluşur. İki yolağa ayrılır: remetilasyon ve transsülfürasyon yolları. Her iki yolda da vitamin B₆ birkaç enzimin kofaktörü olarak görev alır (Şekil 2). Tek-karbon metabolizması DNA sentezi, DNA metilasyonu, detoksifikasyon ve oksidasyona karşı korumada rol oynar.⁶⁰



Şekil 2. Tek-karbon metabolizmasına bakış. Tek karbon metabolizması remetilasyon döngüsü (kırmızı) ve transsülfürasyon döngüsünden (yeşil) oluşur.

Vitamin B₆'nın, özellikle PM'in antioksidan özellikleri çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Vitamin B₆ vitamerlerinin antioksidan özelliklerini, reaktif oksijen⁶¹ ve reaktif karbonil türlerini⁶² yakalayarak, metal iyonları ile şelasyon⁶³ yaparak ve GSH sentezini artırarak veya devamlılığını sağlayarak⁶⁴ gerçekleştirdikleri gösterilmiştir.

2.3.1.4. Vitamin B₆ eksikliği

Tek başına vitamin B₆ eksikliği nadir görülür ve diğer B-kompleks vitaminlerin eksikliğiyle ilişkili görülen bir problem olarak kabul edilir. Vitamin B₆ eksikliğin klasik bulguları arasında; seboreik dermatit, mikrositik anemi, epilepsi benzeri konvülzyonlar ve depresyon yer almaktadır.

Mikrositik anemi azalmış hem biyosentezini gösterir. Hem biyosentezinde ilk basamakta yer alan ve kontrol basamağını oluşturan aminolevulinat sentaz, koenzim olarak PLP'yi kullanır.⁶⁵ Nörotransmitter sentezinde görev alan dekarboksilazlar da koenzim olarak PLP'yi kullanırlar. Dolayısıyla bu enzimlerde meydana gelen defektlere bağlı nörotransmitter sentez eksiklikleri (dopamin, seretonin, γ-aminobütirat eksikliği) vitamin B₆ eksikliğine bağlı konvülzyonları açıklayabilir.⁶⁶

Bununla birlikte B₆ hipovitaminozuna neden olan ilaç etkileşimleri de bulunmaktadır.⁵³ Örneğin tüberküloz tedavisinde kullanılan isoniazid (isonikotinic asit hidrazid) piridoksal ve PLP ile hidrazonlar oluşturur. Wilson hastalığının tedavisinde kullanılan penisilamin thiazolidin derivativleri oluşturarak, antiparkinson ilaç benserazid ve karbidopa da, hidrazon oluşturarak B₆ eksikliğine neden olabilir.⁶⁷

Vitamin B₆'ya duyarlı birkaç yenidoğan metabolizma bozukluğu da vardır. Bunlar: (1) glutamat dehidrogenaz apoenziminin koenzimine zayıf afiniteyle bağlandığı yeni doğan konvülzyon durumları; (2) piridoksin takviyesiyle eritrositlerin morfolojik değişiklikleri değil de sayılarında düzelme görülen kronik anemi tipi; (3) mutant kyrüneninazın PLP'ye azalmış afinite gösterdiği ksantürenik asidüri; (4) benzer defektin sistatyonazda olduğu primer sistatyonüri; (5) normal sistatyonin sentaz aktivitesinin az olduğu homosistinüri.⁶⁸

2.3.1.5. Vitamin B₆ eksikliği ve klinik laboratuvar

Vitamin B₆ eksikliğinin değerlendirilmesinde direkt (plazma, kan hücreleri veya idrar vitamin B₆ ölçümü), indirekt (homosistein ölçümü) veya fonksiyonel (PLP ile eritrosit aminotransferaz saturasyonu veya triptofan metabolitleri ölçümü) testlerden yararlanılır. Bununla birlikte vitamin B₆ eksikliğinin değerlendirilmesinde en iyi testin doku depolarını yansıtmaması nedeniyle plazma vitamin B₆ ölçümü olduğu belirtilmiştir.⁶⁹

Plazma PLP ve plazma veya idrar 4-PA, PLP'nin semikarbazon gibi bir bileşiklerle prekolon florofor oluşturmasına dayanan yöntemle ve 4-PA'nın doğal floresansı ile floresan dedektörle HPLC'de ölçölür. Diğer bir direkt ölçüm yöntemi rekombinant enzim teknolojisinin kullanıldığı yöntemdir. PLP için homojen, nonradyoaktif rekombinant enzimatik yöntem tanımlanmış ve otomatik analizörlere uyarlanmıştır.⁷⁰

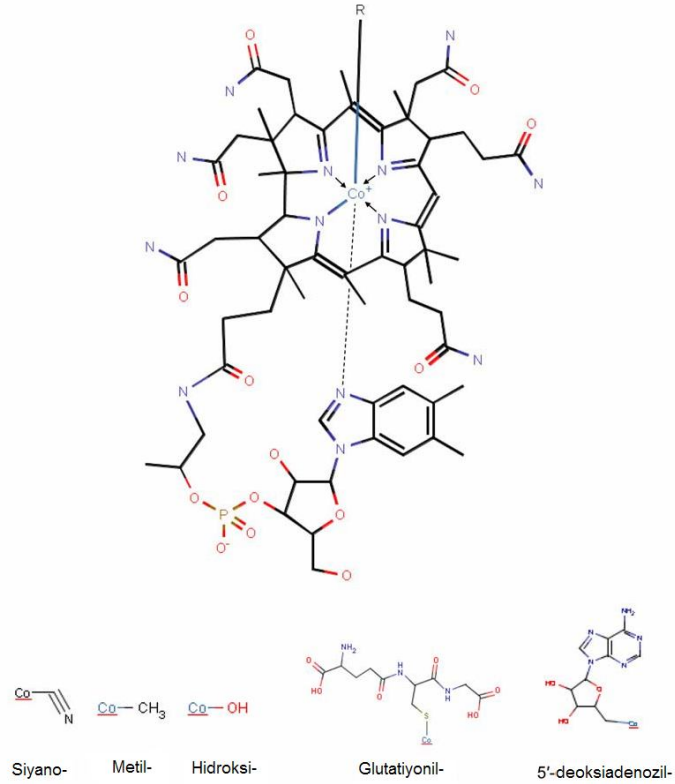
Vitamin B₆ durumu fonksiyonel olarak, eritrosit aspartat (veya alanin) aminotransferaz aktivitelerinin ölçümü ve PLP ile inkübasyondan sonra aktivasyon katsayılarındaki artış ile değerdendirilir. Aktivasyon katsayısındaki artışın aspartat aminotrasferaz için <1.5, alanin aminotransferaz için <1.2 olması vitamin B₆ durumu için normal kabul edilir. Oral yüklemenin ardından triptofan metabolitlerinin (özellikle ksantürenik asit ölçümü) vitamin B₆ durumunun değerdendirilmesinde en yaygın kullanılan parametredir. Çünkü bu değerdendirmeye vitamin B₆'daki değışiklikler erken tespit edilir ve ölçüm yöntemi nispeten daha kolaydır.⁵³

2.3.2. Vitamin B₁₂

Vitamin B₁₂ eritrositlerin maturasyonu için ihtiyaç duyulan suda çölünen bir hematopoietik vitamindir. Homosisteini metiyonine dönüştüren kritik metil transfer reaksiyonu ve L-metilmalonil Ko-A'yı süksinil Ko-A'ya dönüştüren özel bir reaksiyon için koenzim olarak fonksiyon görür.

2.3.2.1. Vitamin B₁₂ biyokimyası

Vitamin B₁₂ doğada oluşturulan yapısal olarak en kompleks küçük moleküllerden biridir. Jenerik adı kobalaminler veya korrinoidler olarak sınıflandırılan fizyolojik olarak aktif bir grubu ifade eder. Korrin halkaya, şeker olarak bir riboz, fosfat ve bir baz (5,6-dimetil benzimidazol) bağlı, kobalt içeren bileşikler için kullanılan genel bir terimdir (Şekil. 2).⁷¹



Şekil 3. Kobalamin yapısı.

Kobalt ve diğer yan zincirler hariç, kobalamin tetrapirrol halkası, korrin olarak adlandırılır. Bu korrin nükleusta yer alan bütün bileşikler korrinoidlerdir. Kobalt-korrin kompleksi, kobamid olarak adlandırılır.

Kobalaminlerde 5,6-dimetil-benzimidazol ribozid imidazol nitrojenlerinden biriyle kobalt atomuna bağlanır ve bunun 2'-riboz karbonu korrin halkaya aminoisopropanol ve propionik asit esterleri ile bağlıdır.⁵³

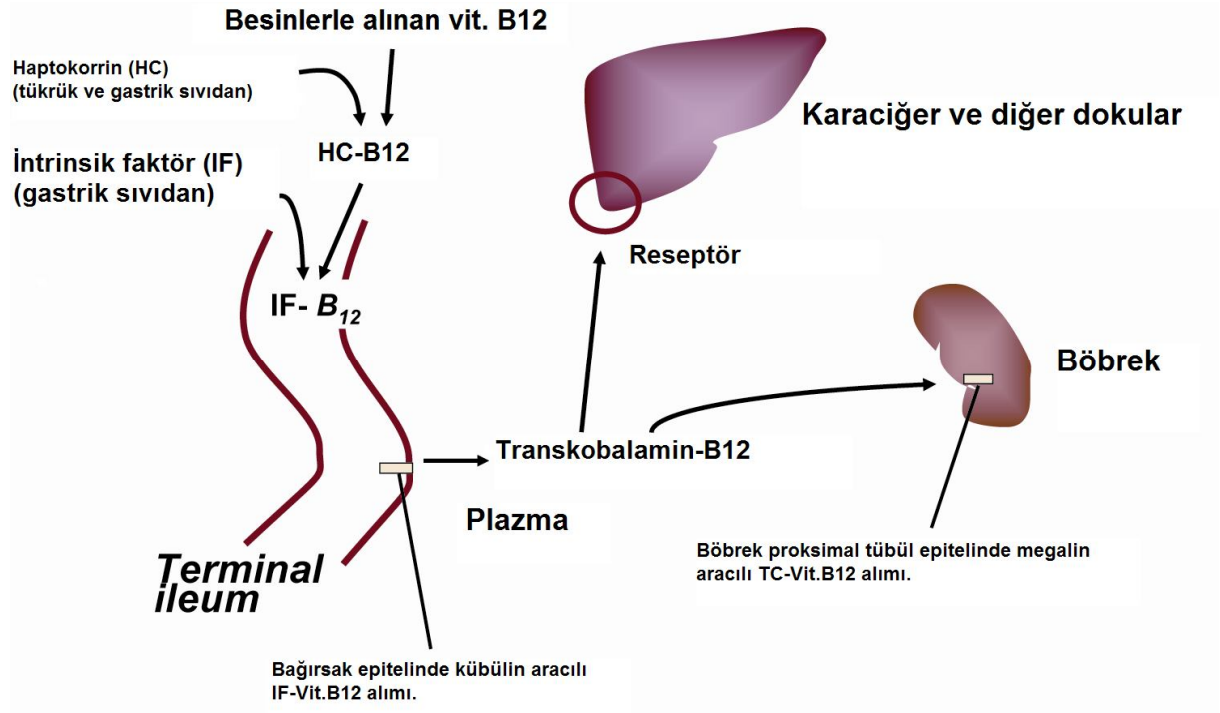
Kobalaminler kobalta bağlı farklı yan zincirleri ile birbirlerinden ayrılırlar: Metil (metilkobalamin), 5'deoksiadenozil (adenozilkobalamin), hidroksil (hidroksikobalamin), su (acuacobalamin) ve siyanid (siyanokobalamin). Siyanokobalamin koyu kırmızı renkte iğne benzeri kristaller oluşturan stabil bir bileşiktir; serum kobalamin konsantrasyonunun ölçülmesinde referans bileşiktir. Daha az stabil olan serum kobalamin kantitasyon için bu bileşiğe dönüştürülür. Kobalaminin predominant fizyolojik formu serumda metilkobalamin, sitozolde adenozilkobalamindir.⁷²

2.3.2.2. Vitamin B₁₂ emilimi, taşınması, metabolizması ve atılımı

Bağırsaklardan dolaşıma vitamin B₁₂ alım mekanizması beş ayrı vitamin B₁₂ bağlayıcı molekül, reseptör ve taşıyıcıları içeren oldukça kompleks bir mekanizmadır. Midede besinlere bağlı olarak bulunan B₁₂, asit ve pepsin varlığında proteinlerinden ayrılır. Salınan vitamin B₁₂ midede bir tükrük proteini olan haptokorrine (R protein) bağlanır. Haptokorrinin ince bağırsakta pankreatik proteazlarca parçalanır. Serbest kalan vitamin B₁₂, gastrik mukozada sentezlenen, molekül ağırlığı yaklaşık 50 kDa olan glikoprotein yapıdaki intrinsik faktöre (IF) bağlanır. Vitamin

B₁₂-IF kompleksi distal ileuma ulaştığında mukozal epitelyum hücreleri yüzeyinde bulunan reseptörlerine bağlanarak hücre içine alınır.⁷³

Mukoza hücresinde, vitamin B₁₂-IF kompleksi ayrılır ve vitamin B₁₂ transkobalamin II'ye (TCII) bağlanır. B₁₂-TCII kompleksi TCII-reseptörüne bağlanarak mukoza hücre membranını geçer ve mukoza kapillerlerine, oradan da portal vene salınır.⁷² Portal vendeki vitamin B₁₂'nin hemen hemen tümü karaciğere alınır. Burada depolanır ve fizyolojik ihtiyaçları karşılamak üzere buradan plazmaya salınır. Eğer vitamin B₁₂ miktarı hepatositlerdeki reseptör kapasitesini aşacak olursa, fazlalığın çoğu böbrekler tarafından atılır. Normalde karaciğerde 2000 günlük metabolik ihtiya ı karşılayan 1 mg vitamin B₁₂ depolanır. Dolayısıyla vitamin B₁₂'nin eksik alımında veya absorbsiyon mekanizmasında bir bozukluk olduğunda eksiklik bulguları 5 yıldan önce ortaya çıkmaz.⁵³



Şekil. 4. İnsanda vitamin B₁₂ transportu ve emilimi.

IF, midenin parietal hücreleri tarafından salınan yaklaşık 50 kDa ağırlığında bir glikoproteindir. Bir molekül IF, bir molekül vitamin B₁₂ bağlar. Gastrik IF salınımı besinler, histamin ve gastrin tarafından uyarılır; vagal blokaj tarafından inhibe edilir.⁵³

Plazmadaki en önemli vitamin B₁₂ transport proteini bir β -globulin olan TCII'dir. Esas olarak karaciğerde, ancak diğer dokularda da sentezlenir. TCII molekül ağırlığı yaklaşık 43 kDa olan bir polipeptiddir, her molekülde tek bir vitamin B₁₂ bağlama bölgesi bulunur.⁷⁴ TCII, vitamin B₁₂'ye özgüllüğü IF'den daha azdır; aynı zamanda fizyolojik olarak aktif olmayan kobalaminleri de bağlar. TCII, hücre membran yüzeyindeki reseptörleriyle vitamin B₁₂'yi taşır. TCII-vitamin B₁₂ kompleksi hücrelere

pinositozla girer. Lizozomal proteolizle TCII yıkılır ve vitamin B₁₂ salınır. TCII bağlı olmayan vitamin B₁₂'de hücrelere girebilir, ancak bu sürecin etkinliği çok azdır.⁷³

İnsan mide sıvısında iki tip vitamin B₁₂ bağlayıcı bulunur: zon elektroforezinde bunlardan biri yavaş (S) diğeri ise hızlı (R) harekete sahiptir. Yavaş hareketli bileşik intrinsik faktör, hızlı hareket eden ise R proteindir. R proteini plazmada, amniyon sıvısında, tükürükte, sütte, asit mayide ve granülositlerde immünolojik olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte bu granülosit kaynaklı protein elektroforetik olarak diğeri R proteinlerinden ayırt edilebilir. Diğeri kaynaklı R proteinleri transkobalamin I diye adlandırılırken, granülosit kaynaklı bu R proteini transkobalamin III olarak adlandırılır. Bu iki bağlayıcı ise kobalofilinler olarak ifade edilirler. Molekül ağırlıkları 60-150 kDa arasında değişen glikoprotein yapıdaki molekülüdür. Heterojeniteleri apoproteilerinin yapısından çok karbonhidrat kalıntılarının (sialik asit) farklılığından kaynaklanmaktadır. Her molekül için bir bağlayıcı bölgeleri vardır ve farklı derecelerde vitamin B₁₂ analoglarını da bağlayabilirler. pH 2'deki mide sıvısında kobalofilinler IF'den daha yüksek afiniteye sahiptirler ve hemen hemen tüm vitamin B₁₂'leri bağlarlar. Bu özellikleri nedeniyle konakçıyı bakterilere karşı korumada vitamin B₁₂'nin bakterilerce kullanımını engelleyerek yardımcı oldukları düşünülmektedir. Bununla birlikte bu proteinlerin fizyolojik fonksiyonlarının ne olduğu bilinmemektedir.⁵³

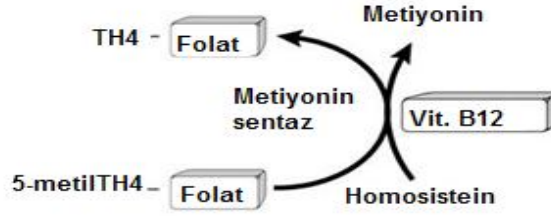
Vitamin B₁₂ sürekli olarak safraya salınır ancak çoğu tekrar reabsorbe edilerek uygun metabolik fonksiyonlarda kullanılır. Eğer

dolaşımdaki vitamin B₁₂ konsantrasyonu bağlama kapasitesini aşacak olursa fazlalık idrarla atılır, ancak çoğu durumda fazla vitamin B₁₂ kaybı feçesle gerçekleşir.⁵³

2.3.2.3. Vitamin B₁₂ fonksiyonları

Vitamin B₁₂, metiyonin sentaz ve L-metilmalonil KoA mutaz enzimlerinin kofaktörüdür.

Metiyonin sentaz enzimi metiyonin ve tetrahidrofolat (THF) oluşturmak üzere, Hcy metiltetrahidrofolattan metil grubu transferini katalizler. Bu reaksiyonda kofaktör olarak metilkobalamine ihtiyaç duyulur (Şekil 2.). Bu reaksiyonun metabolik yararları metiyonin depolarının korunması, pürin, pirimidin ve noradrenalin sentezine katılmak üzere THF'in sağlanmasıdır. Vitamin B₁₂ eksikliğinde FA stoğu N⁵-metiltetrahidrofolat halinde kalır. Birinci derecede yararlı türevler oluşmaz. Buna metil folat tuzağı denir.⁷⁵



Şekil 5. Metiyonin sentaz reaksiyonu. Koenzim olarak metilkobalamin kullanır.

L-Metilmalonil KoA mutaz, L-metilmalonil KoA'yı süksinil KoA'ya bir izomerizasyon reaksiyonu ile dönüştürmek için adenosilkobalamine ihtiyaç duyar (Şekil 5). Reaksiyon alifatik aminoasitler ve yağ asitlerinin metabolizması için önemli role sahiptir.⁷⁵



Şekil 6. L-Metilmalonil KoA mutaz reaksiyonu. Kofaktör olarak adenosilkobalamin kullanır.

2.3.2.4. Vitamin B₁₂ eksikliği

Vitamin B₁₂ eksikliği megaloblastik anemi ve nöropati ile ilişkilidir. Vitamin B₁₂ eksikliğinin en önemli nedeni pernisiyöz anemidir. Pernisiyöz anemi gastrik parietal hücreler (H/K ATPase) ve IF'e karşı antikörlerin geliştiği, atrofik gastrite neden olan bir otoimmün hastalıktır.⁷⁶ Bunun yanında, 65 yaş üzerindeki bireyler, malabsorbsiyon (gastrektomi veya ileal rezeksiyon, tropikal supruve, inflamatuvar bağırsak hastalıkları v.b), vejetaryan beslenme şekli, diğer otoimmün hastalıklar ve nitroz oksit, fenitoin, dihidrofolat redüktaz inhibitörleri, metformin ve proton pompa inhibitörü gibi vitamin absorpsiyonunu ve metabolizmasını inhibe eden ilaçların kullanılması ve metabolik bozukluk düşünülen yeni doğanlarda (Imerslund-Graesbeck sendromu) da vitamin B₁₂ eksikliği gelişebilir.⁵³

Vitamin B₁₂ eksikliğinin hematolojik bulguları folat eksikliği bulgularından ayırt edilemez. Klasik morfolojik değişiklikler, bulgu sırasına göre: nötrofil hipersegmentasyonu, makrositoz, anemi, lökopeni, trombositopeni, periferel kandaki değişikliklere eşlik eden megaloblastik kemik iliği değişiklikleridir. Hematolojik anormalliklerin nedeni olarak azalmış DNA sentezindeki dengesizlik ve vitamin B₁₂ eksikliği nedeniyle folat metabolizmasındaki sekonder bloğun neden olduğu düşünülmektedir. Muhtemelen apoptozis nedeniyle kemik iliğinde pek çok immatür hücre ölmekte, plazmaya bilirubin ve laktat salınımına neden olmaktadır. Bu inefektif eritropoiezis olarak adlandırılır. Tüm kemik iliği lezyonları vitamin B₁₂ tedavisiyle geri döner.⁵³

Hematolojik değişikliklerin yanında vitamin B₁₂ eksikliği merkezi sinir sisteminde demiyelinizasyon bozukluklarına da neden olur. Ciddi ve genellikle geri dönüşümsüz nörolojik hastalıklar görülür (yanıcı tarzda ağrı, ekstremitelerde duyu kaybı, halsizlik, spastisite ve paraliz, konvülzyon, disorientasyon ve demans). Bu problemler spinal kordun subakut kombine dejenerasyonu olarak adlandırılır. Nörolojik semptomlar herhangi bir hematolojik değişiklik görülmezsizin de gelişebilir.⁵³ Vitamin B₁₂ eksikliğine bağlı nörolojik semptomlarla ilişkili mekanizmalar tam açık değildir. Ancak nörolojik semptomların görülmesinde koenzim olarak vitamin B₁₂'yi kullanan her iki enzim sisteminin aksamasının rolü olduğu düşünölmektedir.⁵³

2.3.2.5. Vitamin B₁₂ eksikliğinde klinik laboratuvar

Vitamin B₁₂ durumunun değerlendirilmesinde hem direkt hem de indirekt yöntemler vardır. İndirekt testler idrar ve serum metilmalonik asit , plazma homosistein, deoksiüridin baskılanma testi ve vitamin B₁₂ absorbsiyon testini içerir. Kırmızı kan hücre öncülllerinin sitokimyasal boyanması ve IF blokan antikörlerinin test edilmesi de vitamin B₁₂ durumunun değerlendirilmesinde yardımcı testlerdir.⁵³

Mikrobiyolojik, yarışmalı protein bağlanma yöntemleri ve immünokimyasal yöntemler serum vitamin B₁₂ düzeyinin belirlenmesinde kullanır. Biyolojik olarak aktif olan vitamin B₁₂'nin belirlenmesinde

mikrobiyolojik yöntemler daha doğru ve güvenilir olarak diğer yöntemlerin yerini almıştır. Bu yöntemlerde yaygın olarak *Euglena gracilis*, *Lactobacillus leishmannii* veya mutant *Escherichia coli* kullanılır. Bununla birlikte bu yöntemlerde mikroorganizmaların gelişmesi için 24 saate ihtiyaç duyulur.⁷⁷

Yarışmalı protein bağlanma yöntemleri için ticari kitler mevcuttur. Vitamin B₁₂ bağlayıcı olarak insan kaynaklı olmayan, genellikle domuz midesinden elde edilen IF kullanılır. Eğer IF yüksek oranda saflaştırılamamışsa reaktif, yüksek vitamin B₁₂ sonuçlarının alınmasına neden olabilecek, sadece vitamin B₁₂'yi değil aynı zamanda inaktif metabolitlerini de bağlayan R proteini de içerebilir.⁷⁸

İndirekt testler vitamin B₁₂'nin fonksiyonel yeterliliğinin değerlendirilmesinde kullanılır. Serum MMA konsantrasyonu, metilmalonil KoA'nın süksinil KoA'ya dönüşümünü engelleyen adenosil-kobalamin yokluğunda artar. Subklinik vitamin B₁₂ eksikliğinde artan birinci analittir ve durumun değerlendirilmesi için en duyarlı testtir. Serum vitamin B₁₂ dolaşımdaki vitamin B₁₂ konsantrasyonunu yansıtır. Ancak doku konsantrasyonu hakkında bilgi vermez. Yeterli vitamin B₁₂'nin olmadığı durumlarda MMA dokularda birikir, dolayısıyla vitamin B₁₂ durumunun fonksiyonel göstergesidir. MMA gibi Hcy' de birikir, ancak Hcy, FA gibi diğer nütrientlerin eksikliğinde de arttığından daha az özgüldür.⁷⁹ Serum MMA artışının FA eksikliğinden etkilenmemesi de ayrı bir avantaj sağlar. MMA ölçümü için geliştirilmiş ilk yöntemler duyarlılık ve özgüllükten

yoksun yöntemlerdi. Bu sorunlar gaz kromatografik kütle spektrometri yöntemiyle çözüldü.⁸⁰

Plazma Hcy konsantrasyonu da, Hcy'nin metiyonine remetilasyonu için metil-kobalamine ihtiyaç duyması nedeniyle vitamin B₁₂ durumunun değerlendirilmesi ile ilgili duyarlı bir belirteçtir, ancak spesifik değildir çünkü FA ve vitamin B₆ eksikliklerinde de konsantrasyonu artar. Plazma Hcy konsantrasyonu floresans veya elektrokimyasal detektörlü HPLC, enzimatik ve kapiller elektroforez ve gaz kromatografi kütle spektrometri yöntemleriyle ölçülebilir.⁵³

Holotranskobalamin II (Holo-TC) ölçümü, sadece TC-II'ye bağlı olan kobalamin hücreler tarafından alınabildiği için, biyolojik olarak yararlı B₁₂'nin ölçümünde, potansiyel olarak yararlı, özgül bir belirteç olarak kullanılabilir. Holo-TC ölçümü için ticari immünokimyasal yöntemler geliştirilmiştir.⁸¹ Bu yöntemler tekrarlanabilirliği yüksek ve kolay olmalarına rağmen ölçülen konsantrasyonların yorumu ve vitamin B₁₂ eksikliğinin belirlenmesinde özgüllüğü ve duyarlılığı halen tartışmalıdır.⁸²

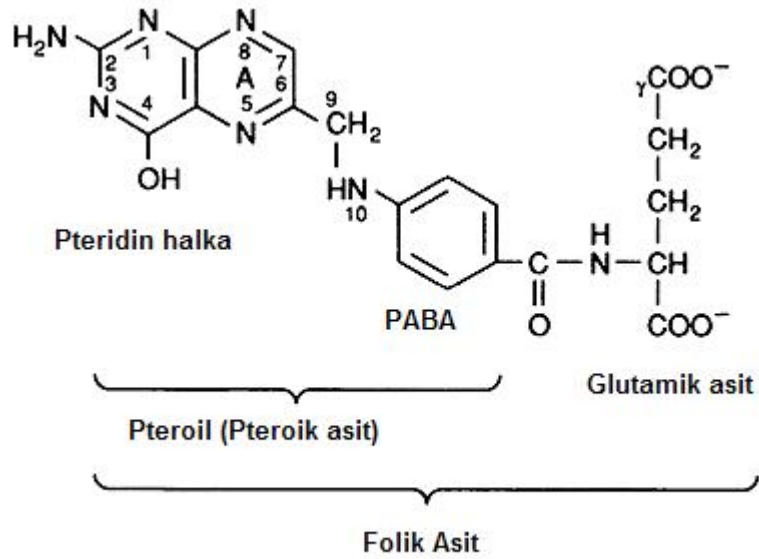
2.3.3. Folik Asit

FA pek çok metabolik reaksiyonda tek karbon grubu taşıyıcısı olarak görev görür. Kolin, serin, glisin, pürinler ve deoksitimidin monofosfat biyosentezinde ihtiyaç duyulan vitamindir.⁸³

2.3.3.1. Folik asit biyokimyası

FA, tek karbon ünitelerinin transferinde koenzim olarak fonksiyon gören ve bir veya daha fazla glutamik asit molekülü bağlı pteroik asitten meydana gelmektedir. Pteroik asit, p-aminobenzoik asit (PABA) kalıntısının bağlı olduğu pteridin halkadan oluşur (Şekil 7). Bu maddenin saf solüsyonları 256, 282 ve 365 nm dalga boylarında absorpsiyon spektrumuna sahiptir ve floresan özelliği vardır. Pteroik asit bir molekül L-glutamik asitle bağlandığı zaman pteroylglutamik asit oluşur ve bu molekül 7 ve 8. pozisyonlarının hidrojenlenmesi ile dihidrofolik asite (DHF) veya 5,6,7 ve 8. pozisyonlarının hidrojenlenmesi ile tetrahidrofolata (THF) indirgenebilir. Molekülün sadece indirgenmiş formları aktiftir. Diğer folat derivativleri çoklu glutamik asit kalıntılarına (1-7 kalıntı olabilir) sahiptir. Biyokimyasal olarak bu poliglutamat bileşikleri monoglutamat bileşikleriyle benzerdir, ancak poliglutamatlar doğal koenzimler olarak görev görürler. Genellikle pteroik asit kalıntısındaki nitrojen atomlarına bağlı, N⁵ veya N⁵ ve N¹⁰, metil, formil, metilen, hidroksimetil veya diğer gruplar gibi fonksiyonel grupları içeren çeşitli folik asit türleri bulunur. İnsan serumunda

çeşitli FA formları bulunmasına rağmen, temel form 5-metiltetrahidrofolattır (5-MTHF).⁵³



Şekil 7. Folik asit yapısı.

2.3.3.2. Folik asit emilimi, taşınması, metabolizması ve atılımı

FA besinlerden esas olarak indirgenmiş metil- veya formil-tetrahidropteroilpoliglutamatlar şeklinde absorbe edilir. Besinlerle alınan poliglutamat FA formları, bağırsak mukozasında bulunan pteroilpoliglutamat hidrolaz enzimi ile monoglutamatlara çevrilir.⁸⁴ Düşük konsantrasyonlardaki monoglutamil folatların emilimleri optimum asidik pH ile (5 civarındaki pH'da), doygunluğa bağlı, aktif transport süreciyle gerçekleştirilir. Bağırsak hücrelerinde, FA'ın çoğu indirgenir ve metillenir.

