

T.C.

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OBEZ ADÖLESANLARDA B12 VİTAMİN
EKSİKLİĞİNİN SERUM METİLMALONİK ASİT
VE HOMOSİSTEİN DÜZEYLERİ İLE
İNCELENMESİ VE NORMAL KİLOLU
ADÖLESANLARLA KARŞILAŞTIRILMASI**

RECEP TURAN

**MOLEKÜLER TIP
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2019

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2011970129

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OBEZ ADÖLESANLARDA B12 VİTAMİN
EKSİKLİĞİNİN SERUM METİLMALONİK ASİT
VE HOMOSİSTEİN DÜZEYLERİ İLE
İNCELENMESİ VE NORMAL KİLOLU
ADÖLESANLARLA KARŞILAŞTIRILMASI**

**MOLEKÜLER TIP
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

RECEP TURAN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. GÜL HÜRAY İŞLEKEL

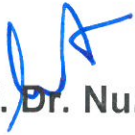
TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2011970129

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Yüksek Lisans programı öğrencisi Recep Turan " **OBEZ ADÖLESLERDE B12 VİTAMİN EKSİKLİĞİNİN SERUM METİLMALONİK ASİT VE HOMOSİSTEİN DÜZEYLERİ İLE İNCELENMESİ VE NORMAL KİLOLU ADÖLESLERLE KARŞILAŞTIRILMASI**" konulu yüksek lisans tezini 03.04.2019 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


Prof. Dr. Gül Huray İŞLEKEL

BAŞKAN

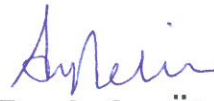
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi


Prof. Dr. Nur ARSLAN

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi

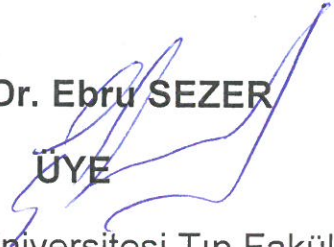
Tıp Fakültesi


Prof. Dr. Ayfer ÜLGENALP

ÜYE

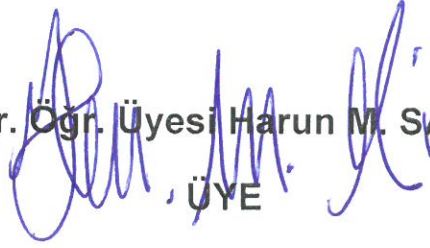
Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi


Doç. Dr. Ebru SEZER

ÜYE

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi


Dr. Öğr. Üyesi Harun M. SAİD

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık

Bilimleri Enstitüsü

Prof. Dr. Gül AKDOĞAN

YEDEK ÜYE

İzmir Ekonomi Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Gamze TUNA

YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
KISALTMALAR	viii
TEŞEKKÜR	ix
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1.Giriş ve Amaç.....	5
2. Genel Bilgiler	7
2.1. B12 Vitamini	7
2.1.1. B12 Vitamininin Tanımı ve Tarihçesi	7
2.1.2. B12 Vitamininin Moleküler Yapısı	9
2.1.3. B12 Vitamini Formları:.....	10
2.1.4. B12 Vitamini Kaynakları	11
2.1.5. B12 Vitamininin Günlük Alınması Gereken Miktarları	13
2.1.6. B12 Vitamini Sindirim, Emilim ve Taşınması	14
2.1.7. B12 Vitaminin Emilim Sonrası Metabolizması.....	15
2.1.8. B12 Vitamini Depolanması	15
2.1.9. B12 Vitaminin Atılımı.....	17
2.1.10. B12 Vitamininin Biyokimyasal Fonksiyonu.....	17
2.1.10.1. Metilmalonik asit metabolizması	17
2.1.10.2. Homosistein Metabolizması.....	18
2.2. B12 Vitamini Eksikliği.....	19
2.2.1. B12 Vitamini Eksikliği Prevalansı	19
2.2.2. B12 Vitamini Eksikliği Nedenleri.....	20
2.2.2.1. Diyetle Eksik Alım	20
2.2.2.2. Malabsorbsiyon Bozuklukları	21
2.2.2.3. Kalıtsal Hastalıklar	22
2.2.3. B12 Vitamin Eksikliğinin Klinik Belirtileri	22
2.2.3.1. Hematolojik Belirtiler:	22