5- metiltetrahidrofolat olarak (5-MTHF) dolaşıma katılır.⁸⁵ Dolaşımda sıkı olmayan bir şekilde albümine ve daha az olarak, yüksek afinite ile, folat bağlayıcı proteine bağlanarak taşınır.⁵³

Belli başlı hücrelere (böbrek, plasenta ve koroid pleksus) alınması, FA reseptörü olarak etki gösteren membran ilişkili FA bağlayıcı protein yoluyla gerçekleşir ve indirgenmiş FA taşıyıcısı, çoğu dokular tarafından alınmasını kolaylaştırır. Bir kez hücrelere girdi mi 5-MTHF demetillenir ve folilpoliglutamat sentaz tarafından poliglutamil forma dönüştürülür. Bu reaksiyon için kobalamine ihtiyaç duyulur. Böylece molekül hücre içine tuzaklanır. Dolaşıma salınması için poliglutamatlar poliglutamat hidrolaz enzimi ile tekrar monoglutamatlara dönüştürülür.⁵³

Folik asit ve vitamin B12 metabolizması 5-MTHF'den kobalamine metil grubunun transfer edildiği reaksiyon ile ilişkilidir (Bkz. Şekil 2). Kobalamin yetersizliği durumunda folat 5-MTHF olarak tuzaklanır ve metabolik olarak kullanılamaz. Pek çok biyokimyasal reaksiyon için ana tek-karbon ünitesi alıcısı olan THF, FA havuzuna geri dönemez. Sonuç olarak MTHF'nin hücresel yetersizliği timidilik asit sentezinin azalması ve dolayısıyla megaloblastik anemi ve nöropati ile sonuçlanır. Bu konsept konjenital metilmalonik asidürisi veya homosistinürisi olan bireylerde megaloblastik aneminin THF ile düzeltilmesi, MTHF ile düzeltilememesi ile desteklenmektedir.⁵³

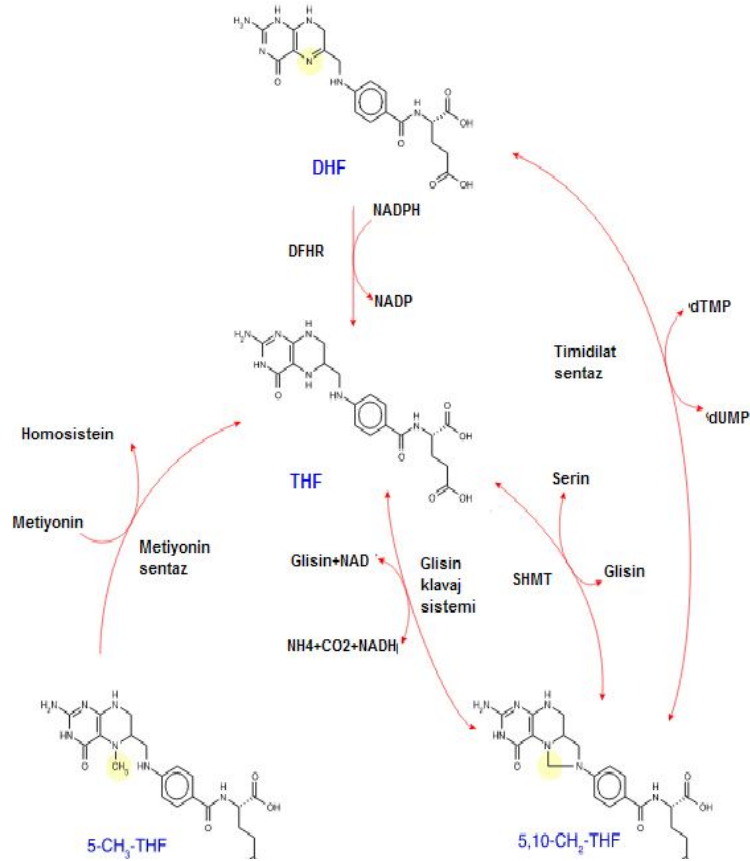
Serbest plazma FA'i glomeruluslardan filtre edilmesine rağmen çoğu, proksimal renal tubullerden geri emilir. Sonuç olarak atılan FA miktarı alınanın çok az bir kısmını oluşturmaktadır. FA esas olarak, C9-C10 bağının yıkılması ile p-aminobenzoilpoliglutamata dönüşür, bu molekülde atılmadan önce monoglutamatlara ve N-asetillenmeye uğrar. Safra ile atılımı günde yaklaşık 100 µg kadardır ancak bununda çoğu enterohepatik dolaşımda geri alınır.⁵³

2.3.3.3. Folik asit fonksiyonları

FA, vitamin B12, B6 ve B2'den oluşan koenzimlerle beraber tek karbon metabolizması için son derece önemlidir. Biyokimyasal olarak serin veya glisindeki tek karbon ünitesi MTHF oluşturmak üzere THF'a transfer edilir. MTHF daha sonra (1) timidin sentezlenmek üzere kullanılır (ve DNA'da kullanılmak üzere), (2) pürin sentezinde kullanılmak üzere formil-THF'a okside edilir (RNA ve DNA'nın öncülleri) veya (3) Hcy'nin metiyonine metilasyonu için gerekli olan MTHF'a indirgenir. Metiyoninin çoğu, DNA, RNA, hormonlar, nörotransmitterler, membran lipidleri ve proteinleri için universal metil vericisi olan S-adenozilmetiyonine dönüştürülür.⁸⁶ Transfer edilecek olan tek karbon ünitesinin kimyasal durumuna bağlı olarak farklı folat türevleri bu reaksiyonlarda görev alırlar (Tablo. 7). FA'in farklı formlarının birbirine dönüşümü özgül enzim sistemleri ve koenzimlerle gerçekleştirilir (Şekil 8).⁸⁷

Tablo.7. İnsanda folatın 5 majör metabolik fonksiyonu.⁵³

Reaksiyon		Folik asit derivativleri
Serin/Glisin metabolizması	Metilen (-CH ₂ -)	N ⁵ ,N ¹⁰ -Metilen THF/FH ₄
Histidin katabolizması	Formimino (-CHNH)	N ⁵ -Formimino THF/FH ₄
Timidilat sentezi	Metilen (-CH ₂ -)	N ⁵ ,N ¹⁰ -Metilen THF/FH ₄
Metiyonin sentezi	Metil (-CH ₃ -)	N ⁵ -Metil THF/FH ₄
Pürin sentezi	Metenil (=CH-) Formil (-CHO)	N ⁵ ,N ¹⁰ -MetenilTHF/FH ₄ N ¹⁰ -Formil THF/FH ₄



Şekil 8. Folik asit metabolizması

2.3.3.4. Folik asit eksikliği

FA eksikliği (1) bağırsak flora bozukluğu (bağırsak sterilizasyonu), (2) zayıf intestinal emilim (ör. ameliyatla bağırsak rezeksiyonu, çölyak hastalığı gibi), (3) diyetle yetersiz alım (kronik alkolizm), (4) aşırı tüketim (gebelik, karaciğer hastalığı ve kanser), (5) antifolat ilaç kullanımı (metotreksat gibi) ve (6) antikonvulsan tedavi (özellikle gebelikte folat ihtiyacının artmasına bağlı olarak) gelişebilir.⁵³

Yetersiz FA alımı önce serum FA konsantrasyonunda düşüşe neden olur, daha sonra eritrosit FA konsantrasyonu azalır, Hcy konsantrasyonu artar ve kemik iliği ve diğer hızlı bölünen hücrelerde megaloblastik değişiklikler meydana gelir.

Kemik iliğinde erken morfolojik anormalliklerin gelişimini takiben birkaç hafta içinde nötrofillerin hipersegmentasyonu görüldüğü zaman periferik kanda da değişiklikler görülmeye başlanır. Net ortalama hücre hacmi (MCV) artışı veya anemiden önce kan tablosu değişiklik gösterir.⁸⁸ Bazı eksiklik vakalarında periferik yaymada makrositler veya makroovalositler görülürken diğerlerinde eritrositler minimal anizositoz veya hiçbir değişiklik göstermeyebilir. Eritropoez için folat yetersizse makrositik hücreler oluşur. Bununla birlikte, normal eritrositlerin 120 günlük yaşam döngülerinde makrositoz, folat eksikliğine bağlı megaloblastozisin erken döneminin kanıtı olmaz.⁸⁸

En çok çalışılan polimorfik alleler 5,10 metilentetrahidrofolat redüktaza (MTHFR) aittir. Enzim homosisteinin metiyonine dönüşmesinde, metil verici olarak kullanılan 5-MTHF için, 5,10 MTHF geri dönüşümsüz olarak redüksiyonunu katalizler. 677. baz çiftindeki C-T mutasyonu (C677T) valin yerine alanin geçmesine neden olur ve azalmış enzim aktivitesi ile termolabil proteinin oluşmasına yol açar.⁸⁹ Homozigot T/T mutasyonu Asya ve beyaz ırkta %12 insidansa sahiptir. Bu grupta enzim aktivitesi yaklaşık %50 azalmıştır. Heterozigot taşıyıcılık ise bazı toplumlarda %50 görülmesine rağmen enzim aktivitesi daha azalmış olarak görülür.^{90,91} Türkiye’de ise C677T mutasyonu görülme sıklığı %42.9 olarak bulunmuştur.⁹²

2.3.3.5. Folik asit eksikliğinde klinik laboratuvar

Vitamin B₁₂ ile kıyaslandığında FA durumunun değerlendirilmesinde kullanılan test sayısının oldukça az olduğu görülür. Bunun yanı sıra FA eksikliğinin laboratuvar değerlendirilmesinde herhangi bir konsensüs bulunmamaktadır.

Vitamin B₁₂ eksikliğinde olduğu gibi FA eksikliğinde de minimal kan sayımı ve MCV değişikliği görülebilir. Serum FA ölçümünün yanı sıra eritrosit içi folat (EFA) ölçümü de yapılabilir. FA kemik iliğinde gelişmekte olan eritrositler tarafından alındığı için, 120 günlük ömürleri sırasında dolaşımdaki olgun eritrositler tarafından alınmadığı için EFA

konsantrasyonu uzun dönem FA durumunun bir göstergesi olarak kabul edilir. Dolayısıyla EFA düzeyi son alınan ilaçlardan ve besinlerden etkilenmez. Eğer yeni bir diyet değişikliği varsa EFA ölçümü, serum folat ölçümü yerine düşünülebilir. Yapılan çalışmalarda eritrosit folat konsantrasyonu ile karaciğer folat konsantrasyonu arasında korelasyon olduğunu göstermiştir. Bu nedenle eritrosit içi folik asitin vücudun depo folat durumu hakkında daha iyi bilgi verdiği ileri sürülmüştür.⁷⁷ Ancak EFA ölçümündeki analitik sınırlamalar göz önünde bulundurulmalıdır. FA ve vitamin B₁₂ arasında potansiyel bağıllık vardır. Eksikliklerinin ayırıcı tanısı için her iki vitaminin de detaylı değerlendirilmesi gerekir. Örneğin her iki vitaminin de eksikliği Hcy'de artışa neden olur. Ayrıca FA'nin azalması metabolik bloklardan dolayı B₁₂'nin de azalmasına neden olabilir. FA tedavisi vitamin B₁₂'nin de normale dönmesine neden olabilir.⁸⁷

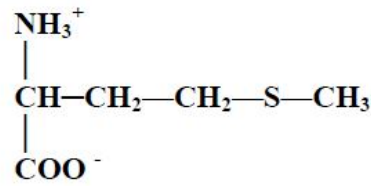
Hem serum FA hem de EFA konsantrasyonları plazma total Hcy konsantrasyonu ile ters ilişkilidir.⁹³ Hcy'nin metiyonine metilasyonu için, bir FA formu olan MTHF'a ihtiyaç duyulur. Bu molekülün eksikliği durumunda plazma Hcy konsantrasyonu artar. Ancak bu artış FA özgü bir artış olmayabilir, vitamin B₁₂ ve B₆ eksikliklerinde de homosisteinin arttığı aşıkardır.⁹³

2.4 Homosistein

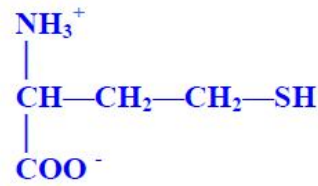
İlk kez 1962 yılında Carson ve Neill artmış Hcy düzeyleri ile hastalıklar arasındaki ilişkiyi tanımlamışlardır.⁹⁴ Bundan iki yıl sonra sistatyonin β -sentaz'daki homozigot defektin çok genç yaşta ölümler için artmış risk olabileceği Mudd ve arkadaşları⁹⁵ tarafından rapor edildi. Ancak bu bulgunun mantıklı bir açıklaması o dönemde yapılamadı. 1969 yılında McCully ve arkadaşları homosistinüri ve metilmalonik asidüriden ölen 7 haftalık bir bebekten elde ettiği bulgularla artmış Hcy'nin vasküler değişikliklere ve tromboza neden olabileceği hipotezini ileri sürmüşlerdir.⁹⁶ Günümüzde ise hiperhomosisteineminin (HHcy) artık kardiyovasküler hastalıklar^{97,98}, ters gebelik komplikasyonları⁹⁹, Alzheimer hastalığı gibi nöropsikiyatrik hastalıklar¹⁰⁰ ve immün aktivasyon¹⁰¹ için risk faktörü olduğu bilinmektedir.

2.4.1. Homosistein biyokimyası

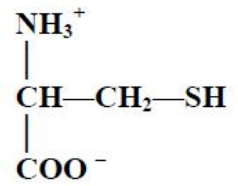
Hcy, metiyoninin nonesansiyel aminotiyol sisteine yıkımı sırasında oluşan bir üründür. Normalde Hcy iki yolakla metabolize olur: remetilasyon ve transsülfürasyon yolakları (Şekil 2.). Hcy yapısal olarak metionin ve sisteine benzer (Şekil 9.).



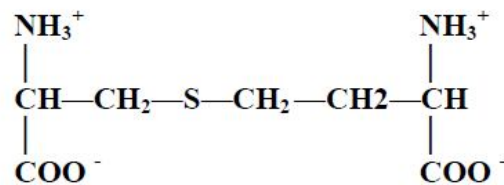
Metiyonin



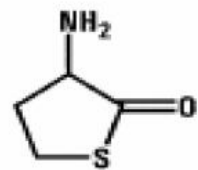
Homosistein



Sistein



Sistatyonin



Homosistein tiyolakton

Şekil 9. Metiyonin, homosistein, sistein ve sistatyonin formülleri.

Hcy hücrelerde sentezlenir. Toksisitesinden dolayı hücre içi Hcy konsantrasyonu sıkı kontrol edilir, $<1 \mu\text{mol/L}$, ve fazlası hücre dışına atılır. Sülfidril (-SH) gruplarının oksidasyona duyarlılıkları nedeniyle, plazma total Hcy'nin sadece %1-2'si indirgenmiş L-homosistein formunda bulunur. Geri kalan %98'i oksidize disülfid formundadır.¹⁰² Hcy'nin disülfid formu ya otooksidasyonla ya da diğer tiyol içeren bileşiklerin -SH veya disülfid (S-S) grupları ile reaksiyonu sonucu oluşur.¹⁰³ Oksidize formları serbest ve bağlı formlar olmak üzere iki gruba ayrılır. Serbest oksidize formlar non-protein bağlı disülfidler olarak adlandırılır ve iki Hcy molekülünün simetrik disülfitleri olan homosistini ya da serbest sistein ile Hcy'nin karışık disülfitlerini içerir. Bunun aksine protein bağlı Hcy, serbest sistein içeren plazma proteinleri ile Hcy'nin karışık disülfitlerini içerir. Total Hcy konsantrasyonu plazmada var olan tüm Hcy türleri anlamına gelir.¹⁰³

2.4.2. Homosistein metabolizması

Hcy metiyonin metabolizmasının son ürünüdür. Remetilasyon ve transsülfürasyon yollarıyla metabolize olur. Remetilasyon yolağıyla Hcy tekrar metiyonine, transsülfürasyon yolağıyla da sistatyonine daha sonra da sistein ve taurine yıkılır (Şekil 2.). Bir non protein aminoasit olmasına rağmen çok önemli süreçlerde yer alır: sistein ve glutatyon sentezi; kolin ve betainin katabolizması; hücre içi FA'in geri dönüşümü gibi.¹⁰⁴ Hücresel metiyonin protein sentezinde kullanılır veya S-adenozil metiyonine (SAM) dönüştürülebilir. Bu reaksiyon metiyonin adenoziltransferaz (MAT) tarafından katalizlenir ve ATP'ye ihtiyaç duyar.¹⁰⁵ MAT aktivitesi hücre içi SAM düzeyleriyle sıkı kontrol edilir. SAM vücutta, özellikle merkezi sinir sisteminde son derece önemli role sahiptir (metil grubu vericisi olarak; kreatinfosfatidilkolin ve hücre büyümesi ve gen ekspresyonu için gerekli poliaminlerin sentezi ve sistein ve glutatyon sentez öncülü gibi). Metil grubunu kaybeden SAM, S-adenozilhomosisteine dönüşür (SAH). SAH ise daha sonra homosistein ve adenozone hidroliz olur.¹⁰⁶

Metiyoninin, Hcy'den yeniden sentezi (rejenerasyonu) iki farklı metiltransferaz tarafından katalizlenir. Karaciğer ve böbrekte lokalize betain: homosistein metiltransferaz (BHMT) ve hemen hemen tüm vücut hücrelerinde bulunan metiyonin sentaz (MS, 5-metil-tetrahidrofolat: homosistein metiltransferaz). Birinci enzim BHMT, betaini metil donörü olarak kullanır. FA ve vitamin B₁₂ eksikliğinde bu yol metiyoninin doku konsantrasyonunun devamını sağlar. MS ise metiltetrahidrofolattan metil grubu transferini sağlar. MS yoluyla remetilasyon kofaktör olarak metilkobalamine ihtiyaç duyar.¹⁰⁷ Kobalamine bağlı bu remetilasyon, folat döngüsü ile vitamin B₁₂ metabolizmasını birbirine bağlar. Bu enzimin

Metabolik yol: **DİYET** → **Metionin**

Metionin → **S-Adenozil-Metionin** (Enzim: **MAT**, **ATP** → **PPi**)

S-Adenozil-Metionin → **Metillenmiş ürünler (kratin gibi)** (Enzim: **A**)

S-Adenozil-Metionin → **S-Adenozil-Homosistein** (Enzim: **SAH-hidrolaz**, H_2O → **Adenosin**)

S-Adenozil-Homosistein → **Homosistein**

Homosistein → **Sistatyonin** (Enzim: **CBS**, **B6**)

Sistatyonin → **Sistein** (Enzim: γ -Sistatyonaz (vitamin-B₆ bağımlı)) → α -Ketobütirat + NH_4

Homosistein → **Metionin** (Enzim: **BHMT**, **Betain**, **N-N-Dimetil-Glisin**)

Metionin → **Metillenmiş ürünler (kratin gibi)** (Enzim: **MAT**, **ATP** → **PPi**)

Metionin → **5,10-Metilen THF** (Enzim: **MS B12**)

5,10-Metilen THF → **5-Metil THF** (Enzim: **B**)

5-Metil THF → **THF** (Enzim: **B**)

THF → **Metionin** (Enzim: **B**)

THF → **Serin**

Serin → **Metionin**

Metionin → **Glisin**

Glisin → **Metionin**

57

2.4.3. Hiperhomosisteinemi (HHcy) ve Nedenleri

HHcy anormal artmış total Hcy (tHcy) düzeylerinin varlığını tanımlamak için kullanılan terminolojidir. Klinik çalışmaların çoğunda Hcy, tHcy olarak ölçülmüştür. tHcy plazma veya serumdaki tüm Hcy formlarını içerir. tHcy, proteine bağlı Hcy, serbest Hcy, Hcy tiyolakton ve Hcy ile ilişkili disüflitleri içerir. Kaynaklar arasında farklılık olmakla birlikte normal plazma tHcy konsantrasyonu açlıkta 5-12 $\mu\text{mol/L}$ olarak kabul edilmektedir.¹¹⁰ Bununla birlikte 12-30 $\mu\text{mol/L}$ arasındaki konsantrasyonlar hafif HHcy, 30-100 $\mu\text{mol/L}$ arasındaki konsantrasyonlar orta HHcy ve >100 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonlar ise ağır HHcy olarak ifade edilmektedir.¹¹¹

Tablo 8. Hiperhomosisteinemi nedenleri.¹¹¹

Hiperhomosisteinemi nedenleri
1. Hafif Hiperhomosisteinemi (12-30 µmol/L): Genel toplumda yaygın görülür (özellikle yaşlılarda)
1.1. Sistatyonin-β-sentaz'da heterozigot defektler
1.2. Metilentetrahidrofolat redüktaz geninde C677T homozigotluğu
1.3. Böbrek yetmezliği
1.4. Böbrek transplantasyonu
1.5. Hafif folat eksikliği
1.6. Hafif Vit B ₁₂ eksikliği
1.7. Vitamin B ₆ eksikliği
1.8. Hipotiroidizm
1.9. Alkolizm
1.10. İlaçlar (niasin, fibrat, metotreksat, izoniazid, levodopa, teofilin, fenitoin, nitröz oksit, trimetoprim)
2. Orta Hiperhomosisteinemi (30-100 µmol/L)
2.1. Son dönem böbrek yetmezliği
2.2. Orta derecede vitamin B ₁₂ eksikliği
2.3. Ağır folat eksikliği
3. Ağır Hiperhomosisteinemi (>100 µmol/L)
3.1. Kalıtsal homosistinüri (sistatyonin-β-sentaz, Metilentetrahidrofolat redüktaz ve metiyonin metabolizmasıyla ilgili diğer enzimlerde homozigot mutasyonlar)
3.2. Vitamin B ₁₂ kullanımıyla ilgili kalıtsal metabolik hastalıklar
3.3. Ağır vitamin B ₁₂ eksikliği

2.4.4. Hiperhomosisteineminin Patofizyolojik Mekanizması

1969 yılında McCully 'nin çalışmasının ⁹⁶ ardından çok sayıda bilim adamı HHcy ile vasküler hastalıklar arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarla Hcy'nin patofizyolojik mekanizmalarının aydınlatılmasında yol gösterici olmuştur. Bu

çalışmalarda Hcy'nin endotel disfonksiyonuna etkisinin olduğu gösterilmiştir. Endotel hücresel vazokonstriksiyon ve vazodilatasyonun regölasyonuyla ilgili çeşitli molekülleri sentezler ve salarlar.¹¹² Endotel kaynaklı vazokonstriktör maddeler tromboksan A2, prostoglandin H1 ve Endotelin 1'dir. Vazodilatatörler ise nitrik oksit (NO) ve prostasiklidir.¹¹³ HHcy çeşitli mekanizmalarla endotel disfonksiyonuna aracılık eder:

- HHcy endotelyum kaynaklı NO biyoaktivitesini azaltabilir: HHcy varlığında NO süperoksit radikali ile etkileşerek güçlü bir oksidan olan peroksinitriti ($OONO^-$) oluşturur. $OONO^-$ vasküler disfonksiyonun önemli bir mediatörü olan poli(ADP-riboz) polimerazı aktive eder.¹¹⁴ Aynı zamanda $OONO^-$, NO sentaz (eNOS) için önemli bir kofaktör olan tetrahidrobiyopterin oksidize edebilir. Bu da eNOS aktivitesini veya elektronların NO Oluşturmak üzere L-arjinine aktarılmasından çok O^- oluşturmak üzere moleküler oksijene aktarıldığı eNOS-ayrışmasını azaltır. Dahası HHcy, endojen eNOS inhibitörü olan asimetrik dimetil arjinin (ADMA) düzeylerini artırarak, NO'nun biyoyararlanımını azaltır.¹¹⁵
- Hcy oksidatif stres ve reaktif oksijen türlerinde (ROS) artışa neden olur: Artmış Hcy düzeyleri ekstraselüler süperoksit dismutaz (EC-SOD) gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini ve ekspresyonunu, endotelial heparan sülfat proteoglikan'ın yıkımında stimölasyona yol açarak inhibe eder.¹¹⁶ Dahası vasküler O^- kaynağı enzim sistemlerinin (ksantin oksidaz, siklooksijenaz, NOS ve NAD(P)H oksidaz gibi) aktivitelerini artırır.^{117,118,119}

- HHcy inflamatuvar kaskadın bileşenlerini upregüle eder: Hcy nükleer faktör-B (NF-B)'yı aktive eder ve sitokinlerin (tümör nekroz faktör- α , TNF- α gibi) aşırı ekspresyonuna neden olarak vazokonstriksiyon inhibisyonuna yol açar ve dolayısıyla endotel fonksiyonları bozulur.¹²⁰ TNF- α aynı zamanda NAD(P)H oksidaz aktivitesini artırarak yüksek Hcy konsantrasyonlarında süperoksit düzeylerini artırır.¹²¹

2.4.5. Homosistein ve Başağrısı Sendromları

Migren atakları, kranial kan damarlarının tekrarlayan vasküler inflamasyonu eşliğinde gelişir. Migrende çeşitli nöropeptidler ve sitokinler vazomotor değişiklikler ve nöroinflamatuvar süreçlerde görev alır. Migrende tekrarlayan ataklar nedeniyle kranial damarların inflamatuvar arteriopati riski taşıdıkları düşünülmektedir.¹²²

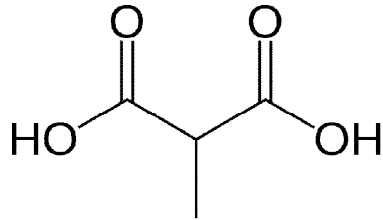
Migren genetik ve çevresel faktörlerin eşlik ettiği kompleks nörolojik bir hastalıktır. Migrende (özellikle de auralı migrende) MTHFR C677T alel varyantına sık rastlandığını gösteren çalışmalar vardır. Kowa ve arkadaşları Japon bireylerde auralı migren ile MTHFR C677T varyantı arasında pozitif ilişki rapor etmişlerdir.¹²³ Kara ve arkadaşları da ¹²⁴ yaptıkları vaka kontrol çalışmasında Türk populasyonunda migrenli hastalarda C677T varyantı rapor etmişlerdir. Lea ve arkadaşları ise ¹²⁵ beyaz ırkta me C677T varyantı ile auralı migrene (aurasız değil) yatkınlık arasında ilişki bulmuşlardır. Migrenli hastalarda düşük FA diyetiyle birlikte homozigot MTHFR C677T mutasyonunun birlikte varlığının HHcy için risk oluşturduğu bulunmuştur. Bu ilişkinin önemi hem patofizyolojik hem de terapötik perspektifte önem kazanır.¹²⁶

2.5. Metilmalonik Asit

Metilmalonik asit (MMA), metilmalonik asidemi (görölme sıklığı 1:48 000 canlı doğum) olarak bilinen bir grup kalıtsal hastalık için özgül tanı koydurucu bir belirteçtir. Metilmalonik asideminin sonradan kazanılan nedenleri ise daha sık görölür.¹²⁷ Plazma ve idrarda artmış MMA, bağırsaklara bağılı malabsorbsiyon, bozulmuş sindirim veya yetersiz beslenmeye bağılı vitamin B₁₂ eksikliklerinde görölür. Aynı zamanda renal yetmezlik, hipovolemi ve ince bağırsakta aşırı bakteri çoğalması da metilmalonik asidemi veya asidürinin sonradan kazanılan nedenleri arasında sayılabilir.¹²⁸

2.5.1. Metilmalonik Asit Biyokimyası

MMA, düşük molekül ağırlıklı (118 g/mol), doymuş, oldukça polar, plazma proteinlerine bağlanmayan bir dikarboksilik asittir (Şekil.11).



Şekil 11. Metilmalonik asitin iskelet formölü.

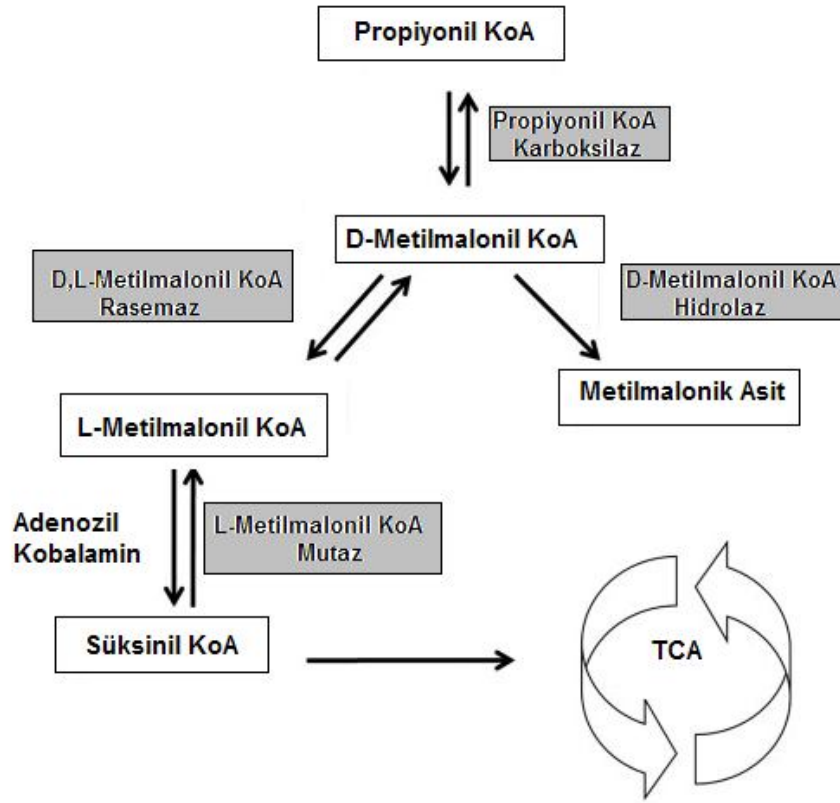
2.5.2. Metilmalonik Asit Metabolizması

MMA'nın hücre içi öncül molekülü D-metilmalonil KoA'dır. D-Metilmalonil KoA valin, izolösin, treonin ve metiyonin gibi aminoasitlerin, tek karbonlu yağ asitlerinin, kolesterol ve timidinin metabolik yollarının kesişme noktasında yer alan bir moleküldür. Bunların karbon iskeletleri trikarboksilik asit döngüsünün bir ara ürünü olan süksinil KoA vermek üzere yıkılır.¹²⁹

Metiyonin, metil grubunu SAM aracılığıyla bağışlar ve dört karbon atomundan üçü propiyonil KoA olarak propiyonata dönüştürülür. İzolösin son ürün olarak bir molekül asetil KoA, bir molekül propiyonil KoA oluşturmak üzere önce transaminasyona sonra da oksidatif dekarboksilasyona uğrar. Valin de benzer şekilde transaminasyon ve dekarboksilasyondan sonra geri kalan karbon iskeleti bir seri oksidasyon reaksiyonu ile metilmalonil KoA'ya dönüştürülür. Treonin, propiyonil KoA'ya dönüştürülür. Tüm bu moleküllerin metabolizmaları sırasında oluşan propiyonil KoA, propiyonil KoA karboksilaz tarafından önce D-metilmalonil KoA'ya bu molekül de metilmalonil KoA rasemaz tarafından L-metilmalonil KoA'ya dönüştürülür. Epimerize olan L-metilmalonil KoA ise metilmalonil KoA mutaz (MCM) ile süksinil KoA'ya çevrilir.

Tek sayıda karbon atomu içeren yağ asitleri karboksil ucundan oksidize olur ve β -oksidasyondan sonra kalan 5 karbonlu yapı asetil KoA ve propiyonil KoA'ya dönüşür. Asetil KoA direkt TCA'ya girerken propiyonil KoA, L-metilmalonil KoA ve ardından MCM ile süksinil KoA'ya dönüşür. Bu reaksiyon adenzil kobalamin bağımlı bir reaksiyondur. Kobalamin eksiklik durumlarında D-metilmalonil KoA, D-

metilmalonil KoA hidrolazın katalizlediği bir reaksiyonla geri dönüşümsüz olarak metilmalonik asite dönüşür (Şekil 12) .



Şekil 12. Metilmalonik asit oluşum yolağı. Kobalamin eksiklik durumlarında yolak sağ tarafa kayarak MMA'yı geri dönüşümsüz olarak oluşturur.

2.5.3. Metilmalonik Asidemi Nedenleri

Normal koşullar altında MMA fizyolojik sıvılarda çok düşük konsantrasyonlarda bulunur. Metilmalonik asidemi bir organik asit metabolizması bozukluğudur. Metilmalonil KoA'nın süksinil KoA'ya dönüşümünün blokajı nedeniyle kan ve idrarda metilmalonik asit birikimiyle karakterize otozomal resesif geçişli hastalıktır.¹³⁰ Metilmalonik asidüriye neden olan genetik mutasyonlar arasında L-Metilmalonil KoA mutaz

mutasyonu, 5' adenzilkobalamin sentez bozukluğu, D-metilmalonil KoA'nın, L-metilmalonil KoA'ya dönüşümünü sağlayan rasemaz enzim mutasyonu yer alır.¹²⁹

MMA'nın kanda belirgin artışı ile bu hastalık gruplarında ketoasidoz, letarji ve koma görülür. Uzun dönem metabolik bozukluklar fiziksel ve mental geriliğe neden olur. Ensefalopatiyle birlikte bazal ganglionlarda simetrik nekrotik lezyonlar oluşur.¹³¹

Vitamin B₁₂ eksikliği de, adenzilkobalaminin metilmalonil KoA mutazın kofaktörü olması nedeniyle, kanda MMA birikmesine neden olur. Vitamin B₁₂ eksikliğinde serum vitamin B₁₂ düzeylerindeki azalma ölçülebilir hale gelmeden önce serum ve idrar MMA konsantrasyonlarında artış meydana gelir. Bu nedenle MMA, doku düzeyindeki vitamin B₁₂ eksikliğini göstermesi açısından son derece önemli bir belirteçtir.¹³⁰

2.5.4. Metilmalonik Asit ve Nörolojik Hasar

Beyin dokusu özellikle vitamin B₁₂ ve FA eksikliklerine duyarlıdır. Miyelin ve nörotransmitterler gibi nöroaktif maddelerin transmetilasyonu bu vitaminlerin eksikliğinde bozulur.¹³² Vitamin B₁₂ eksiklik belirteci olan MMA, MCM mutasyonları ve vitamin B₁₂ eksiklikleri gibi biriktiği durumlarda, nörolojik hasara neden olabilir. MMA beyinde nörotoksik etkiye sahiptir. Yapılan çalışmalarda MMA'nın *in vitro* şartlarda süksinat dehidrogenazı, β-hidroksibütirat dehidrogenazı, solunum zinciri komplekslerini inhibe ettiği, karbondioksit üretimini ve oksijen tüketimini azalttığı ve laktat üretimini artırdığı ve adenzin trifosfat (ATP)/adenozin

difosfat (ADP) oranını azalttığı gösterilmiştir.¹³³ Bunların yanında MMA'nın in vitro şartlarda beyinde serbest radikal aracılı mekanizma ile Na, K-ATPase'ı inhibe ettiği de gösterilmiştir.¹³² Ayrıca MMA'nın serebral korteks hücre iskelet proteinlerinde fosforilasyonu artırarak nörotoksik etki gösterebileceği de vurgulanmıştır.¹³⁴

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Bölümü ve Nöroloji Kliniği katkılarıyla gerçekleştirildi. Çalışma için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu'ndan bilimsel araştırma izni alındı. Bu çalışma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından 01/2011-59 proje numarasıyla desteklendi. Çalışmaya dahil edilen hastalar çalışma içeriği konusunda bilgilendirildikten sonra onam formları dolduruldu.

3.1. Hasta ve Kontrol Grupları

Çalışmaya S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji Polikliniği'ne başvuran, IHS'nın ICHD-2 ⁷ kriterlerine göre migren (auralı ve aurasız) ve gerilim tipi baş ağrısı tanısı almış olan hastalar dahil edildi. Hasta grubu, 51 migren (30 aurasız migren ve 21 auralı migren) ve 15 gerilim tipi baş ağrısı hastasından oluşturuldu. Kontrol grubu ise nöroloji polikliniğine başvuran, ancak klinik muayene sonrasında herhangi bir nörolojik hastalık tespit edilmeyen 25 hastadan oluşturuldu. Hastalar kapsamlı bir nörolojik ve fizik muayeneden geçirildi. Hasta ve kontrol gruplarına ait demografik bilgiler Tablo 9'da verilmektedir.

Herhangi bir vitamin preparatı kullanan, hematolojik veya otoimmün hastalık, kronik böbrek yetmezliği, karaciğer hastalığı, hipertansiyon, diyabet ve koroner arter hastalığı olan kişiler çalışmaya dahil edilmedi.

Tablo 6. Hasta ve kontrol gruplarına ait demografik bilgiler.

	Aurasız Migren (n=30)	Auralı Migren (n=21)	Gerilim Tipi Baş ağrısı (n=15)	Kontrol (n=25)
Hasta sayısı (n)	30	21	15	25
Cinsiyet				
Kadın (%)	27 (%90)	17 (%81)	8 (%53)	16 (%64)
Erkek (%)	3 (%10)	4 (%19)	7 (%47)	9 (%36)
Yaş, yıl				
M (aralık)	38 (25-51)	39 (16-47)	38 (22-47)	37(17-47)
Baş ağrı süresi, yıl				
M (aralık)	7 (1-28)	3.5 (1-10)	5 (1-10)	-
Baş ağrı sıklığı, gün/ay				
M (aralık)	4 (1-30)	3.5 (1-30)	15 (2-30)	-
Sigara kullanımı (%)	%17	%40	%27	%36
Alınan tedaviler	Atak tedavisi ^{&} (%40) Antikonvulsan tedavi ^{\$} (%20) Beta blokör tedavi [#] (%7) Antidepresan tedavi [†] (% 33) Antipsikotik tedavi [‡] (%3) İlk tanı (%7)	Atak tedavisi (%65) Antikonvulsan tedavi (%15) Antidepresan tedavi (%15) İlk tanı (%10)	Atak tedavisi (%27) Antikonvulsan tedavi (%20) Antidepresan tedavi (%33) İlk tanı (%27)	

*M=Medyan; aralık= minimum ve maksimum değerler.

[&]: nonsteroid antienflamatuvar, parasetamol, triptan, elatriptan; ^{\$}: sodyum valproat, topiramet, pregabalın; [#]: propranolol; [†]: amitriptilin, venlafaksin, duloksetin, bupropion, setralin; [‡]: quetiapin.

3.2. Örnek Alınışı ve Hazırlanışı

Migren, gerilim tipi baş ağrısı tanısı alan hastalardan muayenelerini takiben analiz için kan örnekleri alındı.

Serum vitamin B₁₂, FA, Holo-TC, Hcy, MMA, glikoz, üre ve kreatinin, AST, ALT ölçümleri için örnekler, 12 saatlik gece açlığını takiben sabah aç olarak, serum ayıraç jelli, pıhtı aktivatörlü BD Vacutainer® SSTII Plus plastik (Becton Dickinson) tüplere alındı. Tam kan sayımı, eritrosit içi folik asit ve vitamin B₆ ölçümü için örnekler BD Vacutainer® plastik K₂-EDTA içeren tam kan tüplerine alındı. Homosistein ve vitamin B₆ için alınan örnekler ışıktan korumak adına alüminyum folyo ile sarıldı.

Serumda çalışılacak parametreler için örnekler 30 dakika içinde 1500 xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Plazmalar ise örnekler alındıktan sonra 1500 xg'de 5 dakika santrifüj edilerek ayrıldı. Elde edilen örneklerden üre, kreatinin, AST, ALT, vitamin B₁₂ ve FA ölçümleri aynı gün maksimum iki saat içinde gerçekleştirildi. Holo-TC, Hcy, MMA ve vitamin B₆ ölçümleri için serum ve plazma örnekleri ayrıldıktan sonra çalışma gününe kadar -80 °C'de saklandı.

EFA, K₂-EDTA içeren tüplere alınan tam kan örneğinden çalışıldı. Hazırlanan hemolizat örnekleri çalışma gününe kadar -80 °C'de saklandı.

3.3. Kullanılan Ayıraçlar ve Cihazlar

- Glikoz, üre, kreatinin, AST ve ALT düzeyleri ticari Beckman Coulter kitleri kullanılarak Beckman Coulter AU 2700 (Mihsima Olympus Co. Ltd. Japan) otoanalizörüyle çalışıldı.
- Vitamin B₁₂, FA ve EFA düzeyleri ticari ADVIA Centaur kitleri kullanılarak ADVIA Centaur XP (Siemens Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) immünokimya otoanalizörüyle çalışıldı.
- Holo-TC (Aktif-B12), mikropartikül enzim immün ölçüm (MEIA) yöntemiyle Abbott AxSYM Plus İmmünokimyasal Analizörü (Abbott Laboratories Inc., USA) ile ölçüldü.
- Hcy ve vitamin B₆ ölçümleri ticari Chromsystems (Chromsystems GmbH, München, Germany) kitleri ile Agilent 1100 HPLC series (Agilent Technologies, Germany) HPLC sisteminde gerçekleştirildi.
- MMA, ClinMass[®] Complete Kit for Methylmalonic Acid (RECEIPE Chemicals + Instrument GmbH, Germany) kiti ile kütle spektrometrik yöntemle Zivak[®] Technologies TandemGOLD elektrosprey iyonizasyon sıvı kromatografi/ kütle spektrometri/ kütle spektrometri (ESI LC/MS/MS) (ZIVAK Teknolojileri San. Ve Tic. Ltd. Şti, Türkiye) sisteminde çalışıldı.

- Tam kan sayımı, Coulter® LH780 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) hematoloji analizöründe gerçekleştirildi.

3.4. Kullanılan Yöntemler

3.4.1. Glikoz, Üre, Kreatinin, AST, ALT Düzeylerinin Ölçüm Yöntemleri

- Glikoz, enzimatik hekzokinaz yöntemiyle çalışıldı. Yöntemde glikoz, ATP ve magnezyum iyonları varlığında hekzokinaz tarafından glikoz-6-fosfata fosforillenir ve ADP oluşur. Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz ise glikozu spesifik olarak 6-fosfoglikonata oksidize ederken NAD^+ ise NADH 'a indirgenir. 340 nm'deki absorbans artışı glikoz konsantrasyonu ile orantılıdır.
- Üre, su ve üreaz varlığında amonyak ve karbondioksit oluşturarak hidroliz olur. İlk reaksiyonda açığa çıkan amonyak, glutamat dehidrogenaz varlığında 2-oksoglutarat ile birleşerek glutamat oluşturur. Reaksiyon ortamında var olan NADH ise, NAD 'ye oksidize olur. Birim zaman başına 340 nm'deki absorbans azalışı üre konsantrasyonu ile orantılıdır.
- Kreatinin alkali ortamda pikrik asitle sarı-turuncu bir renk oluşturur. 520/800 nm'deki değişim hızı örnekteki kreatinin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

- ALT, alanindeki amino grubunu piruvat ve glutamat oluşturacak şekilde 2-oksoglutarata aktarır. Piruvat, LDH ile katalizlenen bir reaksiyonla laktat oluşturur. Bu arada reaksiyon ortamında var olan NADH, NAD'ye oksitlenir. NADH tüketimi nedeniyle 340 nm'deki absorbans düşüşü örnekteki ALT aktivitesiyle orantılıdır.
- AST, aspartat ve 2-oksoglutaratın transaminasyonunu katalizler ve L-glutamat ile oksaloasetat oluşur. Oksaloasetat malat dehidrogenaz tarafından L-malata indirgenirken reaksiyon ortamındaki NADH 'da NAD'ye okside olur. NADH tüketimi nedeniyle 340 nm'deki absorbans düşüşü örnekteki AST aktivitesiyle orantılıdır.

3.4.2. Vitamin B₁₂, Folik Asit ve Eritrosit İçi Folik Asit Ölçüm Yöntemleri

- Vitamin B₁₂ ve FA, direkt kemilüminesan teknolojisinin kullanıldığı, yarışmalı immünokimyasal ölçüm yöntemiyle ölçüldü. Hasta örneğindeki vitamin B₁₂ ve folik asit molekülleri akridinyum ester işaretli vitamin B₁₂, solid fazda paramagnetik partiküllere kovalent olarak bağlanmış olan sınırlı sayıdaki saflaştırılmış intrinsik faktör bağlanma bölgeleri için yarışır. Benzer şekilde folik asitte, solid faza biyotin ile kovalent olarak bağlanan folik asit bağlayıcı protein bölgeleri için yarışır. Her iki ölçümde de hasta örneğinde vitamin B₁₂ ve folik asit bağlayıcı proteinlere bağlı molekülleri serbestleştirmek için serbestleştirici ayıraç (sodyum hidroksit) ve DTT kullanılır. Kemilüminesan ışımayı oluşturmak için reaksiyonlar sonunda ortama asit-baz çözeltisi ilave edilir. Örnekteki vitamin B₁₂

ve folik asit konsantrasyonu ile sistem tarafından ölçülen relatif ışık ünitesi (RLU) ters orantılıdır.

- EFA, serum FA ölçümü için kullanılan yöntem ile çalışıldı. K₂EDTA içeren tüplere alınan tam kan örnekleri birkaç kez altüst edildi. Firma tarafından sağlanan ticari askorbik asit çözeltisinde 1 mL alındı. Bunun üzerine 50 µL tam kan örneği konuldu. Tüpler yavaşça altüst edildikten sonra oda sıcaklığında 1 saat karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Elde edilen hemolizat çalışma gününe kadar -80 °C'da saklandı.

Sonuçlar;

$$\text{EFA (ng/mL): } \frac{\text{Hemolizat FA sonucu (ng/mL)} \times 21}{\text{Hematokrit (\%)}} \times 100$$

formülüyle hesaplandı. Ayrıca eritrosit içi folik konsantrasyonu hem tam kan hem de serum folik asit konsantrasyonunu içerdiğinden geleneksel hematokrit düzeltme yöntemi kullanılarak Düzeltilmiş Eritrosit İçi FA (DEFA) olarak yeniden hesaplandı¹³⁵ Hesaplama;

$$\text{DEFA (ng/mL): } \frac{\text{Tam kan FA} - [\text{serum FA (100-Hematokrit (\%))}]}{\text{Hematokrit (\%)}}$$

formülü kullanıldı.

3.4.3. Holo-TC (Holotranskobalamin, Aktif B₁₂) Ölçüm Yöntemi.

AxSYM Aktif-B₁₂ testi, mikropartikül enzim immünokimyasal ölçüm teknolojisiyle ölçüldü. Yöntemde örnekteki Holo-TC molekülleri, mikropartiküllere bağlı olan monoklonal aktif B₁₂ antikorlarına bağlanırlar. Oluşan Antijen-Antikor kompleksi, alkale fosfataz işaretli Anti-TC antikoruna ile muamele edildikten sonra, ortama 4-metilumbelliferil fosfat ilave edilir. Alkale fosfata işaretli konjugat, substrattan fosfat grubunun uzaklaştırılmasını katalizler. Oluşan florofor 4-metilumbelliferon, MEIA optik sistemi tarafından ölçülür.

3.4.4. Homosistein Ölçüm Yöntemi

Hcy ölçümü hızlı, kolay ve özgül total homosistein ölçümüne olanak sağlayan, floresan saptama yöntemi ile isokratik HPLC sisteminde gerçekleştirildi. Örnek hazırlama protokolü sırasında, indirgeme basamağı ile protein bağlı Hcy proteinlerden ayrılması sağlandı ve çöktürme işleminden sonra prekolon derivatizasyon işlemi gerçekleştirildi. Kromatografik saptama, floresan dedektörü olan isokratik HPLC sisteminde yapıldı.

Cihaz ayarları:

Enjeksiyon hacmi : 25 µL
HPLC pompası : Mobil faz akış hızı 1.5 mL/dakika
Kolon sıcaklığı : Oda sıcaklığı
Floresan dedektör : Eksitasyon 385 nm, Emisyon 515 nm

Kolon bağlanmadan önce sistem 30 mL mobil faz ile (akış hızı 1.5 mL/dakika olacak şekilde) yıkandı. Kolon bağlandıktan sonra sistemin dengeye ulaşması için akış hızı 1.5 mL/dakika olacak şekilde baseline stabil olana kadar (yaklaşık 20 dakika) akış verildi. Ardından hazırlanan kalibratörler ardışık verilerek örtüşen kromatogramlar elde edildikten sonra hazırlanan kontrol ve hasta örnekleri sisteme yüklendi.

Örnek hazırlama protokolü

- 100 µL serum örneği ışık koruyucu vial pipetlendikten sonra, üzerine 25 µL internal standart, 75 µL indirgeyici ayıraç ilave edildi. 2 sn vortekslendikten sonra 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- 100 µL çöktürücü ayıraç ilave edilip 30 sn vortekslendi.
- Örnekler 5 dakika 9000 xg'de santrifüj edildi.
- İkinci bir ışık korucu vial 100 µL derivatizasyon karışımı (birinci derivatizasyon ayırıcı, 2 mL ikinci derivatizasyon ayırıcı ile çözüldü, 10 dakika içinde kullanıldı), pipetlendikten sonra üzerine 50 µL hazırlanan süpernatandan ilave edildi.
- Tüm vialler 55 °C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra süratle soğutulup HPLC sistemine yüklendi.

3.4.5. Vitamin B₆ Ölçüm Yöntemi

Vitamin B₆ basit izokratik HPLC yöntemiyle çalışıldı. Bu yöntemde postkolon derivatizasyon işlemi yerine, prekolon derivatizasyonu kullanıldı. Basit örnek çöktürme prosedürü, etkin protein presipitasyonu basamağı ile PLP bağlı formdan serbest hale getirildi.

Sonraki derivatizasyon işlemi ile (60 °C'da, su banyosunda) floresan PLP derivativleri oluşturuldu. Kromatografik saptama, floresan dedektörü olan isokratik HPLC sisteminde yapıldı.

Cihaz ayarları:

Enjeksiyon hacmi : 50 µL
HPLC pompası : Mobil faz akış hızı 1.0 mL/dakika
Kolon sıcaklığı : Oda sıcaklığı
Floresan dedektör : Eksitasyon 320 nm, Emisyon 415 nm
Retansiyon zamanı : 4. dakika (yaklaşık)

Kolon bağlanmadan önce sistem 30 mL distile su ve ardından 30 mL mobil faz ile (akış hızı 1.3 mL/dakika olacak şekilde) yıkandı. Kolon bağlandıktan sonra sistemin dengeye ulaşması için akış hızı 1.0 mL/dakika olacak şekilde baseline stabil olana kadar akış verildi. Ardından hazırlanan kalibratörler ardışık verilerek örtüşen kromatogramlar elde edildikten sonra hazırlanan kontrol ve hasta örnekleri sisteme yüklendi.

Kalibrasyon standartları, sertifikalı sağlayıcı tarafından sağlanan referans materyale göre izlenebilirdi. Analizin doğruluğu ve tekrarlanabilirliği çalışmada iki düzey kontrol materyali çalışılarak izlendi. Hem kalibratör hem de kontrol örnekleri, plazma örnekleri gibi örnek hazırlama protokolüne uygun hazırlandı.

Örnek hazırlama protokolü

- 200 µL plazma örneği (kalibratör ve kontrol), ışık koruyucu (koyu renkli) vialle pipetlendikten sonra üzerine 300 µL çöktürücü ayırıcı ilave edildi. Karışım 30 sn vortekslendi.
- 10 dakika +4 °C'da inkübasyondan sonra 5 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi.
- 250 µL süpernatant ışık koruyucu vialle transfer edildi.
- Her vialle 250 µL nötralizasyon ayırıcı ilave edildi ve karıştırıldı.
- Her vialle 100 µL derivatizasyon ayırıcı ilave edildi ve karıştırıldı.
- 20 dakika 60 °C'da inkübe edildi.
- Inkübasyondan sonra örnekler soğuk su altında soğutuldu, +4 °C'de 10 dakika inkübe edildi; ardından 13000 rpm'de santrifüj edildi.
- Süpernatant, ışık koruyucu vialle alındıktan sonra HPLC sistemine yüklendi.

3.4.6 MMA Ölçüm Yöntemi

Kullandığımız analitik yöntemde MMA serum örneğinde HPLC'yi takiben elektrospay (ESI) - ardışık (tandem) kütle spektrometri (ESI LC-MS/MS) ile çalışıldı. LC-MS/MS prosedüründen önce örneklerde basit çöktürme prosedürü ile matriks uzaklaştırıldı ve internal standart ilave edildi.

3.4.6.1. ESI LC-MS/MS yöntemi

Kütle spektrometri yöntemi, iyonlarına ayırdıktan sonra molekül hakkında, hem kalitatif (yapısal) hem de kantitatif (moleküler kütle veya konsantrasyon) bilgi sağlayan bir analitik tekniktir. İlgili molekül önce kütle spektrometrenin iyonizasyon kaynağına girer, burada pozitif veya negatif yüklere iyonize olur. İyonlar buradan kütle analizörüne geçerek kütle/yük oranlarına göre (m/z) dedektörün farklı bölgelerine ulaşırlar. Dedektör ile etkileşen iyonlar, kullanılabilir sinyaller oluştururlar, bu sinyaller bilgisayar sistemi tarafından kaydedilir. Bilgisayar m/z oranlarına göre molekülden alınan sinyalleri, nispi sıklıklarını gösteren kütle spektrumu olarak grafiksel olarak düzenleyip verir.¹³⁶

Son yirmi yıldır ESI-MS klinik laboratuvarlarda önemli bir teknik olarak karşımıza çıkmakta ve duyarlı, güçlü ve güvenilir bir yöntem olarak klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. μL örnek hacimlerinde, geleneksel tekniklerle analiz edilemeyen femtomol (fmol, 10^{-15} mol) miktarları, termal olarak dayanıklı, sağlam, kalıcı moleküllerin kantitatif ölçümüne olanak sağlamaktadır. Kütle spektrometrik analizden önce HPLC ile sağlanan güçlü ayrışma ile, HPLC/ESI-MS kompleksi biyolojik örneklerde çeşitli polaritede var olan küçük ve büyük moleküllerin analizinde çok güçlü bir teknik haline gelmiştir. Kütle spektrometrinin ilave ayırma yeteneği ile (ardışık MS, MS/MS) gaz kromatografi kütle spektrometri (GC-MS) tekniğinde derivatıvler oluşturmak için kullanılan karmaşık örnek saflaştırma işlemleri ve prosedürleri daha kolay hale gelmiştir. Otomatize örnek yükleme sistemleri sayesinde LC-MS/MS analizörleri hızlı analiz ve yüksek örnek işleme özelliğiyle önemli bir akış analiz tekniği haline gelmiştir.¹³⁶

3.4.6.2. MMA için örnek hazırlama ve LC-MS/MS cihaz ayarları

LC sistemine kolon bağlanmadan önce kapillerler 1 mL/dakika olacak şekilde 10 mL mobil faz A/B ile yıkandı (Mobil faz A/B= 80:20). Ardından guard kolon ve analitik kolon bağlandı. Sistemin dengeye ulaşması için 0.6 mL/dakika akış hızında yaklaşık 10 mL mobil faz A/B (Mobil Faz A/B=80:20) kolondan geçirildi. Bu işlemten sonra HPLC pompası kapatılarak analitik kolon kütle spektrometreye bağlandı.

Analitik sistem örnek enjeksiyonundan 30 dakika önce dengelendi. Kalibrasyon, kontrol ve hasta örnekleri verilmeden önce iki kez blank enjeksiyonu (Mobil Faz A ile) yapıldı.

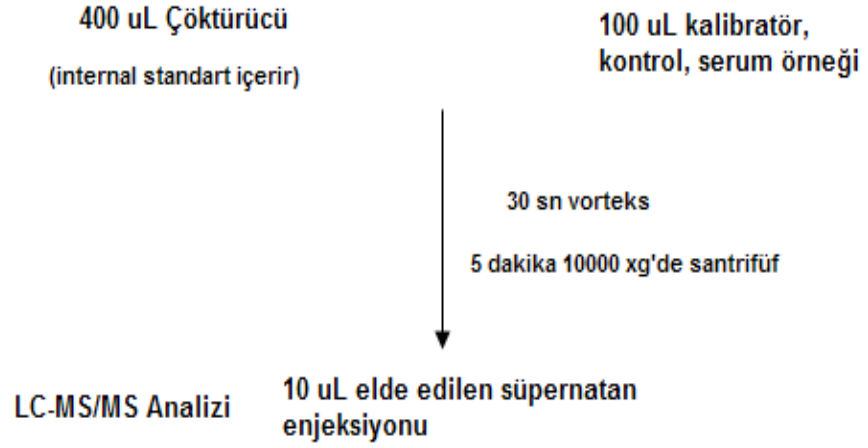
Test kalibrasyonu için 4 düzey kalibrasyon seti (ClinCal[®]) kullanıldı. Kalibratörler çözüldükten sonra hasta örnek hazırlama protokolü ile hazırlanarak sisteme yüklendi. Her analiz serisinde taze hazırlanmış kalibratörler kullanıldı.

Testin doğruluk kontrolü iki farklı konsantrasyonda kontrol materyali (ClinCheck[®]) kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol örnekleri çözüldükten sonra hasta örnek hazırlama protokolü ile hazırlanarak sisteme yüklendi. Her analiz serisinde taze hazırlanmış kontroller kullanıldı.

Örnek hazırlama protokolü

MMA ölçümü serum, plazma veya idrar örneklerinde gerçekleştirilebilir. Ancak ölçümde, serum kullanılması, vitamin B₁₂'nin de aynı matrikste ölçülmesi nedeniyle avantajlıdır. Aynı zamanda serum örneklerinin idrar örneklerine göre MMA açısından diyetten daha az etkilenmesi de son derece önemlidir. İdrar örneklerinden elde edilen MMA sonuçlarının değerlendirilmesi için, ayrıca kreatinin çalışmasının yapılması zorunluluğu ve MMA/kreatinin oranına göre değerlendirilmesi dezavantaj olarak görülmektedir.^{137,138}

Şekil 13. Serum MMA örnek hazırlama protokolü.



Cihaz ayarları

LC ayarları

Ejeksiyon hacmi : 10 µL

Enjeksiyon intervali : 4.0 dakika/2.8 dakika

Kolon sıcaklığı : Oda sıcaklığı

Mobil faz akış hızı ve karışımı: HPLC sisteminde mobil faz A/B akış hızı ve karışımı Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Zivak® Technologies TandemGOLD kütle spektrometri sistemine ait LC parametreleri.

Zaman (dakika)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)	Akış hızı (mL/dakika)
0.00	80	20	0.6
0.1	0	100	0.8
2.5	0	100	0.8
3.00	80	20	0.8
3.24	80	20	0.8
3.30	80	20	1.4
3.59	80	20	1.4
4.30	80	20	0.1
5.00	0	100	0.2
5.30	0	100	0.2

MS/MS ayarları

HPLC sisteminde analitik kolon ile gerçekleştirilen kromatografik ayırıştırma işleminden sonra, MMA ESI ile iyonlaştırıldı ve ardışık MS sisteminde (MS/MS) kuantifiye edildi.

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

LC-MS/MS sistemine ait MS/MS parametreleri tablo 11'de ve MMA için kütle geçişleri Tablo 12'de verilmektedir.

Tablo 11. Zivak® Technologies TandemGOLD kütle spektrometri sistemine ait MS/MS parametreleri:

Zivak® Technologies TandemGOLD kütle spektrometri sistemine ait MS/MS parametreleri:	
İyon kaynağı	Turbo-ionspray (TIS) ESI negatif
Q1 ve Q2 rezolüsyonu	Unit (0.7 amu)*
Nebulizer gaz (GS1)	55 psi
Kurutucu (drying) gaz (GS2)	34 psi
Vorteks gaz (curtain gas, CUR)	25 mTorr
Collision gas	2.4mTorr
İyon sprat voltajı	-4500 V
Kurutucu gaz sıcaklığı	350 °C
Interface sıcaklığı	On
Kütle transizyon	Tablo 9.
Dedektör voltajı	1600 V
Spray shield voltajı	-600 V
Sprey odacık sıcaklığı	55 °C
Vorteks gaz sıcaklığı	250 °C
Retansiyon zamanı	3.6 dakika (yaklaşık)

* amu: atomik kütle ünitesi.

Tablo 12. Zivak® Technologies TandemGOLD kütle spektrometri sisteminde MMA için kütle geçişleri.

Madde	Öncül [amu]	Ürün [amu]	Dwell time* [ms]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]	EP [V]
MMA (nicelik)	116.9	73	35	-35	-8	-3	10
MMA (nitelik)	116.9	55	40	-35	-8	-3	10
MMA-d3 (IS)	119.9	76	15	-35	-12	-3	10

*Dwell time: Mili saniyede dedektöre gönderilen molekül sayısı.

3.5. Yöntemlerin Performans Özellikleri

3.5.1. Vitamin B12 ve Folik Asit Ölçüm Yöntemlerinin Tekrarlanabilirliği

Vitamin B₁₂ ve folik asit ölçümlerinin günler arası tekrarlanabilirliği rutin çalışmada kullanılan üç düzey kalite kontrol materyali ölçümlerinin (n=36), geriye dönük iki aylık sonuçları değerlendirilerek hesaplandı.

3.5.2. Homosistein Ölçüm Yönteminin Tekrarlanabilirliği

Homosistein ölçümünün günler arası tekrarlanabilirliği rutin çalışmada kullanılan iki düzey kalite kontrol materyali ölçümlerinin, geriye dönük bir yıllık (n=20) sonuçları değerlendirilerek hesaplandı.

3.5.3. Holo-TC (Aktif B₁₂) Ölçüm Yönteminin Tekrarlanabilirliği

Holo-TC testinin gün içi tekrarlanabilirlik çalışması için firma tarafından sağlanan iki düzey (düşük ve yüksek) Holo-TC içeren kontrol örnekleri kullanıldı. Örnekler her 20 hastada bir 5'er kez çalışılarak ortalama

(x), standart sapma (ss) ve % varyasyon katsayıları (%VK) hesaplandı. Dört çalışmanın ortalama %VK değeri gün içi %VK olarak değerlendirildi.

3.5.4. MMA ölçüm Yönteminin Tekrarlanabilirliği, Doğruluğu, Minimum Saptama Sınırı (LoD) ve Ölçüm Sınırı (LoQ)

3.5.4.1. MMA ölçüm yönteminin tekrarlanabilirliği

MMA testinin çalışma içi tekrarlanabilirliğini değerlendirmek için, iki düzey (düşük ve yüksek) ClinCheck® serum kontrolü kullanıldı. Çalışma içi tekrarlanabilirliğin değerlendirilmesi için örnekler, aynı seride 10 kez çalışıldı. Çalışmalar arası tekrarlanabilirlik için 4 gün 3'erli gruplar halinde ölçümler gerçekleştirildi (n=12). Böylece toplam %VK hesaplandı. Her gün için ayrı olarak konsantrasyon ortalama (x), standart sapma (ss), %VK ve 3 günlük ortalama %VK değerleri hesaplandı.

3.5.4.2. MMA ölçüm yönteminin doğruluğu (geri kazanım)

Geri kazanım çalışması için düşük (A) ve yüksek (B) konsantrasyonda MMA içeren iki havuz hazırlandı. Havuzlar sırasıyla 249 nmol/L ve 745 nmol/L MMA içermekteydi. Havuzlar 1A/1B, 2A/1B, 3A/1B, 1A/2B ve 1A/3B oranlarında karıştırılarak %gerikazanım (recovery) hesaplandı.

3.5.4.3. MMA ölçüm yönteminin minimum saptama sınırı (Limit of Detection, LoD) ve ölçüm sınırı (Limit of Quantitation, LoQ)

MMA ölçüm yönteminin LoD ve LoQ için düşük kontrol örneğinin günler arası çalışılması ile elde edilen standart sapmanın (ss) ortalaması alınarak belirlendi. LoD ss'nin 3 katı, LoQ ise 10 katı alınarak hesaplandı.

3.6. İstatistiksel Analiz

Tanımlayıcı istatistikler [x, sd, standart hata (SH), ortanca, çeyrekler arası aralık (IQR), en küçük ve en büyük değerler] yapıldı. Grupların normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Ölçülen parametrelerin gruplar arası anlamlılıkları gruplar normal dağılım gösteriyorsa ANOVA, göstermiyorsa Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi. Hasta ve kontrol grupları arasındaki karşılaştırmalar gruplar normal dağılım gösteriyorsa student-t testi, normal dağılım göstermiyorsa Mann Whitney-U testi ile yapıldı. Değişkenler arasındaki bağıntı Spearman korelasyon analizi ile değerlendirildi. Analitlerin klinik performanslarını değerlendirilmesinde ROC analizi kullanıldı. Bu işlemler için "SPSS for Windows version 15.00" paket istatistik programı kullanıldı.

4. SONUÇLAR

4.1. Migren (Aurasız + Auralı Migren), Gerilim Tipi Baş ağrısı ve Kontrol Gruplarında Ölçülen Parametreler

Hasta ve kontrol gruplarında ölçülen parametreler ve değerleri Tablo 13'de gösterilmektedir.

Tablo 13. Aurasız migren, auralı migren, gerilim tipi başağrısı ve kontrol grubunda ölçülen parametreler ve değerleri.

Analit (birim)	Aurasız Migren M (aralık) (n=30)	Auralı Migren M (aralık) (n=21)	Gerilim Tipi Başağrısı M (aralık) (n=15)	Kontrol M (aralık) (n=25)
Glukoz (mg/dL)	94 (81-108)	95 (84-106)	95 (76-114)	84 (74-113)
Üre (mg/dL)	26 (17-35)	23 (18-37)	25 (18-41)	24 (14-35)
Krea. (mg/dL)	0.81 (0.61-0.98)	0.76 (0.66-1.04)	0.89 (0.76-1.33)	0.87 (0.72-1.66)
AST (U/L)	19 (11-27)	18 (13-28)	21 (14-35)	23 (14-48)
ALT (U/L)	18 (8-32)	16 (5-42)	15 (10-56)	19 (11-78)
VitB12 (pg/mL)	276 (176-543)	251 (176-920)	321 (208-388)	282 (165-475)
FA (ng/ml)	7.4 (5.1-12.9)	9.5 (5.5-13.7)	8.5 (5.6-15.9)	8 (4.2-13.7)
HEFA (ng/mL Erit. paketi)	307 (175-493)	370 (284-638)	290 (174-517)	392 (200-675)
DEFA (ng/mL Erit. paketi)	446 (236-971)	563 (373-1133)	422 (183-1068)	510 (284-1364)
VitB6 (µg/L)	9 (3.5-26)	8.7 (3.3-15.6)	7.6 (4.9-21)	11 (4-24)
Hcy (µmol/L)	8.5 (4.3-15)	8 (4-22)	9 (5-14)	9 (4-19)
MMA (nmol/L)	297 (48-1980)	221 (55-1354)	485 (35-1204)	116 (43-364)
Holo-TC (pmol/L)	32 (16-74)	26 (15-70)	30 (18-57)	38 (21-89)
Hemoglobin (g/L)	13.8 (10.3-16)	13.5 (10.9-15.8)	14 (9.5-18)	13.4 (10-16)
Hematokrit (%)	39 (30-45)	38 (34-46)	41 (31-51)	39 (32-47)
Ağrı Süresi (yıl)	7 (1-28)	3.5 (1-10)	45 (1-10)	-
Ağrı sıklığı (gün/ay)	4 (1-30)	3.5 (1-30)	15 (2-30)	-

M=Medyan; aralık= minimum ve maksimum değerler.

4.2. Migren (aurasız+auralı), Gerilim Tipi Başağrısı ve Kontrol Gruplarında Ölçülen Parametrelerin Karşılaştırılması

Migren (aurasız+auralı), gerilim tipi başağrısı ile kontrol grupları arasında ölçülen değişkenlerin karşılaştırılması ve tanımlayıcı istatistik değerleri Tablo 14 ve 15’de gösterilmektedir.

Tablo 14. Migren hasta grubu (aurasız + auralı) ile kontrol grubu arasındaki değişkenlerin karşılaştırılması.

		Migren (aurasız+auralı) (n=51)	Kontrol (n=25)	P
Vit B12 (pg/mL)	M (IQR;aralık)	261 (104;176-543)	282 (96;165-475)	0.599
FA (ng/mL)	M (IQR;aralık)	8.2 (4.6;5.1-13.7)	8.0 (4.2;4.2-13.7)	0.486
HEFA (ng/mL)	M (IQR;aralık)	361 (134;175-638)	392 (237;200-675)	0.377
DEFA (ng/mL)	M (IQR;aralık)	490 (280;236-1133)	510 (590;284-1364)	0.555
Vit B6 (µg/L)	M (IQR;aralık)	8.8 (4.7;3.3-25.8)	11 (7.5;4-24)	0.005
Hcy (µmol/L)	M (IQR;aralık)	8.4 (6.2;4.1-22.4)	9 (4.9;4-19)	0.956
MMA (nmol/L)	M (IQR;aralık)	277 (306;48-1980)	116 (141;43-364)	0.014
Holo TC (pmol/L)	M (IQR;aralık)	31 (20;15-74)	38 (14;21-89)	0.912

M=Medyan; IQR= Çeyrekler arası aralık; aralık= minimum ve maksimum değerler.

Ölçülen değişkenlerin Migren (aurasız+auralı) hasta grubu ve kontrol grubu arasında karşılaştırma sonuçlarına göre:

- MMA hasta grubunda (M= 277nmol/L; min.= 48 nmol/L, maks.= 1980 nmol/L) kontrol grubuna göre (M= 116 nmol/L; min.= 43 nmol/L, maks.= 364 nmol/L) anlamlı yüksek bulundu (p=0.014).
- Vitamin B6 ise hasta grubunda (M= 8.8 µg/L; min.= 3.5 µg/L, maks.= 26 µg/L) kontrol grubuna göre (M=11 µg/L; min.= 4 µg/L, maks.= 24 µg/L) anlamlı düşük bulundu (p=0.005).

Tablo 15. Migren hasta grubu (aurasız ve auralı) ile gerilim tipi başağrısı grubu arasındaki değişkenlerin karşılaştırılması.

		Migren (aurasız+auralı) (n=51)	Gerilim tipi başağrısı (n=15)	P
VitB12 (pg/mL)	M (IQR;aralık)	261 (104;176-543)	321 (96;165-475)	0.754
FA (ng/mL)	M (IQR;aralık)	8.2 (4.6;5.1-13.7)	8.5 (6.5;5.6-15.9)	0.176
HEFA (ng/mL)	M (IQR;aralık)	361 (134;175-638)	290 (175;174-517)	0.473
DEFA (ng/mL)	M (IQR;aralık)	490 (280;236-1133)	422 (357;183-1068)	0.344
VitB6 (µg/L)	M (IQR;aralık)	8.8 (4.7;3.3-25.8)	7.6 (3.5;4.9-21)	0.607
Hcy (µmol/L)	M (IQR;aralık)	8.4 (6.2;4.1-22.4)	9.0 (7;5-14)	0.886
MMA (nmol/L)	M (IQR;aralık)	277 (306;48-1980)	485 (758;35-1204)	0.155
Holo-TC (pmol/L)	M (IQR;aralık)	31 (20;15-74)	30 (15;18-57)	0.270

M=Medyan; IQR= Çeyrekler arası aralık; aralık= minimum ve maksimum değerler.