2.2.3.2. Nöropsikiyatrik Belirtiler:	22
2.2.3.3. Kardiyovasküler Hastalıklar:	23
2.2.3.4. Gastrointestinal Hastalıklar:	24
2.2.4. B12 Vitamini Eksikliğinin Belirlenmesinde Kullanılan Biyokimyasal Parametreler	24
2.2.4.1. Ortalama Eritrosit Hacmi (MCV).....	24
2.2.4.2. Serum B12 vitamini	25
2.2.4.3. Holotranskobalamin (holoTC)	25
2.2.4.4. Homosistein (Hcy)	26
2.2.4.5. Metilmalonik asit (MMA)	27
2.3. OBEZİTE	30
2.3.1. Obezitenin tanımı ve tarihte obezite	30
2.3.2. Obezitenin prevalansı.....	31
2.3.3. Obezite Ölçüm Teknikleri:	36
2.3.3.1. Vücut Kitle İndeksi:.....	36
2.3.3.2. Deri kıvrım kalınlığı (skinfolde thickness):	36
2.3.3.3. Bel/kalça çevresi oranı:	37
2.3.3.4. Dansitometri yöntemi:	37
2.3.3.5. Biyoelektrik impedans yöntemi:	37
2.3.3.6. Total Vücut Potasyum Ölçümü:.....	37
2.3.3.7. Ultrasonografi tekniği:.....	37
2.3.3.8. Persentil ve z skoru:	37
2.3.4. Obezitenin sınıflandırılması:.....	38
Yağ Dokusunun Dağılımına göre:	38
2.3.4.2. Anatomik yapıya göre:	38
2.3.4.3. Etiyolojiye göre:.....	38
2.4. Ergenlik Dönemi:	38
2.5. Ergenlik ve Obezite.....	39
2.6. OBEZİTENİN NEDEN OLDUĞU SAĞLIK SORUNLARI	43
2.6.1. Tip 2 Diabetes Mellitus:.....	43
2.6.2. Kardiyovasküler Hastalıklar:	43
2.6.3. Solunum Sistemi Hastalıkları:	43
2.6.4. Kemik, Eklem, Bağ dokusu ve Deri Komplikasyonları.....	44
2.6.5. Gastrointestinal Sistem Hastalıkları:	44

2.6.6. Kanser ve Obezite ilişkisi	44
2.6.7. Psikososyal Bozukluklar ve Obezite:.....	44
2.6.8. Mineral eksiklikleri ve obezite.....	45
2.6.8.1. Magnezyum eksikliği ve obezite.....	45
2.6.8.2. Selenyum eksikliği ve obezite.....	46
2.6.8.3. Demir eksikliği ve obezite.....	46
2.6.8.4. Krom eksikliği ve obezite.....	46
2.6.8.5. Çinko eksikliği ve obezite.....	46
2.6.9. Vitamin eksiklikleri ve obezite.....	47
2.6.9.1. Tiamin (B1 vitamini) eksikliği ve obezite	47
2.6.9.2. Folat eksikliği (B9 vitamini) ve obezite	47
2.6.9.3. D vitamini eksikliği ve obezite	47
2.6.9.4. A ve E vitamini ile obezite	48
2.6.9.5. C vitamini ve obezite	48
2.6.9.6. B12 vitamini ve obezite	48
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	50
3.1. Araştırmanın tipi.....	50
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	50
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/ Çalışma grupları.....	50
3.4. Çalışma Materyali.....	50
3.5. Araştırmanın değişkenleri	51
3.6. Kullanılan Kimyasallar, malzemeler ve cihazlar.....	52
3.6.1. Rutin Biyokimya Analizleri	53
3.6.2. Metilmalonik asit (MMA) Analizi.....	53
3.6.3.1. LC-MS/MS Özellikleri ve Çalışma koşulları	57
3.6.3.1.1. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC)	57
3.6.3.1.2. Tandem kütle spektrometresi (MS/MS).....	58
3.6.3.2. Plazma havuzunun ve MMA standartlarının hazırlanması.....	59
3.6.3.2.1. Plazma havuzunun hazırlanması	59
3.6.3.2.2. Plazma havuzunun endojen MMA konsantrasyonunun belirlenmesi	59
3.6.3.2.3. MMA ve d3 MMA stok standartlarının hazırlanması	60
3.6.3.3. SID-MRM LC-MS/MS ile MMA analizi için örnek hazırlığı	62
3.6.3.4. Yöntem geçerlilik çalışmaları.....	62