Ölçülen değişkenlerin Migren (aurasız+auralı) ve gerilim tipi başağrısı hasta gruplarında karşılaştırma sonuçlarına göre hiçbir değişkende anlamlı fark yoktu (tüm değişkenler için $p>0.05$).

4.3. Aurasız Migren, Auralı Migren, Gerilim Tipi Başağrısı ve Kontrol Gruplarında Ölçülen Değişkenlerin Karşılaştırılması

Aurasız migren, auralı migren, gerilim tipi başağrısı ile kontrol grupları arasında ölçülen değişkenlerin karşılaştırılması ve tanımlayıcı istatistik değerleri Tablo 16, 17, 18, 19, 20 ve 21’de gösterilmiştir.

Tablo 16. Aurasız migren hasta grubu ile kontrol grubu arasında değişkenlerin karşılaştırılması.

		Aurasız Migren (n=30)	Kontrol (n=25)	P
VitB12 (pg/mL)	M (IQR;aralık)	276 (98;176-543)	282 (96;165-475)	0.483
FA (ng/mL)	M (IQR;aralık)	7.4 (3.8;5.1-12.9)	8 (4.2;4.2-13.7)	0.074
HEFA (ng/mL)	M (IQR;aralık)	307 (160;175-493)	392 (237;200-675)	0.134
DEFA (ng/mL)	M (IQR;aralık)	446 (241;236-971)	510 (590;284-1364)	0.244
VitB6 (µg/L)	M (IQR;aralık)	9.1 (3.9;3.5-26)	11 (7.5;4-24)	0.012
Hcy (µmol/L)	M (IQR;aralık)	8.5 (4.3;4.3-15)	9.1 (4.9;4-19)	0.886
MMA (nmol/L)	M (IQR;aralık)	297 (400;48-1980)	116 (141;43-364)	0.015
Holo-TC (pmol/L)	M (IQR;aralık)	32 (17;16-74)	38 (14;21-89)	0.787

M=Medyan; IQR= Çeyrekler arası aralık; aralık= minimum ve maksimum değerler.

Ölçülen değişkenlerin Aurasız migren grubu ve kontrol grubu arasında karşılaştırma sonuçlarına göre:

- MMA hasta grubunda (M= 297 nmol/L; min.= 48 nmol/L, maks.= 1980 nmol/L) kontrol grubuna göre (M=116 nmol/L; min= 43 nmol/L, maks.= 364 nmol/L) anlamlı yüksek bulundu (p=0.015).
- Vitamin B6 ise hasta grubunda (M= 9.1 µg/L; min.= 3.5, maks.= 26 µg/L) kontrol grubuna göre (M=11 µg/L; min.= 4 µg/L, maks.= 24 µg/L) anlamlı düşük bulundu (p=0.012).

Tablo 17. Auralı migren hasta grubu ile kontrol grubu arasında değişkenlerin karşılaştırılması.

		Auralı Migren (n=21)	Kontrol (n=25)	P
VitB12 (pg/mL)	M (IQR;aralık)	251 (120;176-920)	282 (96;165-475)	0.546
FA (ng/mL)	M (IQR;aralık)	9.5 (5.2;5.5-13.7)	8 (4.2;4.2-13.7)	0.436
HEFA (ng/mL)	M (IQR;aralık)	370 (100;284-638)	392 (237;200-675)	0.832
DEFA (ng/mL)	M (IQR;aralık)	563 (289;373-1133)	510 (590;284-1364)	0.437
VitB6 (µg/L)	M (IQR;aralık)	8.7 (7.4;3.3-15.6)	11 (7.5;4-24)	0.008
Hcy (µmol/L)	M (IQR;aralık)	8.0 (9.5;4-22)	9.1 (4.9;4-19)	0.767
MMA (nmol/L)	M (IQR;aralık)	222 (164;55-1354)	116 (141;43-364)	0.087
Holo-TC (pmol/L)	M (IQR;aralık)	27 (31;15-70)	38 (14;21-89)	0.833

M=Medyan; IQR= Çeyrekler arası aralık; aralık= minimum ve maksimum değerler.

Ölçülen değişkenlerin auralı migren ve kontrol grubu arasında karşılaştırma sonuçlarına göre:

- MMA, hasta grubunda kontrol grubuna göre konsantrasyon değeri açısından yüksek olmasına rağmen, hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı fark yoktu (p=0.087).
- Vitamin B6 düzeyleri ise hasta grubunda (M= 8.7 µg/L; min.= 3.3 µg/L, maks.: 15.6 µg/L) kontrol grubuna göre (M=11 µg/L; min.= 4 µg/L, maks.= 24 µg/L) anlamlı düşük bulundu (p=0.008).

Tablo 18. Gerilim tipi başağrısı hasta grubu ile kontrol grubu arasında değişkenlerin karşılaştırılması.

		Gerilim tipi başağrısı (n=15)	Kontrol (n=25)	P
Vit B₁₂ (pg/mL)	M (IQR;aralık)	321 (95;208-388)	282 (96;165-475)	0.757
FA (ng/mL)	M (IQR;aralık)	8.5 (6.5;5.6-15.9)	8 (4.2;4.2-13.7)	0.080
HEFA (ng/mL)	M (IQR;aralık)	290 (175;174-517)	392 (237;200-675)	0.210
DEFA (ng/mL)	M (IQR;aralık)	422 (357;183-1068)	510 (590;284-1364)	0.226
Vit B₆ (µg/L)	M (IQR;aralık)	7.6 (3.5;4.9-21)	11 (7.5;4-24)	0.013
Hcy (µmol/L)	M (IQR;aralık)	9.0 (7;5-14)	9.1 (4.9;4-19)	0.753
MMA (nmol/L)	M (IQR;aralık)	485 (758;35-1204)	116 (141;43-364)	0.006
Holo-TC (pmol/L)	M (IQR;aralık)	30 (15;18-57)	38 (14;21-89)	0.082

M=Medyan; IQR= Çeyrekler arası aralık; aralık= minimum ve maksimum değerler.

Ölçülen değişkenlerin gerilim tipi başağrısı hasta grubu ve kontrol grubu arasında karşılaştırma sonuçlarına göre:

- MMA hasta grubunda (M= 485 nmol/L; min.= 35, maks.= 1204) kontrol grubuna göre göre (M=116 nmol/L; min= 43 nmol/L, maks.= 364 nmol/L) anlamlı yüksek bulundu (p=0.006).
- Vitamin B₆ ise hasta grubunda (9.2±5.1 µg/L) kontrol grubuna göre (12.6±5.3 µg/L) anlamlı düşük idi (p=0.013).

Tablo 19. Aurasız ve auralı migren hasta grupları arasında değişkenlerin karşılaştırılması.

		Aurasız migren (n=30)	Auralı migren (n=21)	P
Vit B₁₂ (pg/mL)	M (IQR;aralık)	276 (98;176-543)	251 (120;176-920)	0.811
FA (ng/mL)	M (IQR;aralık)	7.4 (3.8;5.1-12.9)	9.5 (5.2;5.5-13.7)	0.811
HEFA (ng/mL)	M (IQR;aralık)	307 (160;175-493)	370 (100;284-638)	0.071
DEFA (ng/mL)	M (IQR;aralık)	446 (241;236-971)	563 (289;373-1133)	0.107
Vit B₆ (µg/L)	M (IQR;aralık)	9.1 (3.9;3.5-26)	8.7 (7.4;3.3-15.6)	0.667
Hcy (µmol/L)	M (IQR;aralık)	8.5 (4.3;4.3-15)	8.0 (9.5;4-22)	0.708
MMA (nmol/L)	M (IQR;aralık)	297 (400;48-1980)	222 (164;55-1354)	0.660
Holo-TC (pmol/L)	M (IQR;aralık)	32 (17;16-74)	27 (31;15-70)	0.410

M=Medyan; IQR= Çeyrekler arası aralık; aralık= minimum ve maksimum değerler.

Ölçülen değişkenlerin aurasız ve auralı migren hasta gruplarında karşılaştırma sonuçlarına göre hiçbir değişkende anlamlı fark yoktu (tüm değişkenler için $p>0.05$).

Tablo 20. Aurasız migren ve gerilim tipi başağrısı hasta grupları arasında değişkenlerin karşılaştırılması.

		Aurasız migren (n=30)	Gerilim tipi başağrısı (n=15)	P
Vit B₁₂ (pg/mL)	M (IQR;aralık)	276 (98;176-543)	321 (95;208-388)	0.810
FA (ng/mL)	M (IQR;aralık)	7.4 (3.8;5.1-12.9)	8.5 (6.5;5.6-15.9)	0.193
HEFA (ng/mL)	M (IQR;aralık)	307 (160;175-493)	290 (175;174-517)	0.157
DEİFA (ng/mL)	M (IQR;aralık)	446 (241;236-971)	422 (357;183-1068)	0.392
Vit B₆ (µg/L)	M (IQR;aralık)	9.1 (3.9;3.5-26)	7.6 (3.5;4.9-21)	0.454
Hcy (µmol/L)	M (IQR;aralık)	8.5 (4.3;4.3-15)	9.0 (7;5-14)	0.865
MMA (nmol/L)	M (IQR;aralık)	297 (400;48-1980)	485 (758;35-1204)	0.243
Holo-TC (pmol/L)	M (IQR;aralık)	32 (17;16-74)	30 (15;18-57)	0.126

M=Medyan; IQR= Çeyrekler arası aralık; aralık= minimum ve maksimum değerler.

Ölçülen değişkenlerin aurasız migren ve gerilim tipi başağrısı hasta gruplarında karşılaştırma sonuçlarına göre hiçbir değişkende anlamlı fark yoktu (tüm değişkenler için $p>0.05$).

Tablo 21. Auralı migren ve gerilim tipi başağrısı hasta grupları arasında değişkenlerin karşılaştırılması.

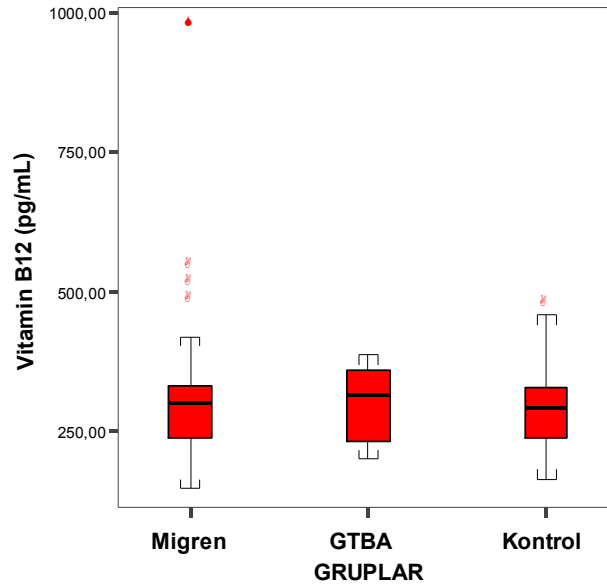
		Auralı migren (n=21)	Gerilim tipi başağrısı (n=15)	P
Vit B₁₂ (pg/mL)	ort±ss M (IQR)	251 (120;176-920)	321 (95;208-388)	0.682
FA (ng/mL)	ort±ss M (IQR)	9.5 (5.2;5.5-13.7)	8.5 (6.5;5.6-15.9)	0.274
HEFA (ng/mL)	ort±ss M (IQR)	370 (100;284-638)	290 (175;174-517)	0.154
DEFA (ng/mL)	ort±ss M (IQR)	563 (289;373-1133)	422 (357;183-1068)	0.042
Vit B₆ (µg/L)	ort±ss M (IQR)	8.7 (7.4;3.3-15.6)	7.6 (3.5;4.9-21)	0.792
Hcy (µmol/L)	ort±ss M (IQR)	8.0 (9.5;4-22)	9.0 (7;5-14)	0.849
MMA (nmol/L)	ort±ss M (IQR)	222 (164;55-1354)	485 (758;35-1204)	0.160
Holo-TC (pmol/L)	ort±ss M (IQR)	27 (31;15-70)	30 (15;18-57)	0.176

M=Medyan; IQR= Çeyrekler arası aralık; aralık= minimum ve maksimum değerler.

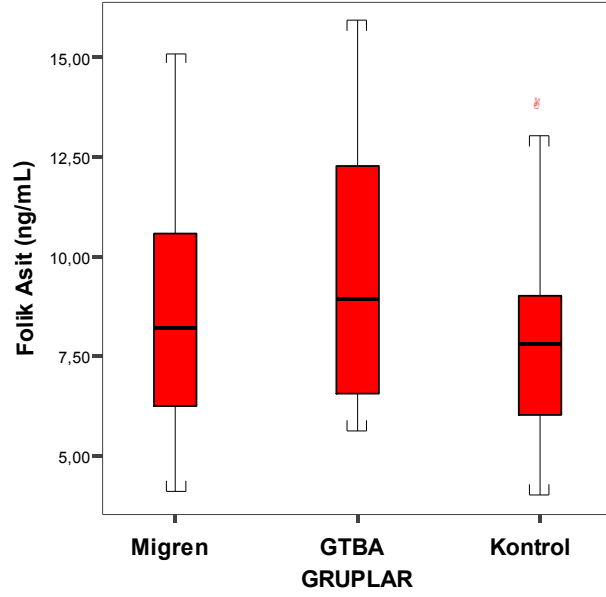
Ölçülen değişkenlerin auralı migren ve gerilim tipi başağrısı hasta gruplarında karşılaştırma sonuçlarına göre sadece DEFA değerleri açısından anlamlı farklılık vardı (p=0.042). Diğer değişkenlerin hiçbirinde anlamlı fark yoktu (tüm değişkenler için p>0.05).

4.4. Migren (Aurasız+Auralı), Gerilim Tipi Başağrısı ve Kontrol Gruplarında Ölçülen Değişkenlerin “Boxplot” Grafikleri

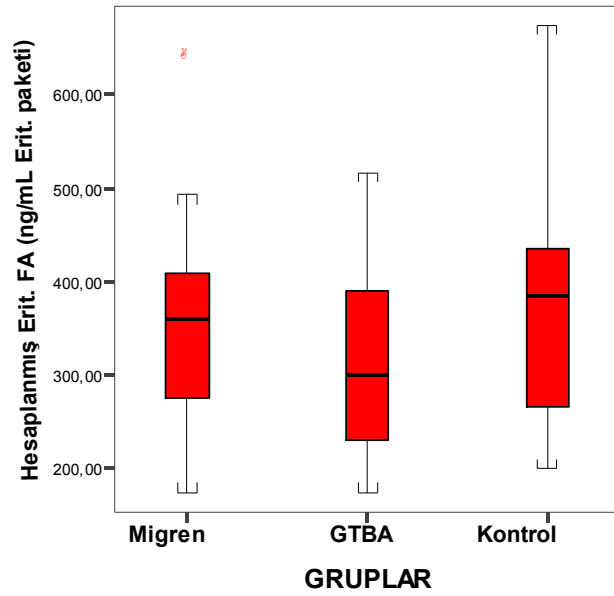
Migren, gerilim tipi başağrısı ve kontrol gruplarında vit B₁₂, folik asit, hesaplanmış eritrosit içi folik asit, düzeltilmiş eritrosit içi folik asit, vitamin B₆, homosistein, MMA ve Holo-TC, düzeylerinin boxplot grafikleri Grafik 1 ile 8 arasında gösterildi. Grafiklerde, kutu, çeyrekler arası aralık (IQR): %25 ile %75.arası, yatay çizgi: ortanca (M), düşey çizgi: ± 1.5 IQR, $\circ$: 1.5 IQR dışında kalan verileri, * : 3 IQR dışında kalan verileri göstermektedir.



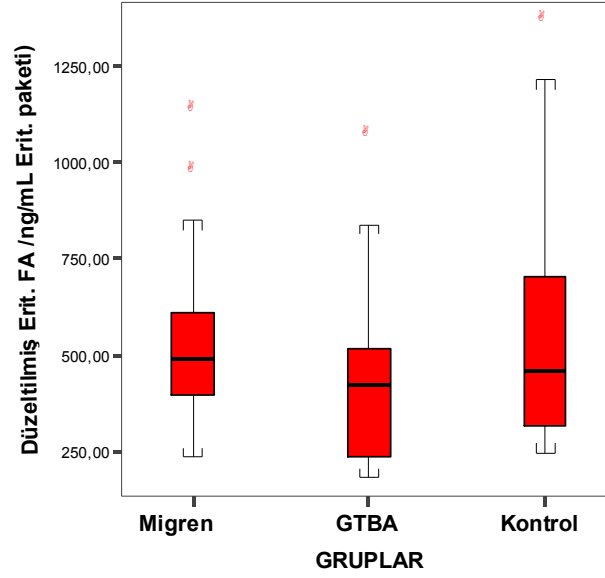
Grafik 1. Migren (aurasız+auralı), gerilim tipi başağrısı ve kontrol gruplarında serum vitamin B₁₂ düzeyleri.



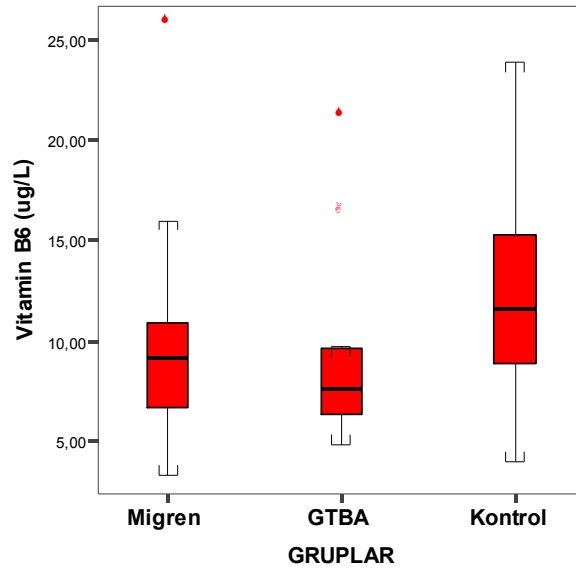
Grafik 2. Migren (aurasız+auralı), gerilim tipi baş ağrısı ve kontrol gruplarında serum FA düzeyleri.



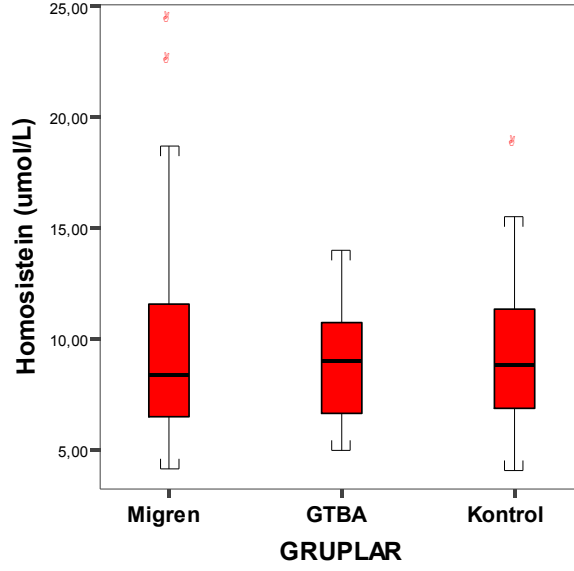
Grafik 3. Migren (aurasız+auralı), gerilim tipi baş ağrısı ve kontrol gruplarında HEFA düzeyleri.



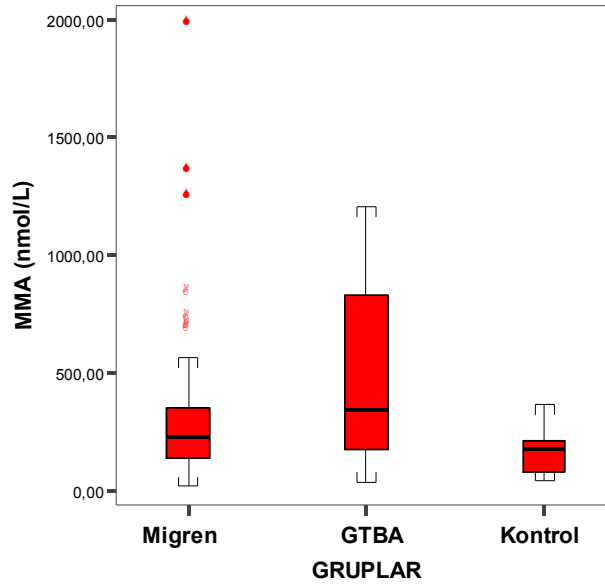
Grafik 4. Migren (aurasız+auralı), gerilim tipi baş ağrısı ve kontrol gruplarında DEFA düzeyleri.



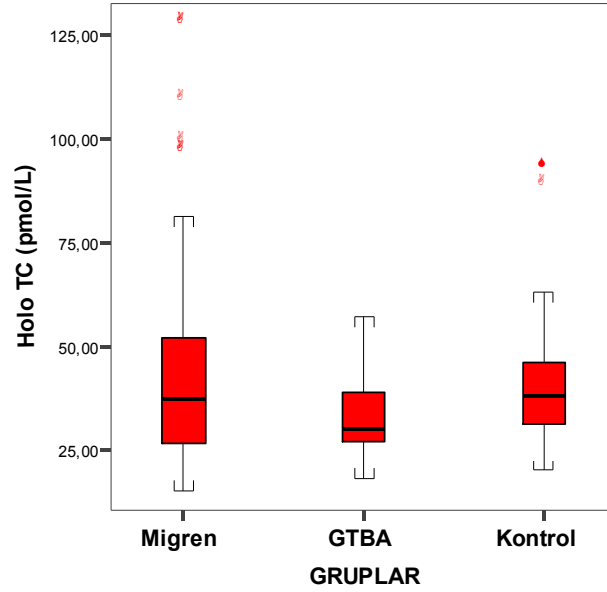
Grafik 5. Migren (aurasız+auralı), gerilim tipi baş ağrısı ve kontrol gruplarında plazma vitamin B₆ düzeyleri.



Grafik 6. Migren (aurasız+auralı), gerilim tipi başağrısı ve kontrol gruplarında serum Hcy düzeyleri.



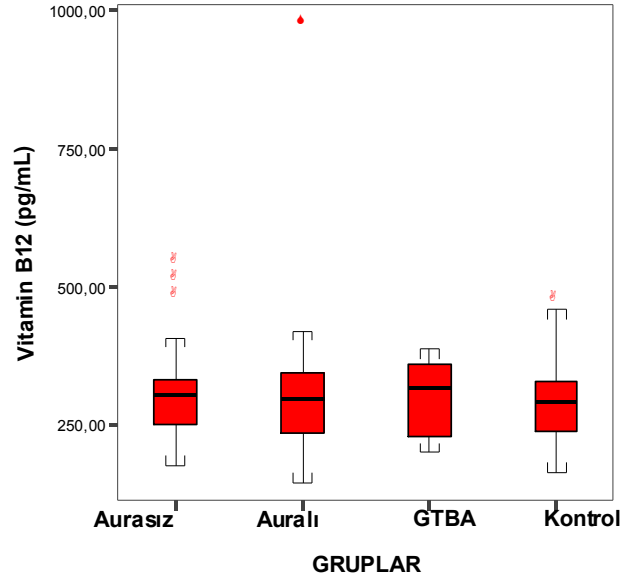
Grafik 7. Migren (aurasız+auralı), gerilim tipi başağrısı ve kontrol gruplarında serum MMA düzeyleri.



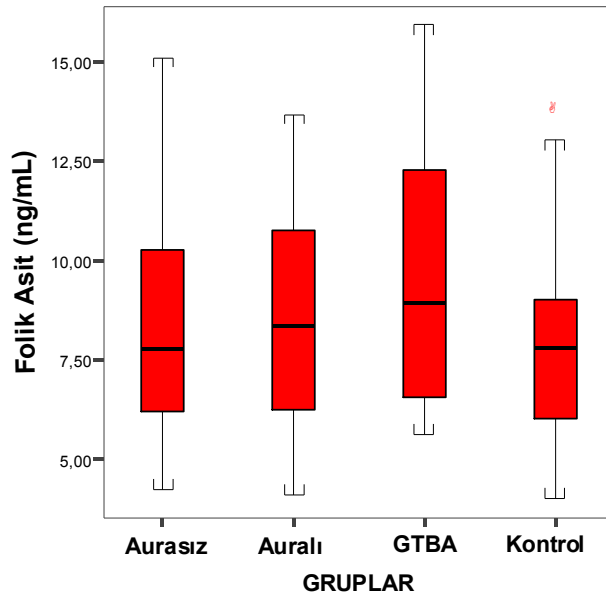
Grafik 8. Migren (aurasız+auralı), gerilim tipi baş ağrısı ve kontrol gruplarında serum Holo-TC düzeyleri.

4.5. Aurasız Migren, Auralı Migren, Gerilim Tipi Baş ağrısı ve Kontrol Gruplarında Ölçülen Değişkenlerin “Boxplot” Grafikleri

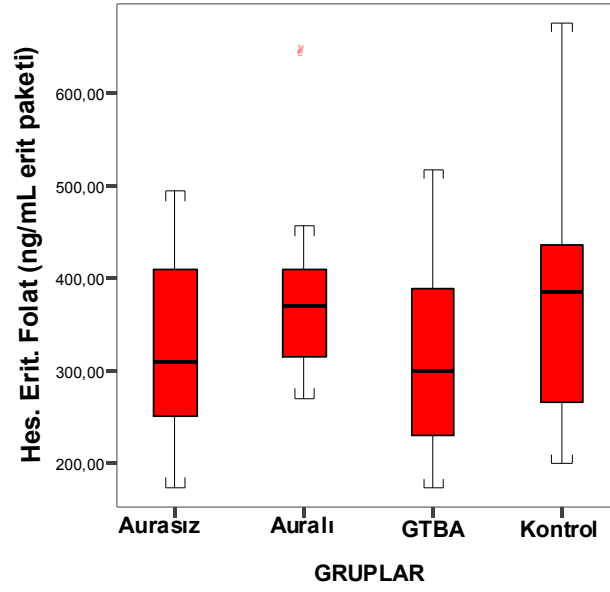
Aurasız migren, auralı migren ve gerilim tipi baş ağrısında ölçülen vitamin B₁₂, folik asit, hesaplanmış eritrosit içi folik asit, düzeltilmiş eritrosit içi folik asit, vitamin B₆, homosistein, MMA ve Holo-TC düzeylerinin boxplot grafikleri Grafik 9 ile 16 arasında gösterildi. Grafiklerde, kutu, çeyrekler arası aralık (IQR): %25 ile %75. arası, yatay çizgi: ortanca (M), düşey çizgi: ± 1.5 IQR, $\circ$: 1.5 IQR dışında kalan verileri, $*$: 3 IQR dışında kalan verileri göstermektedir.



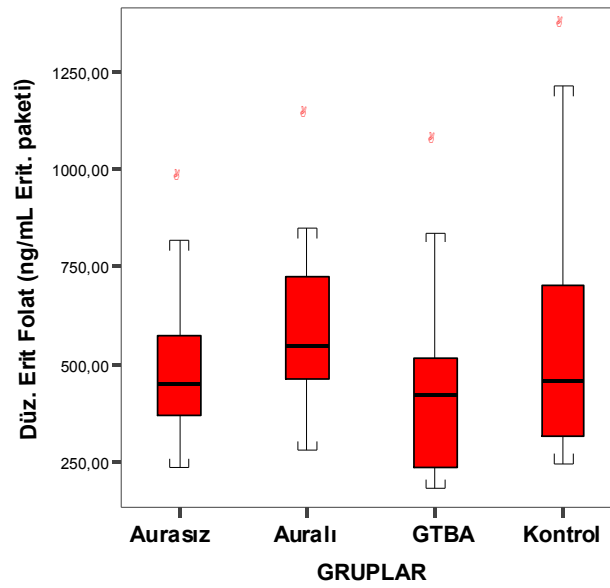
Grafik 9. Aurasız migren, auralı migren, gerilim tipi baş ağrısı ve kontrol gruplarında serum vitamin B₁₂ düzeyleri.



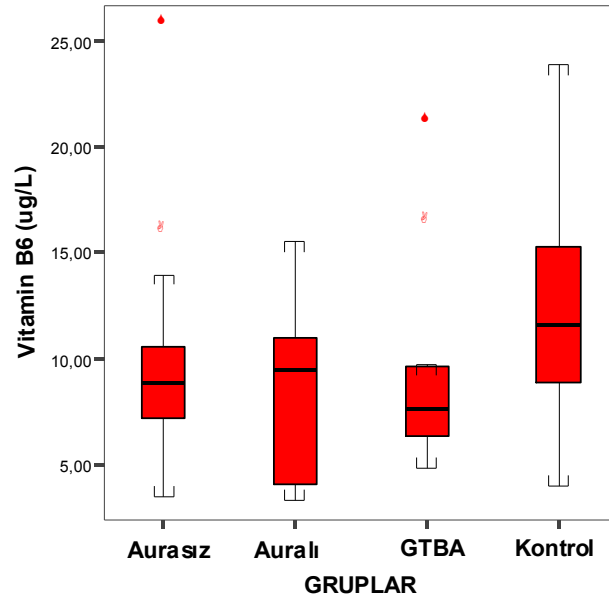
Grafik 10. Aurasız migren, auralı migren, gerilim tipi baş ağrısı ve kontrol gruplarında serum FA düzeyleri.



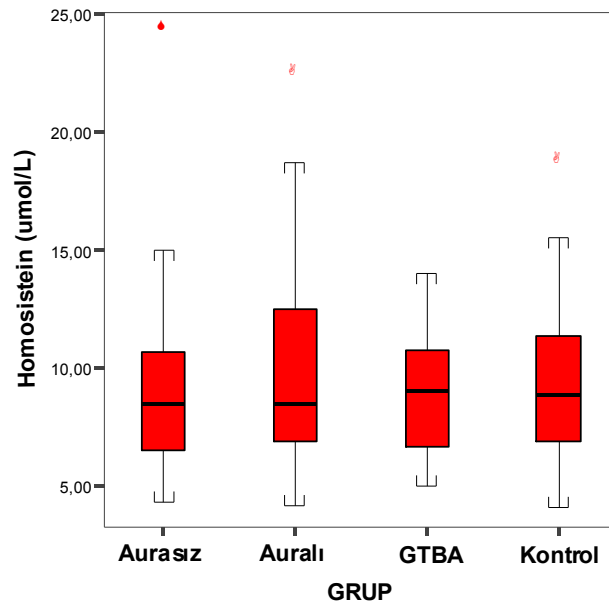
Grafik 11. Aurasız migren, auralı migren, gerilim tipi başağrısı ve kontrol gruplarında HEFA düzeyleri.



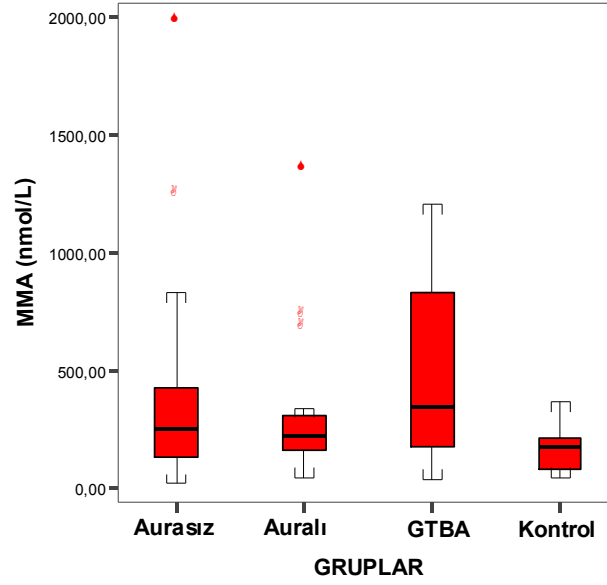
Grafik 12. Aurasız migren, auralı migren, gerilim tipi başağrısı ve kontrol gruplarında DEFA düzeyleri.



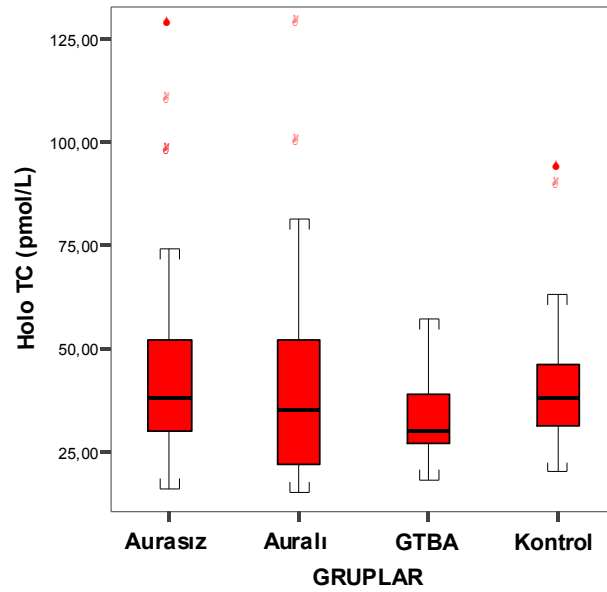
Grafik 13. Aurasız migren, auralı migren, gerilim tipi başağrısı ve kontrol gruplarında plazma vitamin B6 düzeyleri.



Grafik 14. Aurasız migren, auralı migren, gerilim tipi başağrısı ve kontrol gruplarında Hcy düzeyleri.



Grafik 15. Aurasız migren, auralı migren, gerilim tipi başağrısı ve kontrol gruplarında MMA düzeyleri.



Grafik 16. Aurasız migren, auralı migren, gerilim tipi başağrısı ve kontrol gruplarında serum Holo-TC düzeyleri.

4.6. Migren (auralı+aurasız), Aurasız Migren, Auralı Migren, Gerilim Tipi Baş ağrısı, Kontrol Grubu Ve Kontrol Ve Hasta Grupları Birleştirildiğinde Ölçülen Değişkenler Arasındaki Korelasyonlar

Hasta ve kontrol gruplarında ayrı ayrı ve toplu olarak tüm ölçülen değişkenler arasında korelasyon çalışması yapılmıştır. Korelasyon katsayıları ve istatistiksel önemleri sırasıyla Tablo 22, 23, 24, 25, 26 ve 27’de gösterilmiştir.

Tablo 22. Migren (aurasız+auralı) hasta grubunda ölçülen değişkenler arasındaki korelasyonlar.

		VitB ₁₂	FA	HEFA	DEFA	Hcy	MMA	VitB ₆	Holo-TC
VitB ₁₂	r	1,000	-,010	,271	,194	-,323(*)	-,477(**)	-,045	,499(**)
	p	.	,942	,105	,249	,021	,000	,764	,000
FA	r	-,010	1,000	,460(**)	,401(*)	-,461(**)	-,006	-,015	,102
	p	,942	.	,004	,014	,001	,969	,918	,475
HEFA	r	,271	,460(**)	1,000	,931(**)	-,440(**)	-,202	-,018	,154
	p	,105	,004	.	,000	,006	,231	,919	,362
DEFA	r	,194	,401(*)	,931(**)	1,000	-,409(*)	-,231	-,100	,031
	p	,249	,014	,000	.	,012	,168	,568	,857
Hcy	r	-,323(*)	-,461(**)	-,440(**)	-,409(*)	1,000	,112	,190	-,169
	p	,021	,001	,006	,012	.	,433	,200	,236
MMA	r	-,477(**)	-,006	-,202	-,231	,112	1,000	-,029	-,597(**)
	p	,000	,969	,231	,168	,433	.	,847	,000
Vit B ₆	r	-,045	-,015	-,018	-,100	,190	-,029	1,000	,098
	p	,764	,918	,919	,568	,200	,847	.	,512
Holo-TC	r	,499(**)	,102	,154	,031	-,169	-,597(**)	,098	1,000
	p	,000	,475	,362	,857	,236	,000	,512	.

Korelasyon * 0.05 düzeyinde ve **0.01 düzeyinde anlamlıdır (2-yönlü). r=korelasyon katsayısı,p=anlamlılık.

Migren (auralı+aurasız) hasta grubunda:

- Vitamin B₁₂ ile Holo-TC arasında anlamlı pozitif korelasyon ($r=0.499$, $p=0.000$) Hcy ve MMA arasında anlamlı negatif korelasyon vardı (sırasıyla; $r=-0.323$, $p=0.021$ ve $r=-0.477$, $p=0.000$).
- FA ile HEFA ve DEFA arasında anlamlı pozitif korelasyon (sırasıyla; $r=0.460$, $p=0.004$ ve $r=0.401$, $p=0.001$) Hcy arasında anlamlı negatif korelasyon vardı ($r=-0.461$, $p=0.001$).
- HEFA ile DEFA arasında anlamlı pozitif korelasyon ($r=0.931$, $p=0.000$), Hcy arasında anlamlı negatif korelasyon vardı ($r=-0.440$, $p=0.006$).
- DEFA ile Hcy arasında ve MMA ile Holo-TC arasında anlamlı negatif korelasyon vardı (sırasıyla; $r=-0.409$, $p=0.012$ ve $r=-0.597$, $p=0.000$).

Tablo 23. Aurasız migren hasta grubunda ölçülen değişkenler arasındaki korelasyonlar.

		VB ₁₂	FA	HFA	DFA	Hcy	MMA	VitB ₆	Holo-TC
VB ₁₂	r	1,000	,037	,601(**)	,590(**)	-,325	-,501(**)	-,061	,596(**)
	p	.	,850	,005	,006	,085	,006	,766	,001
FA	r	,037	1,000	,440	,358	-,522(**)	-,050	-,013	,145
	p	,850	.	,052	,121	,004	,799	,948	,452
HFA	r	,601(**)	,440	1,000	,951(**)	-,556(**)	-,435(*)	-,158	,466(*)
	p	,005	,052	.	,000	,009	,049	,506	,033
DFA	r	,590(**)	,358	,951(**)	1,000	-,481(*)	-,382	-,250	,409
	p	,006	,121	,000	.	,027	,088	,289	,066
Hcy	r	-,325	-,522(**)	-,556(**)	-,481(*)	1,000	,285	,009	-,213
	p	,085	,004	,009	,027	.	,126	,966	,259
MMA	r	-,501(**)	-,050	-,435(*)	-,382	,285	1,000	,162	-,679(**)
	p	,006	,799	,049	,088	,126	.	,419	,000
VitB ₆	r	-,061	-,013	-,158	-,250	,009	,162	1,000	-,086
	p	,766	,948	,506	,289	,966	,419	.	,670
Holo-TC	r	,596(**)	,145	,466(*)	,409	-,213	-,679(**)	-,086	1,000
	p	,001	,452	,033	,066	,259	,000	,670	.

Korelasyon * 0.05 düzeyinde ve **0.01 düzeyinde anlamlıdır (2-yönlü). r=korelasyon katsayısı, p= anlamlılık.

Aurasız migren hasta grubunda:

- Vitamin B₁₂ ile HFA (r=0.601, p=0.005) ve DFA (r=0.590, p=0.006) arasında anlamlı pozitif korelasyon görülürken, MMA (r=-0.501, p=0.006) arasında anlamlı negatif korelasyon vardı. Vit B₁₂ ile Hcy arasında negatif korelasyon (r=-0.325, p=0.085) olmasına rağmen bu iki değişken arasındaki ilişki anlamsızdı. Vitamin B₁₂ ile Holo-TC arasındaki pozitif korelasyon anlamlı idi (r=0.596, p=0.001).

- FA ile HFA ($r=0.440$, $p=0.052$) ve DFA ($r=0.358$, $p=0.121$) arasında pozitif korelasyon olmasına rağmen anlamsızdı. FA ile Hcy arasında da anlamlı negatif korelasyon vardı ($r=-0.522$, $p=0.004$).
- DFA ile Hcy arasında anlamlı negatif korelasyon vardı ($r=-0.481$, $p=0.027$).
- MMA ile Holo-TC arasındaki korelasyon da anlamlı olup negatif yöndeydi ($r=-0.679$, $p=0.000$).

Tablo 24. Auralı migren hasta grubunda ölçülen değişkenler arasındaki korelasyonlar.

		VB ₁₂	FA	HFA	DFA	Hcy	MMA	VitB ₆	Holo-TC
VB ₁₂	r	1,000	-,040	-,066	-,144	-,343	-,444(*)	-,005	,425
	p	.	,867	,807	,594	,128	,044	,985	,05*
FA	r	-,040	1,000	,345	,293	-,425	,205	-,077	,062
	p	,867	.	,208	,289	,062	,385	,753	,794
HFA	r	-,066	,345	1,000	,914(**)	-,309	,258	,154	-,081
	p	,807	,208	.	,000	,244	,336	,584	,766
DFA	r	-,144	,293	,914(**)	1,000	-,382	,188	,064	-,229
	p	,594	,289	,000	.	,144	,485	,820	,393
Hcy	r	-,343	-,425	-,309	-,382	1,000	-,184	,365	-,148
	p	,128	,062	,244	,144	.	,424	,113	,522
MMA	r	-,444(*)	,205	,258	,188	-,184	1,000	-,340	-,491(*)
	p	,044	,385	,336	,485	,424	.	,143	,024
VitB ₆	r	-,005	-,077	,154	,064	,365	-,340	1,000	,202
	p	,985	,753	,584	,820	,113	,143	.	,394
Holo-TC	r	,425	,062	-,081	-,229	-,148	-,491(*)	,202	1,000
	p	,05*	,794	,766	,393	,522	,024	,394	.

Korelasyon * 0.05 düzeyinde ve **0.01 düzeyinde anlamlıdır (2-yönlü). r=korelasyon katsayısı, p= anlamlılık.

Auralı migren hasta grubunda:

- Vitamin B₁₂ ile MMA arasında anlamlı negatif korelasyon (r=-0.444, p=0.044) ve vitamin B₁₂ ile Holo-TC arasında anlamlı pozitif korelasyon vardı (r=0.425, p=0.05).
- HFA ile DFA arasındaki korelasyonda beklenildiği gibi anlamlı idi (r=0.914, p=0.000).

- Vitamin B₁₂ ve FA ile Hcy arasında negatif korelasyon olmasına rağmen (sırasıyla r=-0.343 ve r=-0.425) bu ilişkiler anlamlı değildi (sırasıyla p=0.128 ve p=0.062).
- MMA ile holo-TC arasında anlamlı negatif korelasyon vardı (r=-0.491, p=0.024).

Tablo 25. Gerilim tipi başağrısı hasta grubunda ölçülen değişkenler arasındaki korelasyonlar.

		VitB ₁₂	FA	HFA	DFA	Hcy	MMA	VitB ₆	Holo-TC
VitB ₁₂	r	1,000	,048	-,056	-,175	,281	-,307	,365	,217
	p	.	,864	,863	,587	,311	,265	,199	,438
FA	r	,048	1,000	,821(**)	,737(**)	-,266	-,546(*)	,015	,057
	p	,864	.	,001	,006	,338	,035	,958	,839
HFA	r	-,056	,821(**)	1,000	,944(**)	-,053	-,790(**)	-,126	,039
	p	,863	,001	.	,000	,871	,002	,697	,905
DFA	r	-,175	,737(**)	,944(**)	1,000	-,140	-,825(**)	-,196	,137
	p	,587	,006	,000	.	,664	,001	,542	,672
Hcy	r	,281	-,266	-,053	-,140	1,000	-,057	,077	-,021
	p	.	,338	,871	,664	.	,840	,794	,942
MMA	r	-,307	-,546(*)	-,790(**)	-,825(**)	-,057	1,000	,204	-,399
	p	,265	,035	,002	,001	,840	.	,483	,141
VitB ₆	r	,365	,015	-,126	-,196	,077	,204	1,000	,194
	p	,199	,958	,697	,542	,794	,483	.	,507
Holo-TC	r	,217	,057	,039	,137	-,021	-,399	,194	1,000
	p	,438	,839	,905	,672	,942	,141	,507	.

Korelasyon * 0.05 düzeyinde ve **0.01 düzeyinde anlamlıdır (2-yönlü). r=korelasyon katsayısı, p= anlamlılık.

Gerilim tipi başağrısı hasta grubunda:

- FA ile HFA ve DFA arasında anlamlı pozitif korelasyon vardı (sırasıyla; $r=0.821$, $p=0.001$; $r=0.737$, $p=0.006$). HFA ve DFA arasındaki korelasyon da anlamlı idi ($r=0.994$ ve $p=0.000$).
- MMA ile vitamin B₁₂ ve ilişkili parametrelerin aksine FA değişkenleri (FA, HFA ve DFA) arasında anlamlı negatif korelasyon vardı (sırasıyla $r=-0.546$, $p=0.035$, $r=-0.790$, $p=0.002$ ve $r=0.825$, $p=0.001$).

Tablo 26. Kontrol grubunda ölçülen değişkenler arasındaki korelasyonlar.

		VitB ₁₂	FA	HFA	DFA	Hcy	MMA	VitB ₆	Holo-TC
VitB ₁₂	r	1,000	,438(*)	,218	,251	-,434(*)	,204	,156	,236
	p	.	,037	,342	,272	,043	,351	,510	,279
FA	r	,438(*)	1,000	,524(*)	,439(*)	-,285	,069	-,117	-,093
	p	,037	.	,012	,041	,187	,749	,615	,665
HFA	r	,218	,524(*)	1,000	,880(**)	-,438(*)	,100	-,135	,177
	p	,342	,012	.	,000	,042	,650	,569	,420
DFA	r	,251	,439(*)	,880(**)	1,000	-,386	-,047	-,201	,037
	p	,272	,041	,000	.	,076	,830	,396	,867
Hcy	r	-,434(*)	-,285	-,438(*)	-,386	1,000	-,167	-,009	-,248
	p	,043	,187	,042	,076	.	,434	,969	,242
MMA	r	,204	,069	,100	-,047	-,167	1,000	-,291	-,075
	p	,351	,749	,650	,830	,434	.	,189	,722
VitB ₆	r	,156	-,117	-,135	-,201	-,009	-,291	1,000	,401
	p	,510	,615	,569	,396	,969	,189	.	,065
Holo-TC	r	,236	-,093	,177	,037	-,248	-,075	,401	1,000
	p	,279	,665	,420	,867	,242	,722	,065	.

Korelasyon * 0.05 düzeyinde ve **0.01 düzeyinde anlamlıdır (2-yönlü). r=korelasyon katsayısı, p= anlamlılık.

Kontrol grubunda:

- Vit B₁₂ ile FA arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunurken ($r=0.438$, $p=0.037$), Hcy arasında anlamlı negatif korelasyon vardı ($r=-0.434$, $p=0.043$).
- FA ile DFA ve HFA arasında anlamlı pozitif korelasyon vardı (sırasıyla; $r=0.524$, $p=0.012$; $r=0.439$, $p=0.041$). HFA ile DFA arasında anlamlı pozitif korelasyon vardı ($r=0.880$, $p=0.000$) ve HFA ile Hcy arasında ise anlamlı negatif korelasyon vardı ($r=-0.438$, $p=0.042$).

Tablo 27. Kontrol ve hasta grupları birleştirildiğinde ölçülen değişkenler arasındaki korelasyonlar

		VitB ₁₂	FA	HFA	DFA	Hcy	MMA	VitB ₆	Holo-TC
VitB ₁₂	r	1,000	,101	,145	,065	-,233(*)	-,283(**)	-,011	,385(**)
	p	.	,338	,225	,587	,027	,007	,924	,000
FA	r	,101	1,000	,507(**)	,430(**)	-,381(**)	-,016	-,101	,035
	p	,338	.	,000	,000	,000	,879	,361	,745
HFA	r	,145	,507(**)	1,000	,915(**)	-,363(**)	-,248(*)	-,048	,168
	p	,225	,000	.	,000	,002	,036	,698	,159
DFA	r	,065	,430(**)	,915(**)	1,000	-,326(**)	-,281(*)	-,158	,061
	p	,587	,000	,000	.	,005	,017	,202	,610
Hcy	r	-,233(*)	-,381(**)	-,363(**)	-,326(**)	1,000	-,008	,181	-,168
	p	,027	,000	,002	,005	.	,938	,104	,114
MMA	r	-,283(**)	-,016	-,248(*)	-,281(*)	-,008	1,000	-,182	-,463(**)
	p	,007	,879	,036	,017	,938	.	,100	,000
VitB ₆	r	-,011	-,101	-,048	-,158	,181	-,182	1,000	,215
	p	,924	,361	,698	,202	,104	,100	.	,051
Holo-TC	r	,385(**)	,035	,168	,061	-,168	-,463(**)	,215	1,000
	p	,000	,745	,159	,610	,114	,000	,051	.

Korelasyon *0.05 düzeyinde ve **0.01 düzeyinde anlamlıdır (2-yönlü). r=korelasyon katsayısı, p= anlamlılık.

Kontrol ve hasta grupları birleştirildiğinde, değişkenler arasındaki korelasyonlar;

- VitB₁₂ ile MMA ve Hcy arasındaki negatif korelasyonun anlamlı olduğu görüldü (sırasıyla; r=-0.233, p=0.027 ve r=-0.283, p=0.007). Holo-TC ile vit B₁₂ arasındaki anlamlı korelasyon ise pozitif yönde idi (r=0.385, p=0.000).

- FA ile HFA ve DFA arasında anlamlı pozitif korelasyon, Hcy arasında anlamlı negatif korelasyon vardı (sırasıyla; $r=0.507$, $p=0.000$, $r=0.430$, $p=0.000$). FA ile Hcy arasındaki korelasyon ise negatif yönde ve anlamlı idi ($r=-0.381$, $p=0.000$).

4.7. . Çalışmada Kullanılan Yöntemlerin Performans Özellikleri

4.7.1. Vitamin B₁₂ ve FA'in Tekrarlanabilirliği

Vit B₁₂ ve FA'in tekrarlanabilirlik çalışması için üç düzeyde kalite kontrol örneğinin tekrarlanabilirliği değerlendirildi. %VK'nın hesaplanmasında, geriye dönük, ardışık 36 adet kalite kontrol örneği sonucundan %VK'lar hesaplandı ve Tablo 28'de gösterildi.

Tablo 28. Serum vitamin B12 ve folik asite ait %VK değerleri.

	Vit B12 (pg/ml)	Folik asit (ng/mL)
Kontrol 1 (n=36)		
x	408	1.94
ss	23.7	0.27
%VK	5.82	13.6
Kontrol 2 (n=36)		
x	561	6.73
ss	27.7	0.46
%VK	4.94	6.86
Kontrol 3 (n=36)		
x	1278	10.7
ss	56.2	0.67
%VK	4.40	6.3

4.7.2. Holo-TC Testinin Çalışma İçi Tekrarlanabilirliği

Holo TC testinin çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışması için firma tarafından sağlanan iki düzey (düşük ve yüksek) Holo TC içeren kontrol örnekleri kullanıldı. Örnekler her 20 hastada bir 5'er kez çalışılarak (n=20) ortalama ($\bar{x}$), standart sapma (ss) ve % varyasyon katsayıları (%VK) hesaplandı. Dört çalışmanın ortalama %VK değeri gün içi %VK olarak değerlendirildi. Sonuçlar Tablo 29'de gösterilmektedir.

Tablo 29. Holo-TC için düşük ve yüksek kontrol örneklerine ait çalışma içi ve gün içi tekrarlanabilirlik değerleri.

	Ölçüm 1	Ölçüm 2	Ölçüm 3	Ölçüm 4	Ortalama
Düşük	25	23,6	23	25	
	26,5	24,3	22,4	22,8	
	24,9	27,2	22,6	24,4	
	26,3	28	23,6	24,7	
	24,6	25,7	23,5	26	
x	25,5	25,8	23,0	24,6	
ss	0,87	1,9	0,53	1,16	
%VK	3,4	7,2	2,3	4,7	4,4
Yüksek	50,5	50,9	47,7	51	
	51,63	51,8	48,1	55,1	
	50,2	53,6	46	53,4	
	52,2	50,7	50	54	
	52,7	52,5	51,9	54,3	
x	51,4	51,9	48,7	53,6	
ss	1,1	1,2	2,3	1,56	
%VK	2,1	2,3	4,7	2,9	3,0

4.7.3. Homosisteinin Tekrarlanabilirliği

Homosisteinin tekrarlanabilirlik çalışması için iki düzeyde kalite kontrol örneğinin günler arası tekrarlanabilirliği değerlendirildi. %VK'nın hesaplanmasında, geriye dönük, bir yıllık ardışık 20 adet düşük ve yüksek kalite kontrol örneği sonucundan %VK'lar hesaplandı ve Tablo 30'da gösterildi.

Tablo 30. Homosisteinin günler arası %VK değerleri.

	Kontrol 1 (n=20)	Kontrol 2 (n=20)
x	10.0 µmol/L	19.67
ss	0.547	0.9
%VK	5.45	4.58

4.7.4. MMA Testinin Performans Özellikleri

4.7.4.1. MMA testinin kalibrasyon eğrisi

Analiz sisteminin kalibrasyonu için 4 seviyede liyofilize ClinCal[®] serum kalibratörleri kullanıldı. Kalibratör konsantrasyonları Tablo 31’de, kalibrasyon eğrisi ise Grafik 17’de gösterilmektedir.

Tablo 31. Tandem MS sisteminin MMA ölçümü için kalibrasyonunda kullanılan kalibratörler ve konsantrasyonları.

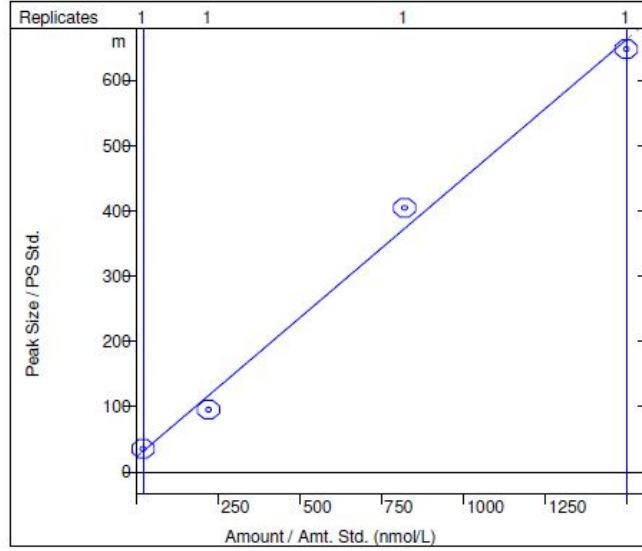
Kalibratör	Konsantrasyon (nmol/L)
Level 0	21
Level 1	221
Level 2	821
Level 3	1499

Metilmalonik asit

Curve Fit: Linear, Origin: Ignore, Weight: None

Resp. Fact. RSD: 81,89%, Coeff. Det.(r²): 0,993074

$$y = +4,2648e-4x + 0,0230$$



Grafik 17. MMA kalibrasyon eğrisi.

4.7.4.2. MMA testinin çalışma içi ve günler arası tekrarlanabilirliği

MMA testinin tekrarlanabilirliğini değerlendirmek için, iki düzey (düşük ve yüksek) ClinCheck® serum kontrolü kullanıldı. Kontrol serumları değer aralıkları sırasıyla 210-316 nmol/L (ortalama değer: 263 nmol/L) ve 482-724 nmol/L (ortalama değer: 603 nmol/L) idi. Çalışma içi tekrarlanabilirliğin değerlendirilmesi için örnekler, aynı seride 10 kez çalışıldı. Elde edilen sonuçların x, ss, ve %VK değerleri Tablo 32’de gösterilmektedir.

Çalışmalararası tekrarlanabilirlik çalışması için 4 gün 3’erli gruplar halinde ölçümler gerçekleştirildi (n=12). Her gün için ayrı ayrı

ölçülen konsantrasyon, x, ss, %VK ve 3 4 günlük ortalama %VK değerleri toplu olarak Tablo 33’de verilmektedir.

Tablo 32. MMA için çalışma içi tekrarlanabilirlik değerleri.

Ölçüm	<i>Düşük kontrol</i>	<i>Yüksek kontrol</i>
1	254	594
2	251	613
3	250	566
4	266	593
5	246	603
6	253	552
7	273	613
8	266	620
9	264	606
10	251	635
X	257	599
Ss	9,0	24,8
%VK	3,5	4,1

Tablo 33. MMA için günlerarası tekrarlanabilirlik değerleri.

	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	Ort. %VK (n=12)
<i>Düşük kontrol</i>	243	273	226	273	
	241	266	236	266	
	241	274	243	274	
x	241	271	248	235	249
ss	1.2	4.4	6.6	8.5	5.2
%VK	0.48	1.61	2.7	3.6	2.1
<i>Yüksek kontrol</i>	646	613	594	593	
	635	620	613	603	
	613	606	566	552	
x	631	613	591	582	605
ss	16.8	7.0	23.6	27.0	18.6
%VK	2.7	1.1	4.0	4.6	3.1

4.7.4.3. MMA testinin doğruluğu (gerikazanım çalışması)

Geri kazanım çalışması için düşük (A) ve yüksek (B) konsantrasyonda MMA içeren iki serum havuzu hazırlandı. Havuzlar sırasıyla 249 nmol/L ve 745 nmol/L MMA içermekteydi. Havuzlardan belirli oranlarda karıştırılarak MMA değerleri ölçüldü. %geri kazanım (%R) değerleri Tablo 34’de gösterilmektedir.

Tablo 34. MMA % gerikazanım (%R) değerleri.

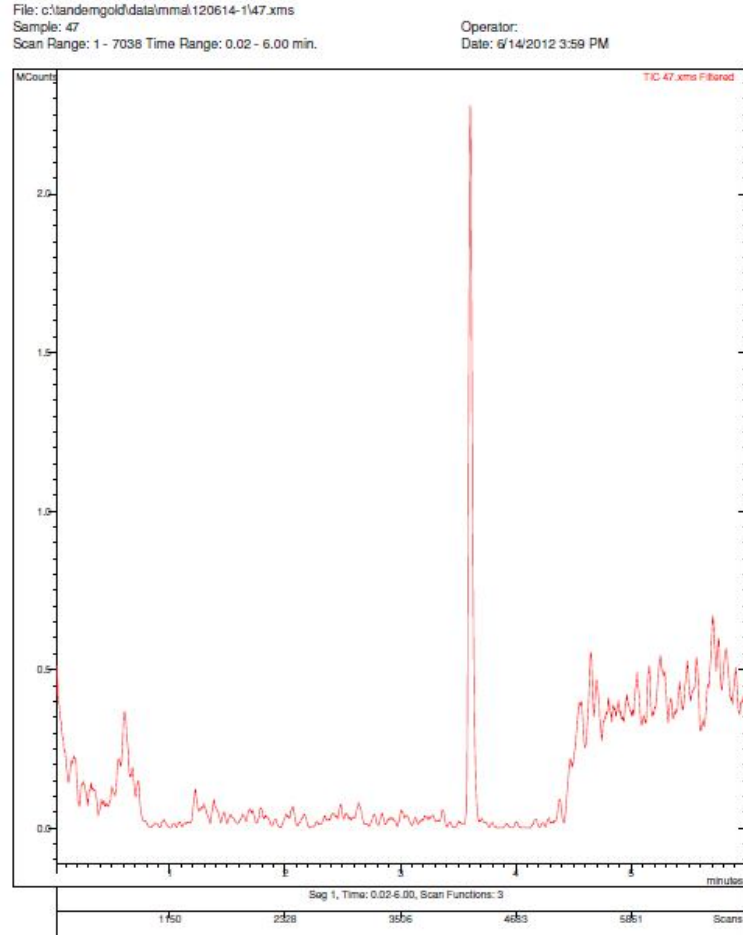
Karışım oranları	Beklenen Değer	Ölçülen Değer	%R
1A/1B	509	498	98
2A/1B	413	414	100
3A/1B	382	373	98
1A/2B	532	564	106
1A/3B	631	621	98
Ortalama			100

4.7.4.4. MMA testinin LoD ve LoQ değerleri

MMA ölçüm yönteminin minimum saptama sınırı (LoD) ve ölçüm sınırı (LoQ) için düşük kontrol örneğinin günler arası çalışılması ile elde edilen standart sapmaların (ss) ortalaması alınarak belirlendi. Minimum saptama sınırı (LoD) ss'nin 3 katı, ölçüm sınırı (LoQ) ise 10 katı alınarak hesaplandı.

Buna göre yöntemin minimum saptama sınırı (LoD) 16 nmol/L, ölçüm sınırı ise 52 nmol/L olarak belirlendi.

4.7.4.5. MMA testi örnek kromatogramları

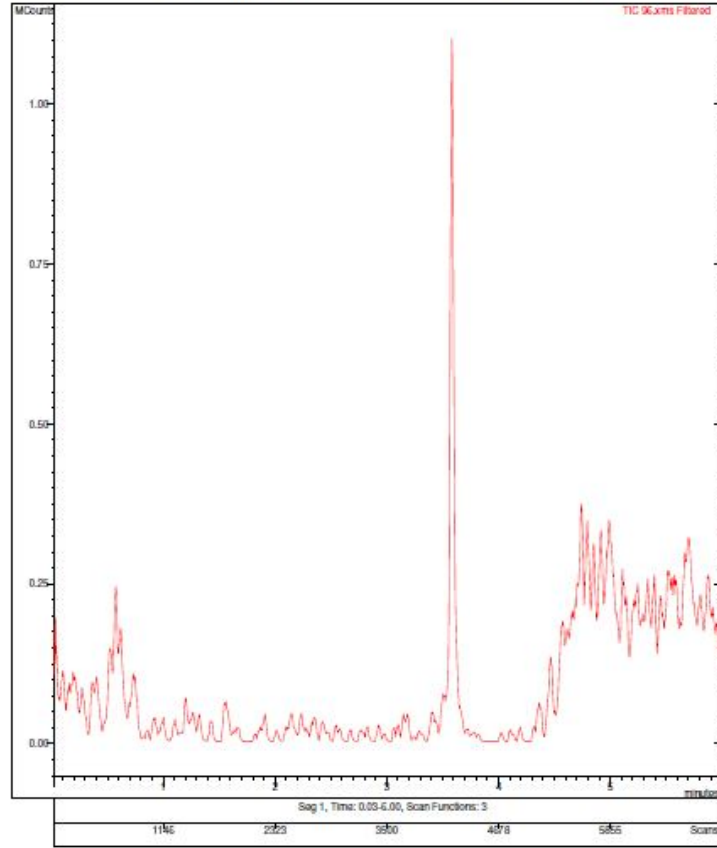


Grafik 18. Tandem MS ile hasta serum MMA ölçümünden elde edilen kromatogram. MMA retansiyon zamanı: 3.6 dakika.

Chromatogram Plot

File: c:\tandemgold\data\mma\10815\98.xml
Sample: 98
Scan Range: 1 - 7038 Time Range: 0.03 - 6.00 min.

Operator: selma.ozdemir
Date: 6/15/2012 3:59 PM



Grafik 19. Tandem MS ile hasta serum MMA ölçümünden elde edilen kromatogram. MMA retansiyon zamanı: 3.6 dakika.

4.8. Fonksiyonel Vitamin B₁₂ Eksikliği Tanısında Değişkenlerin ROC Analizi

Fonksiyonel vitamin B₁₂ eksikliği tanısını göstermek amacıyla sırasıyla migren (auralı+aurasız), aurasız migren, auralı migren ve gerilim tipi baş ağrısında testlerin (vitamin B₁₂, Hcy, MMA ve Holo TC) ROC eğrileri çizilmiş ve eğri altında kalan alanları ve %95 güven aralıkları (CI) tablolarla gösterilmiştir.

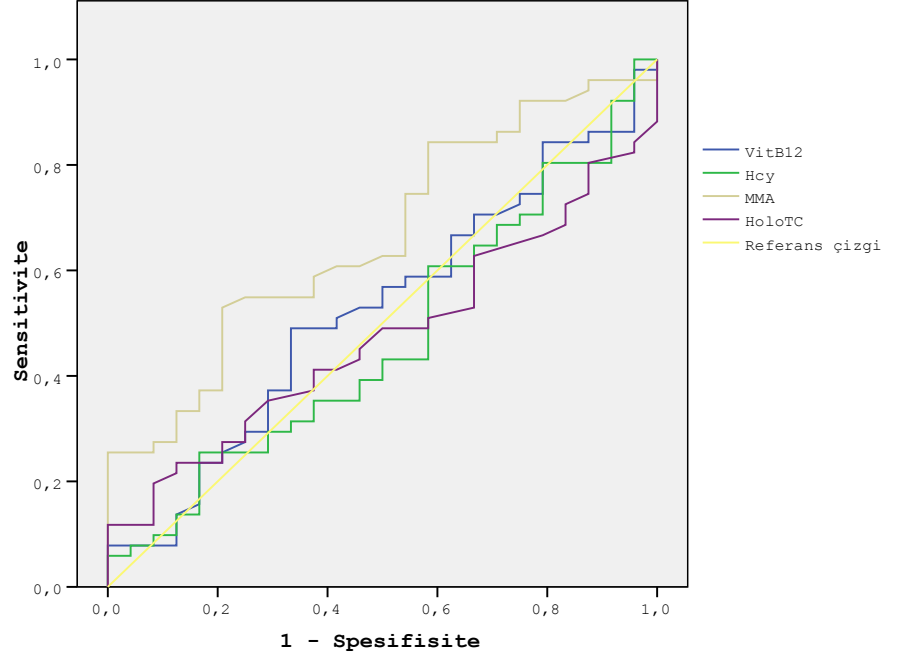
4.8.1. Migren (Aurasız+Auralı) Hasta Grubunda Fonksiyonel Vitamin B₁₂ Eksikliği Değişkenleri İçin ROC Analizi

Migren hasta grubunda fonksiyonel vitamin B₁₂ eksikliği tanısında kullanılan testler için yapılan ROC analizinde eğri altında kalan alan değerleri ve %95 CI'leri Tablo 35'da ve ROC eğrileri Grafik 20'de gösterilmiştir.

Tablo 35. Migren hasta grubunda yapılan ROC analizinde testlerin eğri altında kalan alanları.

Değişkenler	Eğri altında kalan alan	%95 Güven Aralığı	
		Düşük	Yüksek
VitB12	0.523	0.385	0.661
Hcy	<0.5	0.332	0.609
MMA	0.663*	0.537	0.790
Holo TC	<0.5	0.344	0.606

*p=0.023



Grafik 20. Migren hasta grubunda vitamin B₁₂ eksikliği ile ilişkili değişkenlerin ROC eğrisi.

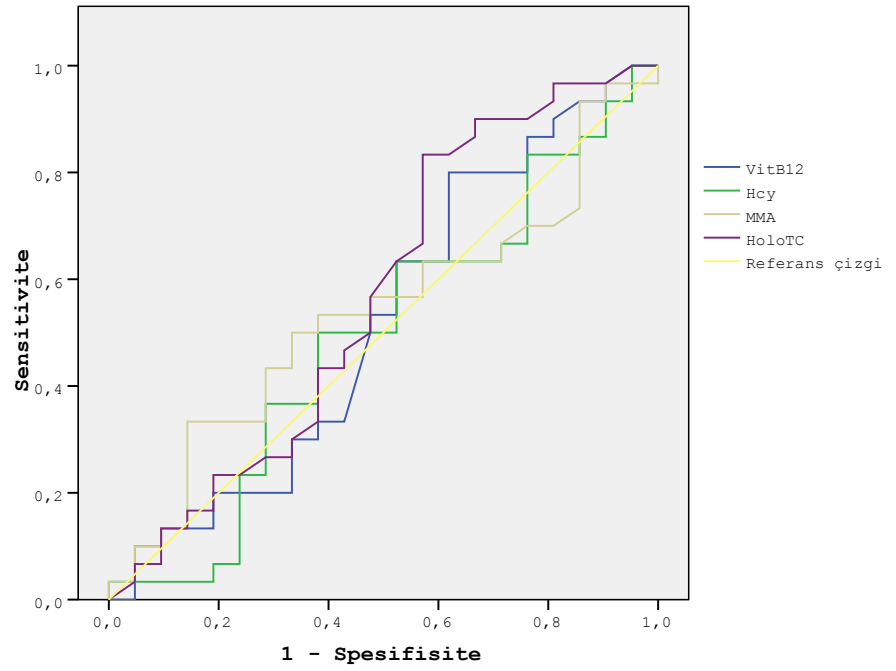
4.8.2. Aurasız Migren Hasta Grubunda Fonksiyonel Vitamin B₁₂ Eksikliği Değişkenleri İçin ROC Analizleri

Aurasız migren hasta grubunda fonksiyonel vitamin B₁₂ eksikliği tanısında kullanılan testler için yapılan ROC analizinde eğri altında kalan alan değerleri ve %95 CI'leri Tablo 36'da ve ROC eğrileri Grafik 21'de gösterilmiştir.