3.6.3.4.1. Doğruluk	62
3.6.3.4.2. Kesinlik	63
3.6.3.4.3. Tespit limiti ve kantitasyon limiti	63
3.7. Araştırma planı ve takvimi.....	63
3.8. Verilerin değerlendirilmesi:.....	64
3.9. Araştırmanın sınırlılıkları	64
3.10. Etik kurul onayı.....	65
4.BULGULAR	66
4.1. LC-MS/MS ile MMA Analizi koşullarının optimizasyonu çalışmaları	66
4.1.1 Bileşik ve iyonizasyon kaynağı bağımlı parametrelerin belirlenmesi	66
4.2. Plazma Havuzunun Endojen MMA Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	67
4.3. MMA Kalibrasyon Eğrisi	68
4.4. Yöntem Verifikasyon Çalışmaları.....	69
4.4.1. Doğruluk	69
4.4.2. Tespit ve Kantitasyon Limiti	70
4.4.3. Kesinlik	70
4.5. Obez ve Normal Kilolu Adölesanlara ait Bulgular.....	71
4.5.1. Obez ve Normal Kilolu Adölesanların Karşılaştırılması.....	71
4.5.1.1. Tanımlayıcı bulgular	71
4.5.1.2. Biyokimyasal veriler	72
4.5.1.2.1. Serum B12 ve Fonksiyonel B12 belirteçleri.....	72
4.5.1.2.2. Birleşik B12 değeri.....	73
4.5.1.2.3. Diğer biyokimyasal parametreler.....	75
4.5.1.3. Korelasyon analizleri	77
4.5.1.3.1. Obez grup korelasyon analizleri	77
4.5.1.3.2. Normal kilolu grupta korelasyon analizleri	78
4.5.1.4. Fonksiyonel B12 vitamini eksikliğinin tanısında metilmalonik asit ve homosistein düzeylerinin serum B12 vitamini ölçümüne göre değerinin karşılaştırılması.	80
4.5.1.4.1. Obez grupta vitamin B12 eksikliği tanısı için ölçüm parametrelerinin karşılaştırmaları.	81
4.5.1.4.1. Normal kilolu grupta vitamin B12 eksikliği tanısı için ölçüm parametrelerinin karşılaştırmaları.	82
4.5.1.5 ROC eğrisi	83

4.5.1.6. Vitamin B12 eksikliği tanısında ölçüm parametrelerinin ROC analizi ile karşılaştırmaları	84
5.TARTIŞMA.....	85
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	90
7. KAYNAKLAR	92
8.EKLER.....	102



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1 Bazı besinlerin B12 vitamini içerikleri	11
Tablo 2 Bireylerin VKİ değerlerinin yaş ve cinsiyete göre dağılımı.....	32
Tablo 3 OECD ülkelerinde obezite prevalansı	33
Tablo 4 Çalışmada kullanılan kimyasallar ve malzemeler	52
Tablo 5 Çalışmada kullanılan cihazlar.....	52
Tablo 6 HPLC çalışma koşulları	58
Tablo 7 Standart eklemeye metodu ile plazma havuzu endojen MMA miktarının belirlenmesi	60
Tablo 8 Su ya da plazma havuzu ile hazırlanan kalibrasyon eğrisinde kullanılan MMA standartlarının hazırlanması.	61
Tablo 9 % CV çalışmalarında kullanılan solüsyonların hazırlanması.	63
Tablo 10 MMA kalibrasyon standartlarına ait pik oranları.....	68
Tablo 11 MMA kalibrasyon eğrisi standartlarının doğruluğu.....	70
Tablo 12 MMA yönteminin LOD ve LOQ değerleri.....	70
Tablo 13 Gün içi ve günler arası kesinlik çalışması.....	71
Tablo 14 Obez ve kontrol gruplarına ait antropometrik ölçümler.....	71
Tablo 15 Serum B12 ve fonksiyonel B12 biyobelirteç düzeyleri	72
Tablo 16 . Obez ve kontrol grubuna ait Birleşik B12 verileri.....	74
Tablo 17 Obez ve kontrol gruplarına ait biyokimyasal parametreler.....	76
Tablo 18 Obez grupta korelasyon analizleri.....	78
Tablo 19 Normal kilolu grupta korelasyon analizleri.....	79
Tablo 20 Serum B12 vitamini ölçümleri sonucunda gruplarda düşük, normal ve yüksek düzeyde sonuçlara sahip birey sayıları	80
Tablo 21 Metilmalonik asit ölçümleri sonucu gruplara göre düşük, normal ve yüksek MMA düzeylerine sahip birey sayıları.....	81
Tablo 22 Homosistein ölçümleri sonucu gruplara göre düşük, normal ve yüksek Hcy düzeylerine sahip birey sayıları.....	81
Tablo 23 Obez grupta serum B12 vitamini ölçümü ve metilmalonik asit ölçümünün B12 eksikliğini yansıtmaları açısından karşılaştırılması.....	82
Tablo 24, Obez grupta serum B12 vitamini ölçümü ve homosistein ölçümünün karşılaştırılması	82
Tablo 25 Normal kilolu grupta serum B12 vitamini ölçümü ve metilmalonik asit ölçümünün karşılaştırılması.....	83
Tablo 26 Normal kilolu grupta serum B12 vitamini ölçümü ve homosistein ölçümünün karşılaştırılması.....	83