Tablo 36. Aurasız migren hasta grubunda vitamin B₁₂ eksikliğiyle ilişkili testlerin ROC analizinde eğri altında kalan alanları.

Değişkenler	Eğri altında kalan alan	%95 Güven Aralığı	
		Düşük	Yüksek
VitB12	0.520	0.351	0.688
Hcy	<0.5	0.326	0.659
MMA	0.537*	0.375	0.698
Holo TC	0.568	0.399	0.737

*p>0.05



Grafik 21. Aurasız migren hasta grubunda vitamin B₁₂ eksikliği ile ilişkili değişkenlerin ROC eğrileri.

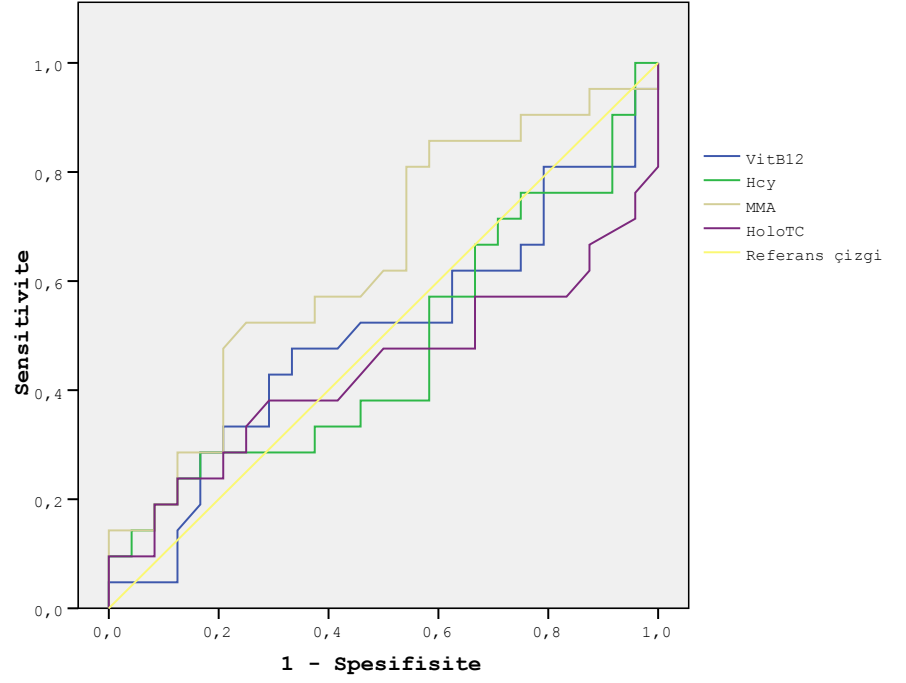
4.8.3. Auralı Migren Hasta Grubunda Fonksiyonel Vitamin B₁₂ Eksikliği Değişkenleri İçin ROC Analizleri

Auralı migren hasta grubunda fonksiyonel vitamin B₁₂ eksikliği tanısında kullanılan testler için yapılan ROC analizinde eğri altında kalan alan değerleri ve %95 Cl'leri Tablo 37'de ve ROC eğrileri Grafik 22'de gösterilmiştir.

Tablo 37. Auralı migren hasta grubunda vitamin B₁₂ eksikliğiyle ilişkili testlerin ROC analizinde eğri altında kalan alanları.

Değişkenler	Eğri altında kalan alan	%95 Güven Aralığı	
		Düşük	Yüksek
VitB12	<0.5	0.323	0.673
Hcy	<0.5	0.299	0.649
MMA	0.637*	0.472	0.801
Holo TC	<0.5	0.256	0.615

*p>0.05



Grafik 22. Auralı migren hasta grubunda vitamin B₁₂ eksikliği ile ilişkili değişkenlerin ROC eğrileri.

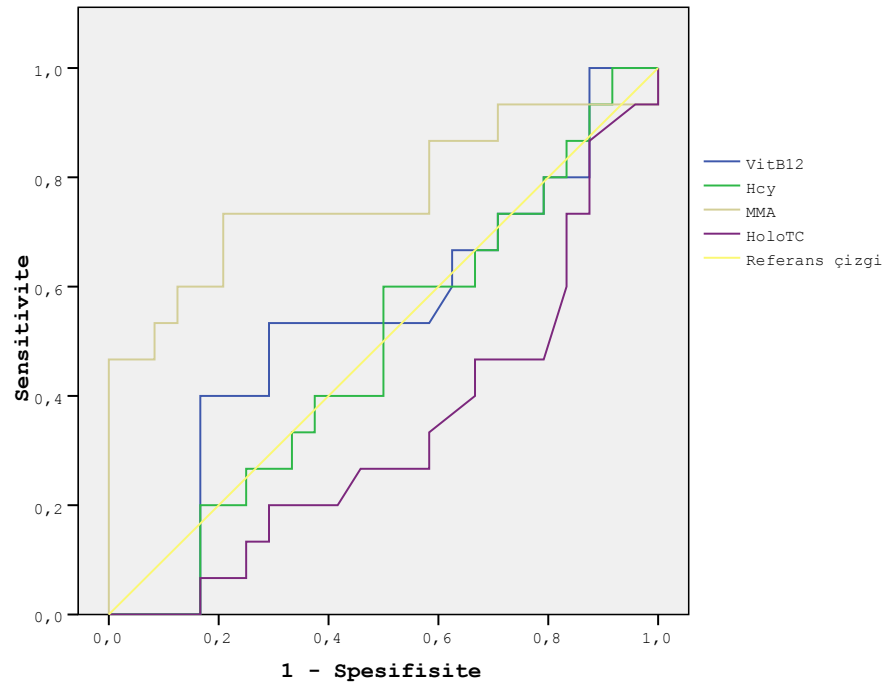
4.8.4. Gerilim Tipi Başağrısı Hasta Grubunda Fonksiyonel Vitamin B₁₂ Eksikliği Değişkenleri İçin ROC Analizleri

Gerilim tipi başağrısı hasta grubunda fonksiyonel vitamin B₁₂ eksikliği tanısında kullanılan testler için yapılan ROC analizinde eğri altında kalan alan değerleri ve %95 CI'leri Tablo 38'de ve ROC eğrileri Grafik 23'de gösterilmiştir.

Tablo 38. Gerilim tipi başağrısı hasta grubunda vitamin B₁₂ eksikliğiyle ilişkili testlerin ROC analizinde eğri altında kalan alanları.

Değişkenler	Eğri altında kalan alan	%95 Güven Aralığı	
		Düşük	Yüksek
VitB12	0.538	0.345	0.730
Hcy	<0.5	0.298	0.669
MMA	0.767*	0.595	0.938
Holo TC	<0.5	0.159	0.510

*p=0.006



Grafik 23. Gerilim tipi başağrısı hasta grubunda vitamin B₁₂ eksikliği ile ilişkili değişkenlerin ROC eğrileri.

5. TARTIŞMA

Başıağrsı en yaygın tekrarlayan ağrı tipi olduğu kadar nörolojide en sık karşılaşılan semptomlardan biridir. Birincil başağrsı grubu içerisinde yer alan migren için toplumumuzda görülen sıklığın %16³⁴, gerilim tipi başağrsı için %35³⁹ olduğu bildirilmiştir. Diğer çoğu kronik hastalıklarda olduğu gibi başağrsı sendromları sadece hastanın yaşam kalitesini etkilemekle kalmaz aynı zamanda toplumlarda ciddi ekonomik yüke de neden olur.

Migren¹⁴, ve gerilim tipi başağrsı⁴¹ patofizyolojik mekanizmaları tam olarak aydınlatılamayan, beynin kompleks, karmaşık hastalıklarıdır. Özellikle migrenin ilaçla tedavisi, hastadan hastaya değışken etkinlik göstermektedir ve her iki sendrom grubu için de tanı koydurucu bir laboratuvar testi yoktur. Tanı IHS kriterlerine göre konulmaktadır.⁷

Migren tedavisinde, başağrı ataklarını kesmek veya atakların yoğunluğunu ve sıklığını azaltmak hedeflenir. Bu amaçla atak tedavisinde triptanlar, non steroid antienflamatuvar ilaçlar ve ergotamin kullanılmaktadır. Migren ataklarının yoğunluğunu azaltmak için beta blokörler, trisiklikler (amitriptilin gibi), metilsergid ve pizotifen gibi 5-HT₂ reseptör antagonistleri ve flunarizin gibi kalsiyum antagonistleri kullanılmaktadır.¹³⁹ Geleneksel olmayan veya akupunktur gibi alternatif tıp uygulamaları da migren tedavisinde etkin olabilmektedir.¹⁴⁰ Bunların

yanında ilaçtan çok, sıklıkla mikrobesein olarak ifade edilen, çeşitli koruyucu tedaviler, bazı mineraller, koenzimler ve vitaminlerin de migren tedavisinde etkin olabildiği veya potansiyel tedavi yaklaşımı olarak değerlendirilebileceği vurgulanmaktadır.¹³⁸

Migren ve iskemik inme arasındaki ilişki çeşitli çok merkezli vaka-kontrol, epidemiyolojik ve kohort çalışmalarla gösterilmiştir.^{141,142,143} Ayrıca kardiyovasküler hastalıklar ve migren arasındaki ilişki de çeşitli çalışmalara konu olmuştur.¹²² B vitaminlerinin, metabolitlerinin ve tek karbon metabolizmasıyla ilgili belirteçlerin kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi çeşitli kronik hastalıklar ile ilişkili olduğu bilinmektedir.¹⁴⁴ Bu belirteçler serum/plazma B vitamin konsantrasyonları (folat, kobalamin, vitamin B₆ ve B₂), bunların doku düzeylerini yansıtan metabolitleri (total homosistein ve metilmalonik asit) ve metilaminler (kolin, betain, dimetilglisin) ile metilargininler ve triptofan metabolitlerini (kiyrunenin döngüsü) içermektedir.¹⁴⁵

Çalışmamızda migren ve gerilim tipi baş ağrısı hasta gruplarında tek karbon metabolizmasıyla ilgili vitaminlerin (Vit B₆, B₁₂ ve FA) eksikliklerinin olup olmadığı ve bu vitaminlerin doku düzeylerinin yansıtan metabolitlerinin baş ağrısı patogenezi ile ilişkili olup olmadığı araştırıldı. Çalışma bu yönüyle yenidir. Çünkü literatürde bu konuda yapılmış (özellikle bu hastalık grupları için vitamin B₆ ve MMA'nın değerlendirilmesi açısından) yoktur. Bu hasta grupları için fonksiyonel vitamin B₁₂ eksikliğinin değerlendirilmesinde hangi belirtecin (serum VitB₁₂, Holo-TC, serum MMA ve Hcy) daha etkin olduğu değerlendirildi. ESI LC

MS/MS sisteminde çalışılan MMA testinin yöntem geçerliliğinin kanıtlanması çalışmaları yapıldı.

5.1. Migren ve Gerilim Tipi Baş ağrısında Vitamin B₆ Düzeyleri

Vitamin B₆ tek karbon metabolizmasının, amino asitlerin, karbonhidratların, nörotransmitterlerin (özellikle serotonin, norepinefrin ve dopamin) ve lipidlerin metabolizmasıyla ilişkili 100-150 kadar reaksiyonda koenzim olarak görev almaktadır. Ayrıca hem biyosentezi, yağ asit metabolizması, gen ekspresyonunun regülasyonu ve immün sistemin regülasyonunda da görev almaktadır. Bunların yanında anti-oksidatif özellikleri ve karsinogenez üzerine etkileri de tarif edilmiştir. Vitamin B₆ eksikliği durumunda yukarıdaki fonksiyonlar bozulabilir.

Çalışmamızda migren ve gerilim tipi baş ağrısı hasta gruplarında plazma vitamin B₆ düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulundu (sırasıyla; $p=0.005$ ve $p=0.013$). Migren hasta grubu aurasız ve auralı migren altgrupları olarak değerlendirildiğinde de kontrol grubuna göre anlamlı düşüklük vardı (sırasıyla $p=0.012$ ve $p=0.008$). Buna karşılık vit B₆'nın çalışılan diğer parametrelerin hiçbirisiyle anlamlı bir korelasyonu yoktu.

Serotonerjik sistem hem migren patofizyolojisinde hem de farmakolojisinde önemli role sahiptir.^{146,147} Migrende ve gerilim tipi baş ağrısında serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) düzeyleri ve metabolizmasıyla ilişkili çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır. Nagata ve arkadaşları yaptıkları çalışmada¹⁴⁸ migrenli hastalarda ataksız dönemde plazma 5-HT konsantrasyonunun kontrol grubuna göre düşük olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte aynı çalışmada ölçülen plazma triptofan ve 5-hidroksitriptofan (5-HTP) konsantrasyonlarında migren grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadığını vurgulamışlardır. Kronik gerilim tipi baş ağrısı hasta grubunda yapılan diğer bir çalışmada Anthony ve arkadaşları¹⁴⁹ plazma serotonin konsantrasyonunu kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulmuşlardır.

İnsanlarda serotonin iki basamaklı enzim reaksiyonu ile triptofandan sentezlenir. 1) triptofan hidroksilazın (TH) katalizlediği, 5-hidroksitriptofanın (5-HTP) oluştuğu, triptofan hidroksilasyonu ve 2) aromatik L-amino asit dekarboksilazın katalizlediği (AADC) reaksiyonlar. Nagata ve arkadaşları¹⁴⁷ bu bulguları ışığında migrenli hasta grubunda plazma serotonin düşüklüğünün, metabolik yolaktaki enzimatik yetersizliğe bağlı olabileceği teorisini ileri sürmüşlerdir. 5-HTP'nin hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı fark göstermemesi enzim yetersizliğinin AADC'de olabileceğini göstermektedir. AADC beyin dokusu ve adrenal medullada yüksek miktarlarda bulunmaktadır ve kofaktör olarak piridoksal fosfat kullanır.¹⁴⁷ Dolayısıyla PLP eksikliği AADC enzim aktivitesinde yetersizliğe neden olabilir. Bu da beraberinde serotonin sentezinin azalmasına neden olabilir. Bizim migren ve gerilim tipi hasta grubunda elde ettiğimiz anlamlı düşük vit B₆ sonuçları, bu vitaminin AADC'nin

kofaktörü olması nedeniyle enzim aktivitesindeki düşüklüğü doğrular niteliktedir.

Oksidatif stresin migren ve gerilim tipi baş ağrısı patogeneğinde varlığı gösteren çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır.¹⁵⁰⁻¹⁵⁴ Migrende görülen ataklar üç faza ayrılabilir; 1) nöronal hipereksitabiliteyle karakterize olan tetikleyici faz, 2) altta yatan nedenin kortikal yayılım depresyonu olduğu düşünülen aura fazı ve 3) kranial vazodilatasyonun neden olduğu ağrı fazı. NO ve ROS serebral kan akışını ve enerji metabolizmasını regüle ederek her üç fazda da rol oynayabilir ve migren atakları için tetikleyici eşiği oluşturabilir.^{155,156}

Vitamin B₆'nın antioksidatif özelliklerini gösteren çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır. Bu çalışmaların tamamında B₆ vitamerlerinin oksidatif stresi baskıladığı rapor edilmiştir.⁶²⁻⁶⁴ Oksidatif stres, oksidasyon reaksiyonları ile antioksidatif mekanizmalar arasındaki dengenin oksidasyon lehine bozulmasıdır. Antioksidatif mekanizmalar oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türlerinin ve diğer ürünlerin oluşumunu engelleyerek oksidatif hasarı en aza indirirler.¹⁵⁷ Vitamin B₆'nın da antioksidan özelliğini, reaktif oksijen¹⁵⁸ ve reaktif karbonil türlerini yakalayarak¹⁵⁹, metal iyonları ile şelasyon¹⁶⁰ yaparak ve GSH sentezini artırarak veya devamlılığını sağlayarak¹⁶¹ gerçekleştirdiği gösterilmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz düşük vitamin B₆ düzeyleri bu hastalık gruplarının (migren ve gerilim tipi baş ağrısı) patogeneziyle ilişkili olduğu düşünülen oksidatif streste, antioksidan mekanizma yetersizliğinin göstergesi olabileceğini de düşündürmektedir.

5.2. Migren ve Gerilim Tipi Baş ağrısında Serum Vitamin B₁₂, Holo-TC Folik Asit, Eritrosit İçi Folik Asit, Homosistein ve Metilmalonik Asit Düzeyleri

Vitamin B₁₂ ve FA vücutta çok önemli fonksiyonlara sahip iki mikro besindir. Özellikle beyin dokusu vitamin B₁₂ ve FA eksikliklerine oldukça duyarlıdır. Bu vitaminler normal beyin fonksiyonları için gereklidirler. Miyelin ve nörotransmitterler gibi nöroaktif maddelerin transmetilasyonu bu vitaminlerin eksikliğinde bozulur.¹⁶²

Vitamin B₁₂ merkezi kobalt atomunu çevreleyen tetrapirrol halkası ve bu atoma bağlı nükleotid yanzincir ve farklı gruplardan oluşan molekülün genel adıdır. Kobalta bağlı farklı gruplara göre adlandırılır: bağlı olan grup metil (metilkobalamin), hidroksil (hidroksikobalamin), su (aquakobalamin), siyanid (siyanokobalamin) veya 5-deoksiadenozil (deoksiadenozil kobalamin) olabilir.⁷³ Serumdaki predominant vitamin B₁₂ formu metilkobalamin, sitozolde ise adenzilkobalamindir. İmmünokimyasal yöntemler, tüm formları siyanokobalamine dönüştürdükten sonra total vitamin B₁₂ ölçerler.⁸⁷

Vitamin B₁₂'nin vücutta absorpsiyon ve trasportunu sağlayan çeşitli taşıyıcı proteinler vardır. IF midenin parietal hücrelerinden salınan ve vitamin B₁₂'nin bağırsaklardan emilimi için gerekli olan proteindir. Bunun yanında transkobalamin olarak adlandırılan üç taşıyıcı proteini daha vardır. Transkobalamin I (R proteini veya rapid protein olarak da bilinir) çoğu vücut sıvılarında bulunur. Transkobalamin II plazmada bulunur ve B₁₂'yi hücre yüzeyinde bulunan reseptörlere taşır. Dolayısıyla transkobalamin bağlı vit B₁₂, biyolojik olarak aktif olan vitamin formunu oluşturur. Bazı araştırmacılar serum holo-TC ölçümünün vitamin eksikliğinin en iyi göstergesi olabileceğini belirtmektedirler. Holo-TC ölçümünün, total vitamin B₁₂ ölçümünden klinik olarak daha anlamlı olduğu, sadece TCII bağlı vitamin B₁₂'nin hücrelerce alınabildiği bilgisine dayanmaktadır.¹⁶³

Vitamin B₁₂'nin vücutta iki majör metabolik rolü vardır; a) homosisteinden metiyonin sentezi (metiyonin sentaz kofaktörü metilkobalamin) ve b) metilmalonil KoA'nın süksinil KoA'ya dönüştürülmesi (metilmalonil KoA mutaz, kofaktörü adenozykobalamin). Alınan vitamin B₁₂'nin metabolik olarak aktif hale gelebilmesi için bu izoformlarına dönüştürülmesi gerekir. Vitamin B₁₂ eksikliğinde veya bu reaksiyonlarla ilgili enzim defektlerinde hücrelerde metiyonin sentezlenemez, homosistein birikir ve metilmalonil KoA, süksinil KoA yerine MMA'ya dönüşür. Genellikle vitamin B₁₂ eksikliğinde Hcy'nin özgüllüğü MMA'ya göre daha düşüktür. Çünkü Hcy aynı zamanda folat eksikliği, tiyamin ve vit B₆ eksikliğinde de artabilmektedir.¹¹⁰

NO, yarı ömrü birkaç saniye olan, labil bir moleküldür. Esas olarak endotelde sentezlenir.¹⁶⁴ Doku oksijeni tarafından süratle stabil son ürünü olan nitrat ve nitrite oksidize olur. NO, sonuçta baş ağrısı ile sonuçlanabilen, nörojenik kranial damar inflamatuvar cevabın başlaması veya uzamasında önemli bir aracı olarak ortaya çıkar. Serebral damarlarda NO, perivasküler afferentleri uyarır ve sensitize eder.¹⁶⁵ NO'nun migren ataklarında vazodilatasyon gibi biyolojik süreçlerde modülatör rolü olabileceği önerilmiştir.¹⁶⁶

İnsanlarda vitamin B₁₂ aktif formu olan metilkobalamin ve adenzilkobalaminin yanında dolaşımda hidroksikobalamin de bulunur. Hidroksikobalaminin bir NO yakalayıcı olduğu gösterilmiştir. Bu bilgidan yola çıkılarak B₁₂'nin migrende yararlı olabileceği hipotezi ileri sürülmüştür. Van der Kuy ve arkadaşları yaptıkları çalışmada intranazal hidroksikobalamin uygulanan 19 migren hastasında hastaların %53'ünde migren atak sıklığının %50 azaldığı gösterilmiştir.¹⁶⁷ Aynı zamanda L-argininden, L-sitrüllin ve NO oluşumunu katalizleyen nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesinin de normal ve patolojik durumlarda regülasyonunda endojen kobalaminlerin önemli rol oynayabileceği vurgulanmıştır.¹⁶⁸

Migren profilaksisinde vitamin B₁₂ önerilmesine karşın migrenli hastalarda vitamin B₁₂ eksikliğini araştıran az sayıda çalışma yayınlanmıştır.^{138,169} Yaptığımız çalışmada migren, migren alt grupları (aurasız, auralı migren) ve gerilim tipi baş ağrısı hasta grubu ile kontrol grubu total vitamin B₁₂ ve holo-TC değerleri açısından anlamlı fark bulunmadı (tüm gruplar ve değişkenler için p>0.05). İpçioğlu ve

arkadaşlarının¹⁶⁸ yaptıkları çalışmada benzer bulgularla, serum total vitamin B₁₂ düzeyleri için migrenli hasta grubunda anlamlı bir farkın olmadığını vurgulanmaktadır.

Serum vitamin B₁₂ ve holoTC dolaşımdaki vitamin B₁₂ konsantrasyonlarını yansıtır. Bu biyobelirteçler ciddi eksiklikten yeterliliğe, geniş vitamin B₁₂ durumunu ile ilişkilidirler.¹⁷⁰ Vitamin B₁₂ rutin olarak otomatize immünokimyasal yöntemlerle ölçülmektedir. Ancak bu ölçümlerin yetersiz özgüllük ve duyarlılıkları nedeniyle sınırlamaları vardır. Ölçüm prosedür hataları ve diğer teknolojik problemler yanlış yüksek veya düşük biyobelirteç sonuçlarının alınmasına neden olabilmektedir.¹⁶⁹ Bu faktörler biyobelirteçlerin duyarlılık ve özgüllüklerini etkileyebilmekte ve vitamin B₁₂ eksikliğinin değerlendirilmesinde yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçların alınmasına neden olabilmektedir.

Vitamin B₁₂ konsantrasyonu için eşik değer olarak 200 pg/mL (148 pmol/L) ve 271 pg/mL (200 pmol/L) kabul edilmektedir. 200 pg/mL'lik eşik değer kullanıldığında klinik vitamin B₁₂ eksikliği olan %3-5 hastanın atlandığı, bununla birlikte 271 pg/mL'lik eşik değerde tüm hastaların yakalandığı ancak daha çok yanlış pozitif sonuçların alındığı belirtilmektedir.¹⁶⁹ Bizim çalışmamızda 200 pg/mL ve 271 pg/mL'lik eşik değerler esas alındığında yapılan vitamin B₁₂ yetersizlik sınıflamasında hasta grupları ile kontrol grubu arasında herhangi bir farkın olmadığı gözlemlendi (sırasıyla aurasız migren grubu %10, %35; auralı migren grubu %20, %43; gerilim tipi baş ağrısı hasta grubu %0, %40; kontrol grubu %12 ve %40).

Plazma vitamin B₁₂, iki proteine bağlanarak taşınır, TC ve haptokorrin. TC dolaşımdaki vit B₁₂'nin çok az bir kısmını taşır ve proteinin yaklaşık %10'u vitamin B₁₂ ile saturedir. TC vitamin B₁₂'yi vücuttaki tüm hücrelere taşır ve günde yaklaşık 4 nmol'lük vitamin B₁₂ transportundan sorumludur.¹⁶³ Sadece bu proteine bağlı olan vitamin B₁₂'nin hücreler tarafından alınabilir olması, total vitamin B₁₂ ölçümünden (transkobalamin ve haptokorrine bağlı olan tüm vitamin B₁₂) ziyade holo-TC ölçümünün klinik olarak daha anlamlı olabileceği düşüncesini güçlendirmiştir.¹⁷¹

Çalışmamızda migren (auralı ve aurasız) ve gerilim tipi baş ağrısı hasta gruplarında ölçtüğümüz holo-TC değerleri kontrol grubuna göre düşük olmasına rağmen (sırasıyla ort $\pm$ ss değerleri; 35 $\pm$ 16, 37 $\pm$ 16, 34 $\pm$ 18, 33 $\pm$ 11.5 ve 40 $\pm$ 16 ve sırasıyla; p=0.912, p= 0.787, p=0.833, p= 0.082) hiçbir grupta anlamlı farklılık göstermedi. Dolayısıyla bu hasta grupları için serumda direkt vitamin B₁₂ durumunu gösteren belirteçlerde anlamlı değişiklik olmadığı söylenebilir.

L-metilmalonil KoA'nın, kofaktör olarak adenzilkobalaminin kullanıldığı metilmalonil KoA mutaz enzimi ile izomerizasyonu ve bu reaksiyonun FA metabolizmasından bağımsız olması, kobalamin eksikliğinin değerlendirilmesinde biyobelirteç olarak MMA'nın cazibesini artırmıştır. Serum veya plazmada ölçülen MMA konsantrasyonu sıklıkla kobalamin eksiklik belirteci olarak kullanılır. Kobalamin eksikliğinden başka MMA artışına neden olan, bilinen, birkaç klinik durum vardır. Bozulmuş böbrek fonksiyonları dışında, dehidrasyon durumları, kalıtsal metilmalonik asidüriler ve MMA'nın öncül molekülü olan propiyonik asit

üretimine neden olan ince bağırsak aşırı bakteri üremesi bunlar arasında yer alır.¹⁷²

Çalışmamızda hem migren hem de gerilim tipi baş ağrısı hastalık gruplarında plazma MMA konsantrasyonları kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p=0.014$ ve $p=0.006$). Migren hasta grubu aurasız ve auralı migren olarak ayrıldığında aurasız migren hasta grubunda anlamlılık varken ($p=0.015$) auralı migren hasta grubunda MMA konsantrasyonları kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.087$). Bu durum serum direkt vitamin B12 bulguları ile çelişkili gibi görülmektedir.

Populasyon çalışmalarında MMA artışı, düşük kobalamin konsantrasyonlarından ziyade, daha sık karşılaşılan bir durumdur. Eşik değer seçimi bu sıklığın belirleyicisidir, ancak bu uyumsuzluk kobalamin eksikliğinde MMA'nın diğer kobalamin eksiklik belirteçlerinden daha üstün hassasiyeti olduğunu düşündürür¹⁷³. En yaygın kullanılan MMA eşik değeri >270 nmol/L olarak belirtilmektedir. Bu eşik değeri esas alındığında bizim çalışmamızda aurasız migren, auralı migren, gerilim tipi baş ağrısı ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin >270 nmol/L MMA %'leri sırasıyla; %50, %33, %60 ve %20 idi. >370 nmol/L eşik değeri kullanıldığında ise %'ler sırasıyla; %30, %12, %47 ve %0 idi. Bulgumuzda dikkat çekici nokta gerilim tipi baş ağrısına sahip hastaların her iki eşik değeri de oldukça yüksek %'ye sahip olmasıydı. Gerilim tipi hasta grubunun ağrı sıklığı (19 ± 11 atak/ay) aurasız ve auralı migren grubunun ağrı sıklığından (sırasıyla; 5.0 ± 6.5 ve 5.8 ± 7.8) daha yüksekti. Dolayısıyla bu bulgumuz

MMA'nın oluşturduğu nörotoksik mekanizmaların, gerilim tipi başağrısı hasta grubunda daha çok olmak üzere, her iki hastalık grubunda, ağrı patogenezinde rol oynayabileceği düşündürmektedir.

Herbert 1994 yılında vitamin B₁₂ eksikliğinin dört evrede incelenebileceğini vurguladı.¹⁷⁴ Bu öneriye göre evre I ve II'de plazma ve hücre depolarının tükenmeye başlar. Düşük plazma holo-TC bu evrenin göstergesidir. Evre II'de haptokorrin düzeyi azalır. Evre III'de vitamin B₁₂ eksikliği fonksiyonel dengesizlikleri ortaya çıkar. Artmış MMA ve Hcy düzeyleri elde edilir. Evre IV'de ise klinik bulgular kendini göstermeye başlar, makroovalositoz, artmış MCV ve eritrosit ve Hb düzeyleri azalmaya başlar.

Subklinik fonksiyonel vitamin B₁₂ eksikliğinin genel popülasyonda beklenenden daha yüksek olduğu vurgulanmaktadır.¹⁷⁵ Serumda ölçülen total vitamin B₁₂, vitamin B₁₂ durumunun hücreler düzeyinde ne olduğunu yansıtmayabilir. Dolayısıyla serum total vitamin B₁₂ ölçümü, bireyde vitamin B₁₂ durumunun belirlenmesinde güvenilir olmayabilir. Metabolik çalışmalar; asemptomatik hastalarda veya sağlıklı görülen bireylerde ölçülen çok düşük vitamin B₁₂ konsantrasyonlarının, fonksiyonel vitamin B₁₂ eksikliğiyle ilişkili olduğunu doğrulamıştır.¹⁷⁵ Ancak bir popülasyonda vitamin B₁₂ durumunun değerlendirirken, normal holo-TC, vitamin B₁₂, Hcy veya MMA değerlerinin, vitamin B₁₂ eksikliğinden ziyade, yanlış yeterli durum olarak değerlendirilebileceği akılda bulundurulmalıdır. Aynı şekilde bunun tersi durumun da, yanlış yetersiz

durum olarak değerlendirilebileceği unutulmamalıdır.¹⁷⁰ Aynı durum migren ve gerilim tipi baş ağrısı hasta grupları için de geçerlidir.

FA metabolizmasıyla ilişkili MTHFR ve timidilat sentaz genlerindeki polimorfizmlerin migren riskini artırdığı ve FA metabolizmasının migren patogenezinde rolü olabileceği ileri sürülmüştür.¹⁷⁶ Bu bilgidan yola çıkarak biz de çalışmamızda hasta ve kontrol gruplarımızda serum FA, EFA (HEFA ve DEFA) ve Hcy düzeylerini de ölçtük. Ancak hasta ve kontrol grupları arasında ölçülen bu parametrelerde anlamlı bir farklılık bulamadık. Yüksek plazma homosisteini terimi (HHcy), Hcy'nin >15 µmol/L olduğu durumlar için kullanılmaktadır.¹²² Bizim çalışmamızda aurasız migren ve gerilim tipi baş ağrısı hasta grubunda hiçbir hastanın Hcy değerinin >15 µmol/L değerini aşmadığı görüldü. Bununla birlikte auralı migrende 4, kontrol grubunda ise 2 hastanın >15 µmol/L Hcy değerine sahip olduğu tespit edildi. Tüm grup içerisinde en yüksek Hcy değerinin 22.4 µmol/L ile auralı migren hasta grubunda olduğu gözlemlendi.

MTHFR enzimi, 5,10-MTHF'ı indirgeyerek FA'in dolaşım formu olan 5-MTHF'yi oluşturur. 5-MTHF aynı zamanda Hcy'nin, reaktif tiyol amino asiti, metiyonine remetilasyonunda da kullanılır. Dolayısıyla enzim aktivitesinde azalmaya neden olacak MTHFR genindeki bir mutasyon plazma Hcy konsantrasyonunda artışa neden olacaktır.¹²² Hcy ile ilişkili endotel disfonksiyonunun migrenin başlaması ve devamlılığıyla ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Endotel disfonksiyonu Hcy'nin endotel

üzerinde direkt hasarlandırıcı etkisi ve oksidatif durumu değiştirmesinin sonucunda gelişebilir.¹²²

Kowa ve arkadaşları Japon bireylerde¹²³ , Kara ve arkadaşları ise Türk populasyonunda¹²⁴ migren ile MTHFR C677T mutasyonu arasında ilişki olduğunu ileri sürmüşlerdir. Lea ve arkadaşları¹²⁵ ise beyaz ırkta MTHFR C677T mutasyonunun aurasız migrenle değil auralı migrenle ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte Finlandiya'da yapılan populasyon temelli bir çalışmada¹⁷⁷ migren ile MTHFR C677T polimorfizmi arasında bir ilişki bulunamamıştır. MTHFR polimorfizminin migrende sıklığı gibi literatürde Hcy düzeyleriyle ilgili de çelişkili yayınlar bulunmaktadır.¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ Bazı yayınlarda auralı migren hastalarının kontrollerden daha yüksek Hcy düzeylerine sahip oldukları rapor edilmiştir, Scher ve arkadaşları¹⁷⁸ ise aurasız migren ayırımı yapmadan değerlendirme yapmışlar ve bir fark bulamamışlardır. Oterino ve arkadaşları¹²⁶ ise cinsiyet düzeltmesi yaptıktan sonra auralı migren hastalarında aurasızlara göre anlamlı yüksek Hcy düzeyleri bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise migrenli hasta grupları auralı ve aurasız migren olarak ayrıldığında ve cinsiyet düzeltmesi yapıldığında da gruplar arasında Hcy düzeylerinde anlamlı bir fark bulunmadı (her hasta grubu için $p>0.05$). Gerilim tipi baş ağrısı ile MTHFR gen mutasyonu ve Hcy düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştıran sınırlı sayıda çalışma vardır. Kara ve arkadaşları¹²⁴ yaptıkları çalışmada Türk populasyonunda gerilim tipi baş ağrısı grubunda da, migrende olduğu gibi, MTHFR C677T mutasyon sıklığının yüksek olduğunu bulmuşlar ancak bu çalışmada Hcy konsantrasyonlarını ölçülmemişlerdir. Çalışmamızda gerilim tipi baş ağrısı hasta grubunda da, migren gruplarında olduğu gibi, Hcy düzeyleri kontrol grubuna göre farklı değildi ($p>0.05$). Çalışmamızda her iki hasta grubu için

de MTHFR gen polimorfizmleri değerlendirilmedi. Bu, çalışmamızdaki sınırlamalardan birisidir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz normal total vitamin B₁₂, holo-TC düzeyleri ve Hcy ile artmış MMA düzeyleri migren ve gerilim tipi baş ağrısı hasta gruplarında fonksiyonel vitamin B₁₂ eksikliğinin aşıkâr göstergesidir. Yapılan ROC analizlerinde tüm parametreler içerisinde, MMA'nın eğri altında kalan alan değeri (AUC) her iki hastalık grubu için de diğer parametrelerden daha yüksek ve anlamlı idi (sırasıyla migren hasta grubu için MMA AUC: 0.663 ve p=0.023, gerilim tipi baş ağrısı hasta grubu için MMA AUC:0.767 ve p=0.006, primer baş ağrısı sendromu için (migren+gerilim tipi baş ağrısı) MMA AUC: 0.687 ve p=0.007). Eşik değeri olarak 270 nmol/L alındığında migren ve gerilim tipi baş ağrısı hasta gruplarında MMA'nın fonksiyonel vitamin B₁₂ eksikliği için duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla; %41 ve %79, %60 ve %79, iken eşik değeri 370 nmol/L alındığında duyarlılık ve özgüllükler sırasıyla; %26 ve %100, %47 ve %98, olarak bulunmuştur. Bu bulgularımız klinik anlamda bu hasta gruplarında vitamin B₁₂ eksikliğinin gösterilmesinde MMA'nın daha etkin bir belirteç olduğunu düşündürmektedir.

Bununla birlikte her iki hastalık grubunda Hcy yüksekliğinin olmaması çelişki gibi görülebilir. Ancak bu bulgumuz bu hasta gruplarında FA eksikliğinin olmaması [genel popülasyonda homosistein yüksekliğinin majör nedeni FA eksikliğidir]¹⁸¹ ile açıklanabildiği gibi, Hcy metabolizmasında kofaktör olarak yer alan metilkobalaminin de eksik olmadığının göstergesi olabilir. MMA'da artışa neden olan reaksiyonla

ilişkili enzim (MCM) kofaktör olarak adenzilkobalamini kullanmaktadır. Dolayısıyla MMA'daki artış diğer vitamin B12 gruplarının (siyanokobalamin, hidroksikobalamin, metilkobalamin gibi) eksikliğinden ziyade adenzilkobalamin eksikliğinin göstergesi olarak değerlendirilebilir.

NO'nun migren ve gerilim tipi baş ağrısı patogenezinde rolü olabileceğini gösteren çalışmalar vardır.^{151,153,164,165} Yapılan çalışmalarda NO ve nitroz oksitin MCM'nin potent inaktivatörü olduğu gösterilmiştir. MCM'nin NO varlığında aktivitesini %50 kaybettiği rapor edilmiştir. Bu önemli bir noktadır çünkü NO pasif difüzyonla sitoplazmadan mitokondriye geçer. Dolayısıyla mitokondri matriksinde çalışan bir enzim olan MCM hatırı sayılır ölçüde NO'ya maruz kalır.¹⁸² Bu yolla bir enzim inaktivasyonu migren ve gerilim tipi baş ağrısı hastalarında MMA artışına neden olabilir. Ayrıca ATP:kobalamin adenziltransferaz, AdoCbl oluşturmak üzere ATP'den kobalamine adenzin transfer eder. Migrende mitokondri enerji metabolizmasının bozulduğunu gösteren çalışmalar vardır.¹⁸³ Benzer bozukluğun gerilim tipi baş ağrısı için de geçerli olduğu düşünülebilir.¹⁸⁴ Her iki hastalık grubunda yetersiz ATP sentezi, adenzilkobalamin oluşumunu engelleyerek MCM aktivitesini azaltabilir. Böylece MCM aktivitesindeki azalma yeniden MMA artışına neden olabilir. Dolayısıyla reaksiyonun bir kez bozulmuş olması kısır döngü ile MMA sentezinde artışa neden olacaktır.

5.3. MMA'nın Migren ve Gerilim Tipi Baş ağrısı Patogenezinde Olası Rolü

MMA, metabolik dengenin bozulması durumunda dokularda oluşur ve plazma ve beyin omurilik sıvısına (BOS) taşınır.¹⁸⁵ MMA için üst referans değeri kanda 270 nmol/L, BOS'da 590 nmol/L olarak verilmektedir. Bizim çalışmamızda her iki hastalık grubunda eşik değere göre oldukça yüksek serum MMA değerleri elde edilmiştir (aurasız migren: M= 297 nmol/L; auralı migren: M= 221 nmol/L; GTBA: M= 485 nmol/L ve kontrol grubu: 116 nmol/L).

MMA predominant olarak MCM aktivitesinin yüksek olduğu karaciğer ve böbrek dokularında sentezlenir. Aynı zamanda kaslarda ve beyinde de sentezlendiği düşünülmektedir.¹⁸⁵ Beyinde az miktarda sentezlenmesine rağmen metilmalonik asidemide ortaya çıkan nörodejnerasyonun bu metabolitin beyinde birikmesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Kan beyin bariyeri, aslında MMA gibi dikarboksilik asitlere geçirgen değildir, bu bileşikler santral sinir sisteminde tuzaklanmaktadır. Merkezi sinir sisteminde monokarboksilik asitler ve amino asitler için çeşitli transport sistemleri tanımlanmış olmasına rağmen, dikarboksilik asitlerin sisteme giriş çıkışı sınırlı gerçekleşmektedir.¹⁸⁶ Gerçekten de dikarboksilik asitler için organik anyon taşıyıcıları 1 ve 3'ün (OAT1 ve OAT3) beyin kapiller endotel hücrelerinde zayıf ekspresyonu gösterilmiştir.¹⁸⁷ İlginç olan bir diğer bulgu da mitokondri matriksinin ekstramitokondriyal çevreden 3-9 kat yüksek MMA konsantrasyonuna

sahip olmasıdır.^{185,188} Bu bulgu mitokondrilerin, neden MMA'nın toksik etkilerine maruz kaldığının göstergesi olabilir.

Migren hasta grubunda yapılan çalışmalarda kontrol grubuna göre ölçülen yüksek laktat ve prüvat konsantrasyonları¹⁸⁹ mitokondriyal enerji yetmezliğinin göstergesi olarak değerlendirildi. Kanda veya BOS'ta ölçülen yüksek laktat konsantrasyonu, non spesifik olmasına rağmen, bozulmuş oksidatif metabolizmayı gösterir ve mitokondriyal hastalıkların laboratuvar bulgusudur. Laktik asidoz, prüvatın Krebs döngüsünde bozulmuş kullanımı nedeniyle gelişir. Bu bozukluk prüvatın konsantrasyonunda artışa neden olurken prüvat da laktat dehidrogenaz enzimi ile laktata dönüştürülür.¹⁹⁰

Fosfor manyetik rezonans spektroskopi (³¹P MRS) yöntemi ATP üretiminin etkinliğini değerlendirmeye yarayan ve beynin in vivo enerji metabolizmasının değerlendirilmesine olanak sağlayan, girişimsel olmayan bir yöntemdir. Mitokondriyal oksidatif fosforilasyon, hücre fonksiyonlarının biyoenerjitik ihtiyaçlarını takiben başlar. Anaerobik şartlarda veya mitokondriyal enzimlerin hemen hemen tam doygunluk durumunda ATP, inorganik fosfatın adenosin difosfata (ADP) transfer edilmesiyle sentezlenir. ³¹P MRS yöntemi kullanılarak mitokondriyal fonksiyonellik, intraselüler relatif fosfokreatin, Pi ve ADP konsantrasyonları ve PCr/Pi oranı gibi bazı parametreler kullanılarak hücrelerin enerji durumları değerlendirilir.¹⁹¹ Migrenli hasta grubunda yapılan MRS çalışmaları migren ve mitokondriyal yetmezlik arasındaki ilişkiyi göstermiştir.¹⁹¹ Littlewood ve arkadaşları migren hastalarının

trombositlerinde monoamin oksidaz ve süksinat dehidrogenaz gibi bazı mitokondriyal enzim aktivitelerinin azaldığını göstererek metabolik disfonksiyon için kanıt sağladılar.¹⁹²

Metilmalonik asidürde, MMA'ya bağlı sistemik ve nörolojik bulguların, bu organik asitin dokularda ve biyolojik sıvılarda birikmesine ve sonuç olarak enerji metabolizmasının bozulmasına ve redoks dengesizliğine bağlı olduğu düşünülmektedir.¹⁹³⁻¹⁹⁵ MMA'nın mitokondriyal fonksiyonlara etkisi primer olarak enzim aktivitelerinin ve transport sistemlerinin inhibisyonuna dayanır^{194,196,197} ve mitokondriyal solunum etkilenir. MMA'nın kompleks II ve β -hidroksibütirat dehidrogenazı inhibe ettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. MMA'nın bu sistemler üzerinde görülen çoğu etkisi, yarışmalı inhibitör özelliğine dayanmaktadır.

Bizim bulgularımızda elde ettiğimiz yüksek serum MMA konsantrasyonları daha önce tespit edilen mitokondriyal enerji metabolizma yetmezliğinin sebebi olabilir. Her iki hastalık grubunda da geçerli olmak kaydıyla, özellikle gerilim tipi baş ağrısı hasta grubunda elde edilen yüksek MMA konsantrasyonları ile atak sıklığı birlikteliği MMA artışına bağlı yetersiz ATP sentezi sonucunda gelişmiş olabilir. Bu sonuçlar migren ve gerilim tipi baş ağrısında nörotoksisitenin bir kısmından, vitamin B₁₂ eksikliği ile ilişkili MMA birikiminin sorumlu olabileceğini düşündürmektedir.

5.4. MMA Ölçüm Yönteminin Performans Değerlendirilmesi

Serum/plazma veya idrarda ölçülen MMA'nın 30 yıldan beri kobalamin eksiklik belirtici olarak kullanılması önerilmektedir.^{136,137,198,199} Serum örneklerinin kullanılması, paralel kobalamin ölçümünde de aynı matriksin kullanılıyor olması nedeniyle avantajlıdır. Her ne kadar idrar örnekleri daha yüksek konsantrasyonda MMA içeriyor olsa da, serum MMA'nın diyetten daha az etkilenmesi, idrara örneklerine göre daha avantajlı olmasını sağlamaktadır. Ayrıca idrar MMA sonuçlarının değerlendirilebilmesi için ilave olarak kreatinin ölçümüne de ihtiyaç duyulması dezavantaj olarak değerlendirilmektedir.^{136,137} Bu nedenle biz de çalışmamızda serum MMA ölçümünü tercih ettik. Serum MMA ölçümünde dikkat edilmesi gereken nokta, bozulmuş böbrek fonksiyonlarının, azalmış idrar MMA atılımına neden olacağı için, yanlış pozitif sonuçların alınmasına neden olmasıdır. Çalışmamızda hasta ve kontrol grupları arasında ölçtüğümüz serum kreatinin değerleri arasında anlamlı fark olmaması ile, bu olasılığı da dışlamış olduk.

Serum, plazma, idrar ve BOS'ta MMA ölçümünde GC-MS, LC-MS/MS, HPLC ve kapiller elektroforez yöntemleri geliştirilmiştir.²⁰⁰⁻²⁰³ Bununla birlikte kütle spektrometri tekniği daha çok kullanılmaktadır. Aslında MMA hidrofilik ve uçucu olmayan bir bileşik olmasına rağmen, serum MMA ölçümünde üstesinden gelinmesi gereken ana engel, MMA'nın düşük fizyolojik serum konsantrasyonlarıdır. Ayrıca fizyolojik konsantrasyonu MMA'dan 50 kat daha fazla olan yapısal izomeri süksinik asitten kromatografik separasyonu da son derece önemlidir. Dolayısıyla

MMA'nın direkt analizi çok mümkün değildir. Bu nedenle pek çok yöntemde kati faz ayrıştırma, derivatizasyon, uçurma, ultrafiltrasyon gibi zaman alıcı ve zahmetli örnek hazırlama prosedürlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Dolayısıyla serum MMA ölçümünde daha hızlı ve daha az zahmetli sonuç alınabilecek yöntem arayışları devam etmektedir.²⁰⁴

Son yıllarda, serum MMA ölçümünde, MMA'nın düşük endojen konsantrasyonları, yüksek polaritesi, düşük molekül ağırlığı, düşük pKa'sı ve dikarboksilik asit yapısı nedeniyle ölçümünde LC-MS/MS uygulamalarına ilgi artmıştır. Biz de çalışmamızda MMA'nın serum, plazma ve idrar örneklerinde rutin analizine olanak sağlayan ESI LC-MS/MS yöntemini kullandık (Receipe ClinMass Methylmalonic acid in serum plasma and urine). Yöntemi Zivak® Technologies TandemGOLD ESI LC-MS/MS sistemine uyarladık. Bu prosedürde örnek hazırlaması basit ve hızlı idi. Kalibrasyon, vitamin B₁₂ eksikliği olan ve olmayan bireylerdeki MMA konsantrasyonları kapsayan kalibratör konsantrasyon aralığında yapıldı. Kantitatif yöntemde, örnek ve cihaz değişkenliğini düzeltmek için internal standart olarak d3-MMA kullanıldı. Azami duyarlılık ve doğruluğu sağlamak amacıyla örnekler turbo iyon sprey kaynağı kullanılarak analiz edildi.

Yöntemin performans değerlendirilmesinde: elde edilen kalibrasyon eğrisinden, yöntemin çalışmada kullandığımız klinik örneklerin tamamını kapsayan 21-1499 nmol/L'lik MMA konsantrasyonu arasında oldukça lineer olduğu tespit edildi. Tekrarlanabilirliği hem çalışma içi (düşük ve yüksek kontroller için %VK sırasıyla %3.5 ve %4.1) hem de

günler arasında (düşük ve yüksek kontroller için %VK sırasıyla %2.1 ve %3.1%VK), ortalama %100'lük %R değeri, ve LoD ve LoQ değerleri literatürle uyumlu²⁰⁴⁻²⁰⁵ ve kabul edilebilir aralıkta idi.

5.5. Sonuç

Tek karbon metabolizması nörolojik hastalıkların patogenezinde oldukça önemli bir metabolizmadır. Bu metabolizmada yer alan vitaminler ve bu vitaminlerin eksiklikleri sonucunda oluşan metabolik son ürünler organizmada son derece önemli rollere sahiptir. Çalışmamız, tek karbon metabolizmasında yer alan ana vitaminlerin (vitamin B₆, B₁₂ ve folik asit) ve metabolitlerinin (Hcy ve MMA) migren ve gerilim tipi baş ağrısı hastalık gruplarında ilk kez ölçülmesi ve değerlendirilmesi açısından önemlidir. Bulgularımıza göre migren ve gerilim tipi baş ağrısında fonksiyonel vitamin B₁₂ eksikliğinin göstergesi olan MMA artmaktadır. MMA'nın sahip olduğu nörotoksik mekanizmalar nedeniyle bu hastalık gruplarında ve baş ağrısı patogenezinde olası rolünün göz önünde bulundurulmasının önemli olacağı kanaatindeyiz. MMA artışına neden olan vitamin B₁₂ eksikliğinde, diğer vitamin B₁₂ türlerinden ziyade adenzilkobalamin eksikliği ihtimalinin göz ardı edilmemesi gerektiğini düşünmekteyiz. Vit B₁₂ eksikliğinde kullanılan preparatlar daha çok siyanokobalamin içermektedir. Ancak bunun alınması MMA artışını engellemeyebilir, çünkü adenzilkobalamin sentezine neden olan reaksiyonların ve kofaktör olarak bunu kullanacak enzimlerinin yetersizliği göz ardı edilmemelidir.

Migren ve gerilim tipi baş ağrısında vitamin B₆ eksikliği de tespit edilmiştir. Vitamin B₆'nın tek karbon metabolizması yanında migren ve gerilim tipi baş ağrısı patogenezinde ve farmakolojisinde önemli olduğu düşünülen serotonerjik sistemde yer alan enzimlerin kofaktörü olması açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz. Bu vitaminin eksikliği serotonin gibi son derece önemli moleküllerin sentezini aksatabilir. Bunun yanında vitaminin antioksidan özellikleri nedeniyle organizmanın oksidan strese karşı kendini savunmasına katkı sağlamaktadır. Migren ve gerilim tipi baş ağrısı hastalıklarının patogenezinde oksidatif stresin önemli rol oynadığını gösteren çalışmalar vardır. Sonuç olarak eksikliği bulunan antioksidanların eksikliklerinin giderilmesinin, ağrı patogenezinde, önemli olacağı kanaatindeyiz.

Serum MMA konsantrasyonu ölçümünde ESI LC-MS/MS tekniği gibi ileri tekniklere ihtiyaç duyulsa da artık günümüzde, klinik laboratuvarlarda bu tekniklerin her geçen gün yaygınlaştığı göz ardı edilmemelidir. Kullandığımız yöntem örnek hazırlama prosedürünün kolay ve hızlı, sonuç alma süresinin kısa oluşu ve performans özellikleri açısından rutin kullanım için uygundur.

6. ÖZET

Migren ve Gerilim Tipi Başağrısında Vitamin B₆, Vitamin B₁₂ ve Folik Asit Eksikliğinin Önemi

Migren ve gerilim tipi başağrısı toplumda sık görülen, önemli bir sağlık ve sosyoekonomik sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada; vitamin B₆, vitamin B₁₂ ve FA eksikliklerinin ve eksiklik belirteçlerinin (holo-TC, EFA, MMA ve Hcy) her iki hastalığın patogeneğinde önemli olup olmadıklarının araştırılması; fonksiyonel vitamin B₁₂ eksikliği tanısında kullanılan belirteçlerin klinik performanslarının değerlendirilmesi; ve serum MMA ölçümünde kullanılan ESI LC-MS/MS tekniğinin yöntem geçerliğinin kanıtlanması amaçlandı.

Çalışmaya IHS'nin ICHD-2 kriterlerine göre tanı almış 51 migren [30 aurasız (yaş=39±9; 27K, 3E), 21 auralı migren (yaş=37±8; 17K, 4 E)] ve 15 gerilim tipi başağrısı hastası (yaş=34±9; 8K, 7E) dahil edildi. Kontrol grubu 25 sağlıklı bireyden (yaş=34±9; 16K, 9E) oluşturuldu. Serum vitamin B₁₂, holo-TC, FA ve EFA immünokimyasal yöntemle, plazma vitamin B₆ ve serum Hcy HPLC ile, MMA ESI LC-MS/MS tekniği ile ölçüldü.

Sonuçlarımıza göre her iki hasta grubunda ölçülen vitamin B₁₂, FA, EFA, Holo-TC ve Hcy değerleri kontrol grubuna göre anlamlı değildi. Bununla birlikte vitamin B₆ ve MMA değerleri migren (sırasıyla; p=0.005 ve p=0.014) ve gerilim tipi baş ağrısı hasta grubunda (sırasıyla p=0.013 ve p=0.006) kontrol grubuna göre anlamlı farklı idi. Migren hasta grubu aurasız ve auralı migren olarak ayrı ayrı değerlendirildiğinde aurasız migren hasta grubunda vitamin B₆ ve MMA değerleri kontrol grubuna göre anlamlı farklı iken (sırasıyla; p=0.012 ve p=0.015) auralı migren hasta grubunda sadece vitamin B₆ değerlerinin anlamlı farklı olduğu bulundu (sırasıyla; p=0.008 ve p=0.087). Vitamin B₁₂ eksikliği tanısında kullanılan parametreler (serum vitamin B₁₂, Holo-TC, MMA ve Hcy) için yapılan ROC analizlerinde her iki hasta grubunda serum MMA'nın diğer parametrelere göre tanıda daha etkin olduğu tespit edildi. MMA ölçümünde kullanılan ESI LC-MS/MS yönteminin çalışma içi %VK değerleri, düşük ve yüksek kontrol düzeyleri için sırasıyla %3.5 ve %4.1 ve çalışmalar arası %VK değerleri %2.1 ve %3.1 idi. Geri kazanım çalışmasında ortalama %R değeri %100 ve minimum belirleme sınırının (LoD) 16 nmol/L, ölçüm sınırının (LoQ) ise 52 nmol/L idi.

Sonuçlar migren ve gerilim tipi baş ağrısında vitamin B₆ ve vitamin B₁₂ eksikliğin varlığını göstermektedir. Migren ve gerilim tipi baş ağrısı sendromlarında, MMA vitamin B₁₂ eksikliğin tanısında en etkin belirteç olarak görülmektedir ve vitamin B₁₂ eksikliğinde dokularda biriken MMA, sahip olduğu nörotoksik etkiyle migren ve gerilim tipi baş ağrısı patogenezinde rol oynayabilir. Ayrıca serum MMA ölçümünde kullandığımız ESI LC-MS/MS tekniğinin uygulanabilirlik ve performans özellikleri rutin kullanıma elverişli olduğunu ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler. Migren, gerilim tipi başağrısı, vitamin B₆, vitamin B₁₂, folik asit, tek karbon metabolizması, MMA.

7. SUMMARY

The Importance of Vitamin B₆, Vitamin B₁₂ and Folic Acid Deficiencies In Migraine and Tension Type Headache

Migraine and tension type headaches are common in the community and are important health and socio-economical problems. In this study we were aimed: 1) to investigate the deficiency of vitamin B₆, B₁₂ and folic acid and the deficiency markers (MMA, Hcy, Holo-TC and EFA) of this vitamins whether they are important in the patogenesis of both diseases; 2) to evaluate clinical performance of markers which are used to diagnose functional vitamin B₁₂ deficiency; and 3) to establish the validity of ESI LC-MS/MS method which is used to measure serum MMA levels.

The study was included 51 migraine [30 patients with of migraine without aura (age=39±9; 27F, 3M) and 21 patients of migraine with aura (age=34±9; 8F, 7M)] and 15 tension type headache (age=34±9; 8F, 7M) patients who were diagnosed with IHS's ICHD-2 criterias. Control group was created by 25 healthy persons (age=34±9; 16F, 9M). Analytes were measured with the methods as followed; serum vitamin B₁₂, Holo-TC, FA and EFA with immunochemical methods, plasma vitamin B₆ and Hcy with HPLC and serum MMA with ESI LC-MS/MS.

According to our results, serum vitamin B₁₂, Holo-TC, FA, EFA and Hcy results were not significantly different between patients and control groups. However vitamin B₆ and MMA levels were significantly

different in migraine ($p=0.005$ and $p=0.014$ respectively) and in tension type headache groups ($p=0.013$ and $p=0.006$ respectively) than the control group. When the patients with migraine were assessed separately as migraine without aura and with aura, vitamin B₆ and MMA levels were significantly different between migraine without aura and control groups ($p=0.012$ and $p=0.015$ respectively) however in patients with migraine with aura only vitamin B₆ levels were significantly different from control group ($p=0.008$). ROC analysis of the parameters (vitamin B₁₂, Holo-TC, MMA and Hcy) showed that MMA is the most effective marker for diagnosing deficiency of functional vitamin B₁₂ deficiency in both patient groups. Interassay and intraassay CV% of the ESI LC-MS/MS method for MMA were 3.5% and 4.1% and 2.1% and 3.1%, respectively for low level and high level control materials. Mean R% was 100% and LoD and LoQ were 16 nmol/L and 52 nmol/L, respectively.

Our results indicated the presence of vitamin B₆ and vitamin B₁₂ deficiency in patients with migraine and tension type headache. According to our results, in migraine and tension type headache, MMA was the most effective marker in the diagnosis of functional vitamin B₁₂ deficiency and MMA accumulation in the nervous system may play a role in the pathogenesis of migraine and tension type headache with its neurotoxic effects. In addition ESI LC-MS/MS method which was used for measurement of serum MMA, was suitable for routine use in terms of applicability and performance characteristics.

Key words. Migraine, tension type headache, vitamin B₆, vitamin B₁₂, folic acid, one carbon metabolism, MMA.

8. KAYNAKLAR

1. Vural O. Başığrılı hastaya yaklaşım. T Klin Nöroloji 2003; 1:2: 83-84.
2. Rasmussen BK. Epidemiology of headache. Cephalgia 1995;15: 45-68.
3. Schwartz BS, Stewart WF, Simon D, Lipton RB. Epidemiology of tension type headache. JAMA 1998;279:381-83.
4. Bigal ME, Bordini CA, Speciali JG. Etiology and distribution of headaches in two Brazilian primary care units. Headache 2000; 40:241-47.
5. Dowson A, Dahlof C, Tepper S, Newman L. Prevalence and diagnosis of migraine in patients consulting their physician with a complaint of headache: data from the Landmark Study. Headache. 2004;44:856-64.
6. Headache Classification Committee of the International Headache Society. Classification and diagnostic criteria for headache disorders, cranial neurais and facial pain. Cephalgia 1988; 8 Suppl 7: 1-96.
7. Headache Classification Subcommittee of The International Headache Society. The International Classification of Headache disorders: 2nd edition. Cephalgia 2004; 24 Suppl 1: 9-151.
8. International Headache Society Committee on Clinical Trials in Migraine. Guidelines for controlled trials of drugs in migraine. Cephalgia 1991;11: 1-12.

9. Patterson SM, Silberstein SD. Sometimes Jello helps: perceptions of headache etiology, triggers and treatment in literature. *Headache* 1993; 33: 76-81.
10. Stephen D Silberstein, Richard Lipton, Peter J Goadsby . *Headache in clinical practice* 2nd Edition Isis Medical Media Ltd 2002
11. Jensen K, Tfelt-Hansen P, Lauritzen M, Olsen J. Classic migraine, a prospective recording of symptoms. *Acta Neurologica Scandinavica* 1986;73:359-62.
12. Silberstein SD, Young WB. Migraine aura and prodrome. *Seminars in Neurology* 1995;45:175-82.
13. Manzoni G, Farina S, Lanfranchi M, Solari A. Classic migraine-clinical findings in 164 patients. *Eur Neurol* 1985; 24: 163-69.
14. Cutrer FM. Pathophysiology of migraine. *Semin Neurol* 2006;26:171-80.
15. Moskowitz MA. Neurogenic versus vascular mechanisms in migraine headaches. *Trend Pharmacol Sci.* 1992; 13: 307-11.
16. Goadsby PJ, Lipton R, Ferrari M. Migraine: current understanding and management. *N Engl J Med* 2002; 346: 257-70.
17. Bolay H, Reuter U, Dunn A, Huang Z, Boas D, Moskowitz A. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nature Medicine*, 2002; 8: 136-42.

18. Bolay H, Dalkara H. Birincil baş ağrılarının fizyopatolojisi. T Klin Nöroloji 2003;1: 98-102.
19. Villalon CM, Centurion D, Valdivia LP, de Vries P, Saxena PR. Migraine: Pathophysiology, pharmacology, treatment and future trends. Current Vascular Pharmacology 2003;1:71-84.
20. .Edvinsson L, Goadsby PJ: Neuropeptides in the cerebral circulation: Relevance to headache. Cephalalgia 1995; 15: 272–76
21. Messlinger K, Fisher MJM, Lennerz JK. Neuropeptide effects in the trigeminal system: pathophysiology and clinical relevance in migraine. Keio J Med 2011;60:82–89.
22. Olesen J, Iversen HK, Thomsen LL. Nitric oxide supersensitivity: a possible molecular mechanism of migraine pain. Neuroreport. 1993; 4: 1027-30.
23. Lassen LH, Ashina M, Christiansen I, Ulrich V, Olesen J. Nitric oxide synthase inhibition in migraine. Lancet 1997; 349: 401-2.
24. Reuter U, Bolay H, Olesen I, Chiarugi A, Sanchez del Rio M, Letourneau R, Theoharides T, Waeber C, Moskowitz M. Delayed inflammation in rat meninges: implications for migraine pathophysiology. Brain, 2001; 124: 2490-502.
25. Blau JN. Migraine research. Br Med J 1971;2:751-54.
26. Sicuteri F. Vasoneuroactive substances and their implications in vascular pain. Res Clin Studies Headache 1967; 1: 6-45.

27. Curran DA, Hinterberger H, Lance JW. Total plasma serotonin, 5-hydroxyindolacetic acid and p-hydroxy-methoxymandelic acid excretion in normal and migrainous subjects. *Brain* 1965; 88: 997-1010.
28. Buzzi MG, Moskowitz MA. The antimigraine drug, sumatriptan (GR43175), selectively blocks neurogenic plasma extravasation from blood vessels in dura mater. *Br J Pharmacol* 1990; 99, 202-6.
29. Ferrari MD, Saxena PR. Clinical and experimental effects of sumatriptan in humans. *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14, 129-33.
30. Cumberbatch MJ, Williamson DJ, Mason GS, Hill RG, Hargreaves RJ. Dural vasodilation causes a sensitization of rat caudal trigeminal neurones in vivo that is blocked by a 5-HT_{1B/1D} agonist. *Br J Pharmacol* 1999; 126, 1478-86.
31. Henry P, Auray JP, Gaudin AF, Dartigues JF, Duru G, Lanteri-Minet M et al. Prevalence and clinical characteristics of migraine in France. *Neurology* 2002; 59:232-37.
32. Henry P, Michel P, Brochet B, Dartigues JF, Tison S, Salamon R A nationwide survey of migraine in France: prevalence and clinical features in adults. *GRIM. Cephalalgia* 1992; 12: 229-37.
33. Lipton RB, Stewart WF, Diamond S, Diamond ML, Reed M. Prevalence and burden of migraine in the United States: Data from the American Migraine Study II. *Headache* 2001; 41: 646-57.
34. Türk Baş ağrısı Epidemiyoloji Çalışma Grubu. Headache Screening Survey. Piar-Gallup, Marketing Research Co, İstanbul, s.1-53, September 1997.

35. Siva A. Başağrısı epidemiyolojisi. Türk Klin Nöroloji 2003;1; 94-97.
36. Ziegler DK, Hassanein R, Hassanein K. Headache syndromes suggested by factor analysis of symptom variables in headache prone population. Headache 1990; 30: 152-56.
37. Rasmussen BK, Jensen R, Schroll M, Olesen J. Epidemiology of headache in a general population- a prevalence study. 1991;44:129-34.
38. Blau JN. Sleep deprivation headache. Cephalgia 1990;10:157-60.
39. İnan LE. Gerilim tipi başağrıları. T Klin J Neurol 2003;1: 127-32.
40. Bendtsen L. Central and peripheral sensitization in tension type headache-possible pathophysiological mechanism. 200;20:486-508.
41. Jensen R. Peripheral and central mechanisms in tension type headache: an update. Cephalgia 2003;23:49-52.
42. Ashina S, Bendtsen L, Ashina M. Pathophysiology of tension type headache. Curr Pain Headache Rep 2005; 9:415-22.
43. Bendtsen L, Jensen R, Olesen J. Decreased pain detection and tolerance thresholds in chronic tension type headache. Arch Neurol 1996;53:373-76.
44. Ashina M, Lassen LH, Bendtsen L, Jensen R, Olesen J. Effect of inhibition of nitric oxide synthase on chronic tension type headache: a randomised crossover trial. Lancet 1999; 353: 287- 89.

45. Ashina M, Bendtsen L, Jensen R, Lassen LH, Sakai F, Olesen J. Possible mechanisms of action of nitric oxide synthase inhibitors in chronic tension type headache. *Brain* 1999;122:1629-35.
46. Ulrich V, Gervil M, Olesen J. The relative influence of environment and genes in episodic tension type headache. *Neurology* 2004; 62:2065-69.
47. Schwartz BS, Stewart WF, Simon D, Lipton RB. Epidemiology of tension type headache. *JAMA* 1998;278:381-83.
48. Couch JR. The long term prognosis of tension type headache. *Curr Pain Headache Rep* 2005;9:436- 41.
49. Mooney S, Leuendorf JE, Hendrickson C, Hellman H. Vitamin B6: A long known compound of surprising complexity. *Molecules* 2009;14:329-51.
50. Hamm MW, Mehansho H, Henderson LM. Transport and metabolism of pyridoxamine and pyridoxamine phosphate in the small intestine of the rat. *J Nutr* 1979;109:1552-59.
51. Nakano H, Gregory JF. Pyridoxine and pyridoxine-5'-beta-D-glucoside exert different effects on tissue B-6 vitamins but similar effects of beta-glucosidase activity in rats. *J Nutr* 1997;125:2751–62.
52. Merrill AH Jr, Henderson JM, Wang E, McDonald BW, Millikan WJ. Metabolism of vitamin B-6 by human liver. *J Nutr* 1986;114:1664–74.

53. Shenkin A, Baines M, Path FRC, Fell GS, Lyon TDG. Vitamins and trace elements. In Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE editors. Fourth edition. Missouri Elsevier Saunders; 2006. P1075-1164.
54. Fonda ML, Trauss C, Guempel UM. The binding of pyridoxal 5'-phosphate to human serum albumin. *Arch Biochem Biophys* 1991;288:79–86.
55. Shultz TD, Leklem JE. Urinary 4-pyridoxic acid, urinary vitamin B6, and plasma pyridoxal phosphate as measures of vitamin B6 status and dietary intake in adults. In: Leklem JE, Reynolds RD, eds. *Methods in Vitamin B6 Nutrition*. New York: Plenum Press. 1981;P 389–392.
56. Clayton P. B6-responsive disorders: A model of vitamin dependency. *J Inher Metab Dis* 2006;29:317-26.
57. Depeint F, Bruce WR, Shangari N, Mehta R, O'Brien PJ. Mitochondrial function and toxicity: Role of B vitamins on the one-carbon transfer pathways. *Chem Biol Interact* 2006;163:113-32.
58. Oka T. Modulation of gene expression by vitamin B6. *Nutr Res Rev* 2001;14:257-66.
59. Rall LC, Meydani SN. Vitamin B6 and immune competence. *Nutr Rev* 1993;51:217-25.
60. Larsson SC, Giovannucci E, Wolk A. Vitamin B6 intake, alcohol consumption and colorectal cancer: A longitudinal population-based cohort of women. *Gastroenterology* 2005;128:1830-37.

61. Bilski P, Li MY, Ehrenshaft M, Daub ME, Chignell CF. Vitamin B6 (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants. *Photochem Photobiol* 2000;71:129-34.
62. Voziyan PA, Hudson BG. Pyridoxamine as a multifunctional pharmaceutical: Targeting pathogenic glycation and oxidative damage. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:1671-81.
63. Endo N, Nishiyama K, Okabe M, Matsumoto M, Kanouchi H, Oka T. Vitamin B6 suppresses apoptosis of NM-1 bovine endothelial cells induced by homocysteine and copper. *Biochim Biophys Acta* 2007;1770:571-77.
64. Choi EY, Cho YO. Effect of vitamin B(6) deficiency on antioxidative status in rats with exercise induced-oxidative stress. *Nutr Res Pract* 2009;3:208-11.
65. Sharma SK, Bolster B, Dakshinamurti K. 1994. PicROTOXIN and pentylene tetrazole induced seizure activity in pyridoxine-deficient rats. *J Neurol Sci* 121:1–9.
66. Tang FI, Wei IL. Vitamin B-6 deficiency prolongs the time course of evoked dopamine release from rat striatum. *J Nutr*. 2004;134:3350-54.
67. Merrill AH, Henderson M. Diseases associated with defects in vitamin B6 metabolism or utilization. *Annu Rev Nutr* 1987;7:137–56.
68. Mudd SH. Pyridoxine-responsive genetic disease. *Fed Proc* 1971;30:970-76.

69. Lui A, Lumeng L, Aronoff GR, Li TK. Relationship between body store of vitamin B6 and plasma pyridoxal-P clearance: metabolic balance studies in humans. *J Lab Clin Med*. 1985;106:491-97.
70. Han Q, Xu M, Tang L, Tan X, Tan X, Tan Y, Hoffman RM. Homogeneous, nonradioactive, enzymatic assay for pyridoxal 5-phosphate. *Clin Chem* 2002;48:1560-64.
71. Banerjee R, Ragsdale S.W. The many faces of vitamin B12: catalysis by cobalamin dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 2003;72: 209-47.
72. Davis RE. Clinical chemistry of vitamin B12. *Adv Clin Chem* 1985;24:163-216.
73. Hall CA. The transport of vitamin B12 from food to use within the cells. *J Lab Clin Med* 1979;94:811-6.
74. Seetharam B, Li N. Transcobalamin II and its cell surface receptor. *Vitam Horm* 2000;59:337-66.
75. Fairbanks VF, Klee G. Biochemical aspects of hematology. In: Burtis C, Ashwood ER. *Tietz textbook of clinical chemistry*. Pennsylvania WB Saunders Co, 1994 P:1974-2072.
76. Toh BH, van Driel IR, Gleeson PA. Pernicious anemia. *N Engl. J Med* 1997;337:1441-48.
77. Zittoun J, Zittoun R. Modern clinical testing strategies in cobalamin and folate deficiency. *Semin in Hematol* 1999;36:35-46.

78. Kolhouse JF, Kondo H, Allen NC, Podell E, Allen RH. Cobalamine analogues are present in human plasma and can mask cobalamine deficiency because current radioisotope dilution assays are not specific for true cobalamine. *N Engl J Med* 1978;299:785-92.
79. Bailey RL, Carmel R, Green R, Pfeiffer CM, Cogswell ME, Osterloh JD, et al. Monitoring of vitamin B-12 nutritional status in the United States by using plasma methylmalonic acid and serum vitamin B-12. *Am J Clin Nutr* 2011;94:552–61.
80. Marcell P, Stabler S, Podell E, Allen R. Quantitation of methylmalonic acid and dicarboxylic acids in normal serum and urine capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 1985;150:58-66.
81. Valente E, Scott JM, Ueland PM, Cunningham C, Casey M, Molloy AM. Diagnostic accuracy of Holotranscobalamin, methylmalonic acid, serum cobalamin and other indicators of tissue vitamin B12 status in the elderly. *Clin Chem* 2011;57:856-63.
82. Carmel R. Holotranscobalamin: Not ready for prime time. *Clin Chem* 2012;58:643-45.
83. Krishnaswamy K, Madhavan Nair K. Importance of folate in human nutrition. *Br J Nutr*. 2001;85 Suppl 2:S115-24.
84. Pfeiffer CM, Rogers LM, Bailey LB, Gregory JF. Absorption of folate from fortified cereal-grain products and of supplemental folate consumed with or without food determined by using a dual-label stable-isotope protocol. *Am J Clin Nutr*. 1997;66:1388-97.

85. Matherly LH, Goldman DI. Membrane transport of folates. *Vitam Horm* 2003;66:403-56.
86. Selhub J. Folate, vitamin B12, vitamin B6 and one carbon metabolism. *J Nutr Health Aging* 2002;6:39-42.
87. Klee GG. Cobalamine and folate evaluation: Measurement of methylmalonic acid and homocystein vs vitamin B12 and folate. *Clin Chem* 2000; 46: 1277-83.
88. Lindenbaum J, Healton EB, Savage DG, Brust JC, Garrett TJ, Podell ER, Marcell PD, Stabler SP, Allen RH. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. *N Engl J Med* 1988;318:1720–28.
89. Pizza V, Agresta A, Agresta A, Lamaida E, Lamaida N, Infante F, Capasso A. Migraine and genetic polymorphisms: an overview. *Open Neurol J.* 2012;6:65-70.
90. Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosh G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988;43:414-21.
91. Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutations leads hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the results of meta-analysis. *Circulation* 1998;98:2520-26.
92. Sazci A, Ergul E, Kaya G, Kara I. Genotype and allele frequencies of the polymorphic methylenetetrahydrofolate reductase gene in Turkey. *Cell Biochem Funct.* 2005;23:51-54.

93. Ueland PM, Hustad S. Homocysteine and Folate Status in an Era of Folic Acid Fortification: Balancing Benefits, Risks, and B-vitamins. *Clin Chem* 2008;54:779-81.
94. Carson NA, Neill DW. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child* 1962;37: 505-13.
95. Mudd SH, Finkelstein JD, Irreverre F, Laster L Homocystinuria: An enzymatic defect. *Science* 1964; 143: 1443-45.
96. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969;56: 111-28.
97. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 2002;325: 1202-8.
98. Herrmann W. The importance of hyperhomocysteinemia as a risk factor for diseases: an overview. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 666-74.
99. Nelen WL. Hyperhomocysteinaemia and human reproduction. *Clin Chem Lab Med* 2001;39: 758-63.
100. Schroecksnadel K, Leblhuber F, Frick B, Wirleitner B, Fuchs D. Association of hyperhomocysteinemia in Alzheimer disease with elevated neopterin levels. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2004;18: 129-33.
101. Schroecksnadel K, Frick B, Wirleitner B, Winkler C, Schennach H, Fuchs D. Moderate hyperhomocysteinemia and immune activation. *Curr Pharm Biotechnol* 2004;5: 107-18.

102. Mudd SH, Finkelstein JD, Refsum H, Ueland PM, Malinow MR, Lentz SR et al. Homocysteine and its disulfide derivatives: A suggested consensus terminology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20: 1704-6.
103. Bourdon E, Blache D. The importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxid Redox Signal* 2001;3:293-11.
104. Mosharov E, Cranford MR, Banerjee R. The quantitative important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry* 2000;39: 13005-11.
105. Storch KJ, Wagner DA, Burke JF, Young VR. [1-13C; methyl-2H3] methionine kinetics in humans; methionine conservation and cysteine sparing. *Am J Physiol* 1990;258:790-98.
106. Bottiglieri T. S-adenosyle-L-methionine (SAME): from the bench to the bedside-molecular basis of a pleiotrophic molecule. *Am J Clin Nutr* 2002;76: 1151S-7S.
107. Banerjee R, Ragsdale SW. The many facts of vitamin B12: Catalysis by cobalamin-dependent enzymes. *Annual Review of Biochemistry* 2003;72:209-47.
108. Pey AL, Majtan T, Sanchez-Ruiz JM, Kraus JP. Human cystathionine beta-synthase (CBS) contains two classes of binding sites for S-adenosyl-L-methionine (SAM): complex regulation of CBS activity and stability by SAM. *Biochem J*. 2012 2013;449:109-21.

109. Huang T, Wahlkvist ML, Li D. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid on gene expression of the critical enzymes involved in homocysteine metabolism. *Nutr J* 2012 ;19;11:6.
110. Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: An expert opinion. *Clin Chem*. 2004;50:3-32.
111. Lentz SR, Haynes WG. Homocysteine: is it a clinically important cardiovascular risk factor? *Cleve Clin J Med*. 2004;71:729-34.
112. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2032-37.
113. Shimokawa H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:23-37.
114. Mujumdar VS, Aru GM, Tyagi SC. Induction of oxidative stress by homocyst(e)ine impairs endothelial function. *J Cell Biochem* 2001;82: 491–500.
115. Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2001;104:2569–75.
116. Yamamoto M, Hara H, Adachi T. Effects of homocysteine on the binding of extracellular-superoxide dismutase to the endothelial cell surface. *FEBS Lett* 2000;486:159–62.

117. Bagi Z, Ungvari Z, Koller A. Xanthine oxidase-derived reactive oxygen species convert flow-induced arteriolar dilation to constriction in hyperhomocysteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22: 28–33.
118. Hanna IR, Taniyama Y, Szocs K, Rocic P, Griendling KK (2002) NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Antioxidants & Redox Signaling* 4: 899–14.
119. Ungvari Z, Csiszar A, Bagi Z, Koller A. Impaired nitric oxide-mediated flow-induced coronary dilation in hyperhomocysteinemia: morphological and functional evidence for increased peroxynitrite formation. *Am J Pathology* 2002;161: 145–53.
120. Hunt MJ, Tyagi SC. Peroxisome proliferators compete and ameliorate Hcy mediated endocardial endothelial cell activation. *Am J Physiol* 2002;283: 1073–79.
121. Frey RS, Rahman A, Kefer JC, Minshall RD, Malik AB. PKC regulates TNF-induced activation of NADPH oxidase in endothelial cells. *Circ Res* 2002;90: 1012–19.
122. Hamed SA. The vascular risk associations with migraine: Relation to migraine susceptibility and progression. *Artherosclerosis* 2009;205:15-22.
123. Kowa H, Yasui K, Takeshima K et al. The homozygous C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk for migraine. *Am J Genet* 2000;96:762-64.
124. Kara I, Sazcı A, Ergül E, Kaya G, Kılıç G. Association of the C677T and A 1298C polymorphism in the 5,10 methylenetetrahydrofolate

reductase gene in patients with migraine risk. *Brain Res Mol Brain Res* 2003;111:84-90.

125. Lea RA, Ovcarić M, Sundholm J, McMillan J, Griffiths LR. Methylene tetrahydrofolate reductase gene variant C677T influences susceptibility to migraine with aura. *BMD Med* 2004;2:3-10.

126. Oterino A, Toriello BD, Valle N, Castillo J, Colas R, Alonso-Arranz A et al. The relationship between homocysteine and genes of folate-related enzymes in migraine patients. *Headache* 2010;50:99-108.

127. 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.

128. Snow CF. Laboratory diagnosis of vitamin B12 and folate deficiency: a guide for primary care physician. *Arch Intern Med* 1999;159:1289-1298.

129. Schneede J, Ueland PM. Automated assay of methylmalonic acid in serum and urine by derivatisation with 1-pyrenyldiazomethane, liquid chromatography and fluorescence detection. 1993;39:392-99.

130. Gebarski SS, Gabrielsen TO, Knake JE, Latack JT. Cerebral CT findings in methylmalonic and propionic acidemias. *Am J Neuroradiol* 1983;4:955-57.

131. Roodhooft AM, Baumgartner ER, Martin JJ, Blom W, Van Acker KJ. Symmetrical necrosis of the basal ganglia in methylmalonic acidemia. *Eur J Pediatr* 1990;149:582-84.

132. Wolters M, Ströhle A, Hahn A. Age associated changes in the metabolism of vitamin B12 and folic acid: prevalence, aetiopathogenesis and pathophysiological consequences. *Z Gerontol Geriatr* 2004; 37:109-35.
133. Malfatti CRM, Royes LFF, Francescato L, Sanabria ERG, Rubin MA, Cavalheiro EA, Mello CF. Intrastratial methylmalonic acid administration induced convulsions and TBARS production, and alters Na, K- ATPase activity in rats striatum and cerebral cortex. *Epilepsia* 2003;44:761-767.
134. deAlmeida LM, Funchal C, Pelaez PdeL, Pessutto FD, Loureiro SO, Vivian L, Wajner M, Pesseoa-Pureur R. Effect of propionic and methylmalonic acid on the in vitro phosphorylation of intermediate filaments from cerebral cortex of rats during development. *Metab Brain Dis* 2003;18:207-19.
135. O'Broin SD, Kelleher BP, Davoren A, Gunter EW. Field –study screening of blood folate concentrations: specimen stability and finger-stick sampling. *Am J Clin Nutr* 1997;66:1398-405.
136. Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, Cheung RCK, Law LK, Lit LCW, Ng KF, Suen MWM, Tai HL. Electrospray ionisation mass spectrometry: Principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev* 2003; 24: 3-12.
137. Rasmussen K. Studies on methylmalonic acid in humans. I. Concentrations in serum and urinary excretion in normal subjects after feeding and during fasting, and after loading with protein, fat, sugar, isoleucin and valine. *Clin Chem* 1989;35:2271-6.

138. Rasmussen K, Melby L, Jensen MK. Studies on methylmalonic acid in humans II. Relationship between concentrations in serum and urinary excretion and correlation between serum cobalamin and accumulation of methylmalonic acid. *Clin Chem* 1989;35:2277-80.
139. Bianchi A, Salomone S, Caraci F, Pizza V, Vincenzo P, Bernardini R, D'Amato CC. Role of magnesium, coenzyme Q, riboflavin and vitamin B12 in migraine prophylaxis. *Vitam Horm* 2004;69:297-312.
140. Allais G, De Lorenzo C, Quirico PE, Airola G, Tolardo G, Mana O, Benedetto C. Acupuncture in the prophylactic treatment of migraine without aura: A comparison with flunarizine. *Headache* 2002; 42:855-61.
141. Burning JE, Hebert P, Romero JE et al. Migraine and subsequent risk of stroke in the physicians health study. *Arch Neurol* 1995;52:129-34.
142. Merikangas KR, Fenton BT, Cheng SH, Stolar MJ, Risch N. Association between migraine and stroke in a large scale epidemiological study of the United States. *Arch Neurol* 1997;54:362-68.
143. Tietjen GE. The risk of stroke in patients with migraine and implications for migraine management. *CNS Drugs* 2005;19:683-92.
144. Stover PJ. Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease. *Nutr Rev* 2004;62:S3–12.
145. Hustad S, Eussen S, Midttun Ø, Ulvik A, van de Kant PM, Mørkrid L, et al. Kinetic modeling of storage effects on biomarkers related to B vitamin status and one-carbon metabolism. *Clin Chem*. 2012;58:402-10.
146. Ferrari MD. Biochemistry of migraine. *Pathol Biol* 1992;40:287-92.

147. Alam Z, Coombes N, Waring RH, Williams AC, Steventon GB. Plasma levels of neuroexcitatory amino acids in patients with migraine or tension headache. *J Neurol Sci* 1998;156:102-6.
148. Nagata E, Shibata M, Hamada J, Shimizu T, Katoh Y, Gotoh K et al. Plasma 5-hydroxytryptamine (5-HT) in migraine during an attack- free period. *Headache* 2006;46:592-96.
149. Anthony M, Lance JW. Plasma serotonin in patients with chronic headaches. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1989;52:182-84.
150. Shimomura T, Kowa H, Nakano T et al. Platelet superoxide dismutase in migraine and tension type headache. *Cephalalgia* 1994;14:215–18.
151. Tozzi-Ciancarelli MG, Matteis GD, Massimo CD, Marini C, Ciancarelli I, Carolei A. Oxidative stress and platelet responsiveness in migraine. *Cephalalgia* 1997;17:580–84.
152. Yilmaz G, Sürer H, Inan LE, Coskun O, Yücel D. Increased nitrosative and oxidative stress in platelets of migraine patients. *Tohoku J Exp Med*. 2007;211:23-30.
153. Taffi R, Vignini A, Lanciotti C et al. Platelet membrane fluidity and peroxynitrite levels in migraine patients during headache-free periods. *Cephalalgia* 2004;25:353–58.
154. Neyal M, Yimenicioglu F, Aydeniz A, Taskin A, Saglam S, Cekmen M et al. Plasma nitrite levels, total antioxidant status, total oxidant status, and oxidative stress index in patients with tension-type headache and

fibromyalgia. Clin Neurol Neurosurg 2012. doi:pii:S03038467(12)004532/j. clineuro. 2012.08.028. [Epub ahead of print].

155. Sparaco M, Feleppa M, Lipton RB, Rapoport AM, Bigal ME. Mitochondrial dysfunction and migraine: evidence and hypotheses. Cephalalgia 2005;26:361–72.

156. Edvinsson L. Neuronal signal substances as biomarkers of migraine. Headache 2006;46:1088–94.

157. Halliwell B, Gutteridge JM. The definition and measurements of antioxidants in biological systems. Free Radic Biol Med 1995;18:125-26.

158. Bilski P, Li MY, Ehrenshaft M, Daub ME, Chignell CF. Vitamin B6 (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants. Photochem Photobiol 2000;71:129-34.

159. Voziyan PA, Hudson BG. Pyridoxamine as a multifunctional pharmaceutical: Targeting pathogenic glycation and oxidative damage. Cell Mol Life Sci 2005;62:1671-81.

160. Endo N, Nishiyama K, Okabe M, Matsumoto M, Kanouchi H, Oka T. Vitamin B6 supresses apoptosis of NM-1 bovine endothelial cells induced by homocysteine and copper. Biochim Biophys Acta 2007;1770:571-77.

161. Choi EY, Cho YO. Effect of vitamin B(6) deficiency on antioxidative status in rats with exercise induced-oxidative stres. Nutr Res Pract 2009;3:208-11.

162. Kara N, Şeneş M, Coşkun Ö, Inan L, Saydam G, Yücel D. Urinary methylmalonic acid levels in patients with acute ischemic stroke. Clin Biochem 2009;42:578-83.

163. Nexø E, Lücke-Hoffmann E. Holotranscobalamin, a marker of vitamin B12 status: analytical aspects and clinical utility. *Am J Clin Nutr* 2011;94:359S-65S.
164. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;53:109-41.
165. Shukla R, Barthwal MK, Srivastava N. Blood nitrite levels in patients with migraine during headache free period. *Headache* 2001;41:475-81.
166. Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. A novel neuronal messenger molecule in brain: free radical, nitric oxide. *Ann Neurol* 1992;32:297-11.
167. Van der Kuy P-HM, Merkus FWHM, Lohman JJHM, ter Berg JWM, Hooymans PM. Hydroxycobalamin, a nitric oxide scavenger, in the prophylaxis of migraine: an open, pilot study. *Cephalgia* 2002;22:513-19.
168. Weinberg JB, Chen Y, Jiang N, Beasley BE, Salerno JC, Ghosh DK. Inhibition of nitric oxide synthase by cobalamins and cobinamides. *Free Radic Biol Med* 2009;15:46:1626-32.
169. İpçioğlu OM, Özcan Ö, Tekeli H, Gültepe M. Functional vitamin B12 deficiency represented by elevated urine methylmalonic acid levels in patients with migraine. *Turk J Med Sci* 2008;38:409-14.
170. Yeltes EA, Pfeiffer CM, Phinney KW, Bailey RL, Blackmore S, Bock JL et al. Biomarkers of vitamin B12 status in NHANES: a roundtable summary. *Am J Clin Nutr* 2011;94 (suppl):313S-21S.
171. Herbert V. Staging vitamin B12 (cobalamin) status in vegetarians. *Am J Clin Nutr* 1994;59:1213S-1222S.

172. Bolann BJ, Solli JD, Schneid J, Grottum KA et al. Evaluation of indicators of cobalamin deficiency defined as cobalamin-induced reduction in increased serum methylmalonic acid. *Clin Chem* 2000;46:1744-50.
173. Carmel R. Biomarkers of cobalamin (vitamin B12) 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-58S.
174. Herbert V. Staging vitamin B-12 (cobalamin) status in vegetarians. *Am J Clin Nutr* 1994; 59:1213S–22S.
175. Herrmann W, Obeid R, Schorr H, Geisel J. Functional vitamin B12 deficiency and determination of holotranscobalamin in populations at risk. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41:1478–88.
176. Oterino A, Valle N, Pascual J, Bravo Y, Munoz P, Castillo J et al. Thymidylate synthase promoter tandem repeat and MTHFD1 R653Q polymorphisms modulate the risk of migraine conferred by MTHFR T677 allele. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;13:163-68.
177. Kaunisto MA, Kallela M, Hamalainen E, Kilpikari R, Havanka H, Harno H et al. Testing of variants of MTHFR and ESR1 genes in 1789 Finnish individuals fails to confirm the association with migraine aura. *Cephalgia* 2006;26:1462-72.
178. Scher AI, Terwindt GM, Verschuren WMM et al. Migraine and MTHFR C677T genotype in a population based sample. *Ann Neurol* 2006;59:372-75.

179. Hering - Hanit R, Gadoth N, Yavetz A et al. Is blood homocysteine elevated in migraine? *Headache* 2001;41:779-81.
180. Moschiano F, D'Amico D, Usai S, Grazzi L, Di Stefano M, Ciusani E et al. Homocysteine plasma levels in patients with migraine with aura. *Neurol Sci* 2008;29 Suppl:S173-75.
181. Jaques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rich S, Rosenberg IH, Selhub J. Determinants of plasma total homocysteine concentrations in the Framingham Offspring cohort. *Am J Clin Nutr* 2001;73:613-21.
182. Kambo A, Sharma VS, Casteel D, Woods WL Jr, Pilz B, Boss GR. Nitric oxide inhibits mammalian methylmalonyl CoA mutase. *J Biol Chem* 2005;280:10073-82.
183. Sparaco M, Feleppa M, Lipton RB, Rapoport AM, Bigal ME. Mitochondrial dysfunction and migraine: evidence and hypotheses. *Cephalgia* 2005;26:361-72.
184. Vergas BB. Tension type headache and migraine: two points on a continuum. *Curr Pain Headache Rep* 2008;12:433-36.
185. Melo DR, Kowaltowski AJ, Wajner M, Castilho RF. Mitochondrial energy metabolism in neurodegeneration associated with methylmalonic acidemia. *J Bioenerg Biomembr* 2011;43:39-46.
186. Kölker S, Sauer SW, Surtees RA, Leonard JV. The aetiology of neurological complications of organic acidaemias- A role for the blood-brain barrier. *J Inher Metab Dis* 2006;29:701-4.

187. Sauer SW, Opp S, Mahringer A, Kaminski MM, Thiel C, Okun JG et al. Glutaric aciduria type I and methylmalonic aciduria: simulation of cerebral import and export of accumulating neurotoxic dicarboxylic acids in vitro models of the blood-brain barrier and the choroid plexus. *Biochim Biophys Acta* 2010;1802:552-60.
188. Toyoshima S, Watanabe F, Saido H, Miyatake K, Nakano Y. Methylmalonic acid inhibits respiration in rat liver mitochondria. *J Nutr* 1995;125:2846-50.
189. Okada H, Araga S, Takeshima T, Nakashima K. Plasma lactic acid and pyruvic acid levels in migraine and tension-type headache. *Headache*. 1998;38:39-42.
190. DiMauro S, Bonilla E, Lombes A, Shanske S, Minetti C, Moraes CT. Mitochondrial myopathies. *Ann Neurol* 1985;17:521-38.
191. Montagna P, Cortelli P, Barbiroli B. Magnetic resonance spectroscopy study in migraine. *Cephalgia* 1994;14:184-93.
192. Littlewood J, Glover V, Sandler M, Peatfield R, Petty R, Rose FC. Low platelet monoamine oxidase activity in headache: no correlation with phenolsulphotransferase, succinate dehydrogenase, platelet preparation method or smoking. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1984;47:338-43.
193. Wajner M, Coelho JC. Neurological dysfunction in methylmalonic acidemia is probably related to the inhibitory effect of methylmalonate on brain energy production. *J Inher Metab Dis* 1997;20:761-68.
194. Morath MA, Okun JG, Müller IB, Sauer SW, Hörster F, Hoffmann GF, Kölker S. Neurodegeneration and chronic renal failure in

methylmalonic aciduria- A pathophysiological approach. J Inherit Metab Dis 2008 ;31:35-43.

195. Chandler RJ, Zervas PM, Shanske S, Sloan J, Hoffmann V, DiMauro S, Venditti CP. Mitochondrial dysfunction in mutant methylmalonic acidemia. FASEB J 2009;23:1252-61.

196. Dutra JC, Dutra-Filho CS, Cardozo SE, Wannmacher CM, Sarkis JJ, Wajner M. Inhibition of succinate dehydrogenase and beta-hydroxybutyrate dehydrogenase activities by methylmalonate in brain and liver of developing rats. J Inherit Metab Dis 1993;16:147-53.

197. Mirandola SR, Melo DR, Schuck PF, Ferreira GC, Wajner M, Castilho RF. Methylmalonate inhibits succinate-supported oxygen consumption by interfering with mitochondrial succinate uptake. J Inherit Metab Dis 2008;31:44-54.

198. Norman EJ, Martelo OJ, Denton MD. Cobalamin (vitamin B12) deficiency detection by urinary methylmalonic acid quantitation. Blood 1982;59:1128-31.

199. Stabler SP, Marcello PD, Podell ER, Allen RH, Lindebaum J. Assay of methylmalonic acid in the serum of patients with cobalamin deficiency using capillary gas chromatography-mass spectrometry. J Clin Invest 1986;77:1606-12.

200. Windelberg A, Arseth O, Kvalheim G, Ueland PM. Automated assay for the determination of methylmalonic acid, total homocysteine and related amino acids in human serum or plasma by means of methylchloroformate derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. Clin Chem 2005;51:2103-9.

201. Kushnir MM, Komaromy-Hiller G, Shushan B, Urry FM, Roberts WL. Analysis of dicarboxylic acids by tandem mass spectrometry. High-throughput quantitative measurement of methylmalonic acid in serum, plasma and urine. Clin Chem 2001;47:1993-2002.
202. Schneede J, Ueland PM. Automated assay of methylmalonic acid in serum and urine by derivatisation with 1-pyrenyldiazomethane, liquid chromatography, and fluorescence detection. Clin Chem 1993;39:393-99.
203. Schneede J, Ueland PM. Application of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for routine determination of methylmalonic acid in human serum. Anal Chem 1995;67:812-19.
204. 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.
205. Schmedes A, Brandslund I. Analysis of methylmalonic acid in plasma by liquid chromatography- tandem mass spectrometry. Clin Chem 2006;52:754-57.

9. ETİK KURUL İZİNİ



GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU DEĞERLENDİRME FORMU

DEĞERLENDİRME KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara
TELEFON	0312 202 69 58
FAKS	0312 202 46 73
E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Migren ve Gerilim Tipi Baş ağrısı'nda Vitamin B6, Vitamin B12 ve Folik Asit Eksikliğinin Önemi	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Ayşe Banu ÇAYCI	
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☐
		DİĞER ☐	(Doktora Tezi)
	İLAC DİŞİ ARAŞTIRMA	☒	☐ İLAC DİŞİ GİRİŞİMSSEL: ☒ İLAC DİŞİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN (C.3) Rutin takip ve tedavi sırasında elde edilen materyallerle yapılan araştırmalar

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon No	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒	İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİL. GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒	İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒			
	SIGORTA	☐			

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 216	Toplantı tarihi: 15.06.2011
	Üniversitemiz Tıp Fakültesinde Doç.Dr.Ayşe Banu Çaycı'nın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıdaki künyede kayıtlı başvuru bilgileri verilen, Doktora Tezi klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve "bütçesi dışında" uygun olduğuna G.Ü.T.F. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir. Etik Kurulun kararı, projenin bütçesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (BAP) tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, BAP kararının Kurulumuza bildirilmesi gerekmektedir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesinin son versiyonu, İyi Klinik Uygulamaları (Uluslararası ICH-GCP) kılavuzu ve bununla ilgili 2001/20/EC ve 2005/28/EC sayılı Avrupa Birliği direktifleri, Biyoloji ve Tıbbın uygulanması bakımından İnsan Hakları ve İnsan haysiyetinin korunması sözleşmesi ve İnsan Hakları ve Biyotip Sözleşmesinin onaylanmasının uygun bulunduğu dair kanun (9.12.2003 tarihli 25311 sayılı Resmi Gazete), 2547 sayılı Yükseköğretim Kanunu (06.11.1981 tarihli 17506 sayılı Resmi Gazete), Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
	ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof.Dr.Canan ULUOĞLU					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof.Dr.Canan ULUOĞLU BAŞKAN	Tıbbi Farmakoloji	G.Ü.T.F. Tıbbi Farmakoloji A.D	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

Doç.Dr.Arzu BAKIRTAŞ BAŞKAN YRD.	Çocuk Sağ.ve Hast. Çocuk Alerji	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Gonca AKBULUT RAPORTÖR	Fizyoloji	G.U.T.F Fizyoloji A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Fusun BOZKIRLI ÜYE	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	G.U.T.F Anest.ve Rea. A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Emin TÜRKÖZ ÜYE	Restoratif Diş Tedavisi ve Endodonti	G.U.D.F Restoratif Diş Ted. ve Endodonti A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Seyhan ERSAN ÜYE	Farmasötik Kimya	G.U.E.F (Ecz.Mes.Bil.) Farmasötik Kimya	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Sefer AYCAN ÜYE	Halk Sağlığı	G.U.T.F Halk Sağlığı A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU ÜYE	Tıbbi Biyokimya	G.U.T.F Tıbbi Biyokimya A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Öznur L.BOYUNAĞA ÜYE	Radyoloji	G.U.T.F Radyoloji A.D	K	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Galip GÜZ ÜYE	İç Hastalıkları Enjeksiyon Nefroloji	G.U.T.F İç Hastalıkları A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Aylar POYRAZ ÜYE	Tıbbi Patoloji	G.U.T.F Tıbbi Patoloji A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Etiği ve Tıp Tarihi	G.U.T.F Tıp Etiği ve Tıp Tarihi A.D	K	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.Birol DEMİREL ÜYE	Adli Tıp	G.U.T.F Adli Tıp A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Metin YILMAZ ÜYE	Kulak-Burun-Boğaz Hast.	Kulak-Burun-Boğaz Hast. A.D	E	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı
Huk.Müş.Adem GELİR ÜYE	Hukuk Müşavirliği	Rektörlük Hukuk Müşavirliği	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Emine ŞEKER ÜYE	Sivil Temsilci	Sivil Temsilci	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

10. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince ve bu tezin hazırlanması aşamasında karşılaştığım problemlerin çözümünde, bilgi ve deneyimlerini esirgemediğim benimle paylaşan, her konuda destekleyici ve hoşgörölü tavrı ile bana yol gösteren danışman hocam ve Gazi Üniversitesi Tıp Faköltesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. A. Banu Çaycı Sivri'ye;

Gazi Üniversitesi Tıp Faköltesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hatice Paşaoğlu'na;

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Gazi Üniversitesi Tıp Faköltesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri'ne;

Bana her zaman ve her konuda destek olan ve Amerikalı yazar William Arthur Ward'ın da söylediğı gibi “Sıradan öğretmen anlatır, iyi öğretmen açıklar, yetenekli öğretmen yapar ve gösterir, büyük öğretmen esin kaynağı olur”, esin kaynağıım, ağabey'im Doç. Dr. Doğan Yücel'e;

Manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim ablam
Uzm. Dr. Çiğdem Topkaya'ya;

Tez çalışmam sırasında hasta ve kontrol örneklerinin
toplanmasında yardımlarını esirgemeyen S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma
Hastanesi Nöroloji Kliniği'nden Sayın Doç. Dr. Özlem Coşkun ve Sayın
Doç. Dr. Serap ler'e;

Tez çalışmamda bana yardımcı olan S.B. Ankara Eğitim ve
Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Bölümü alışanlarından Bio. Selma
zdemir ve Lab. Tek. Zhra Fıcıoğlu'na;

Bugünlere gelmemde çok büyük emeği olan anneme,
babama ve ablama ve her an desteklerini yanımda hissettiğim yaşam
kaynaklarım, canım kızlarım Glce, Ilgaz ve hayat arkadaşım, sevgili eşim
Meral'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Mehmet ŞENEŞ

Doğum Yeri ve Tarihi: Lefkoşa / KKTC; 1970

Medeni Durumu: Evli, iki çocuk sahibi

Yabancı Dili: İngilizce

İş Adresi: S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Bölümü, Cebeci, Ankara

ÖĞRENİM DURUMU

1993-1996: Tıpta Uzmanlık, Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi, Biyokimya ve

1988-1992: Lisans, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

1985-1988: Lise, Lefkoşa 20 Temmuz Lisesi, KKTC.

1977-1985: İlk ve Ortaöğretim, Lefkoşa, KKTC.

Yabancı Dil

İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Biyokimya Derneği