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1 B12 vitamininin moleküler yapısı.....	9
Şekil 2 B12 vitamininin emilimi ve taşınması	16
Şekil 3 D-metilmalonil CoA mutaz ve MMA ilişkisi.....	18
Şekil 4 Metiyonin sentaz ve Homosistein ilişkisi	19
Şekil 5 Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması-2010 sonuçlarına göre bölgelere göre obezite	34
Şekil 6 LC-MS/MS sisteminin şematik gösterimi	54
Şekil 7 Triple quadrupole iyon trap tandem kütle spektrometresi(QTRAP MS/MS)	55
Şekil 8 MRM modunda seçilen ana iyon/ürün iyon ikilisinin izlenmesi.	55
Şekil 9 MRM modunda izlenen analit ve internal standardının iyon kromatogramı.....	56
Şekil 10 MMA için ESI MS/MS ürün iyon / ana iyon kütle spektrumu.	66
Şekil 11 d3-MMA için ESI MS/MS ürün iyon/ana iyon kütle spektrumu.....	67
Şekil 12 Standart ekleme yöntemi grafiği	68
Şekil 13 MMA kalibrasyon eğrisi grafiği.....	69
Şekil 14 Obez ve kontrol gruplarında a. Serum B12 b. Plazma MMA c. Plazma Hcy düzeylerinin karşılaştırılması.....	73
Şekil 15 Obez ve kontrol gruplarında	74
Şekil 16 Gruplara göre birleşik B12 düzeyleri.....	74
Şekil 17 Obez ve kontrol gruplarında serum ALT, AST ve GGT düzeyleri.	77
Şekil 18 Obez ve kontrol gruplarında	77
Şekil 19 Obez ve kontrol gruplarında serum	77

KISALTMALAR

NAKY	Nonalkolik karaciğer yağlanması.
MMA	Metilmalonik asit.
Hcy	Homosistein.
WHO	Dünya Sağlık Örgütü.
IF	intrensek faktör.
PPI	Proton pompası inhibitörleri.
H2RA	Human 2 reseptör antagonistleri.
SAM	S-Adenozil Metiyonin.
VKi	Vücut kitle indeksi.
IS	İnternal standart.
GCMS	Gaz kromatografisi.
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi.
LC-MS/MS	Sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi.
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey.
d3-MMA	döteryumlu MMA

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilgisini ve desteğini benden esirgemeyen, tez çalışmam sırasında gerek teorik gerek pratik anlamda yanımda olan danışman hocam ve bölüm başkanım **Sayın Prof Dr. Hüray İŞLEKEL'e**

Araştırmanın veri toplama ve yazım aşamasında her türlü desteğini gösteren **Sayın Prof. Dr. Nur ARSLAN'a** , tezimin veri toplanması aşamasında birlikte çalıştığımız **Sayın Dr. Pınar KUYUM'a**,

Tez çalışması boyunca gerek laboratuvar çalışmaları gerek tezin yazımı sırasında bana destek olan ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum **Dr.Merve AKIŞ'a**, tez yazımı sırasında manevi desteğini yanımda hissettiğim değerli dostum **Eren ŞAHİN'e**,

Tezimin istatistik çalışmalarında destek olan **Sayın Hatice ULUER ve Aslı KARAKÜLAH'a**,

Eğitim hayatım boyunca emeği geçen tüm saygıdeğer hocalarıma,

Hayatım boyunca yardımını ve desteğini hep yanımda hissettiğim değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.

OBEZ ADÖLESANLARDA B12 VİTAMİN EKSİKLİĞİNİN SERUM METİLMALONİK ASİT VE HOMOSİSTEİN DÜZEYLERİ İLE İNCELENMESİ VE NORMAL KİLOLU ADÖLESANLARLA KARŞILAŞTIRILMASI

Recep TURAN

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

ÖZET

Giriş ve Amaç: Obezite Dünya Sağlık Örgütü tarafından vücutta sağlık için risk oluşturabilecek düzeyde anormal yağ birikmesi olarak tanımlanır. Erişkinler için son yüzyılda yüksek derecede öncelikli bir halk sağlığı problemi olarak kabul edilen obezitenin prevalansı çocuk ve ergenlerde de son 20 yılda üç kat artarak endişe verici boyutlara ulaşmıştır. Obez ergenlerdeki yüksek miktardaki besin alımı, ailelerini çocuklarında herhangi bir besin ögesi eksikliği bulunmadığı yanılgısına düşürebilir. Ancak özellikle ergenlik döneminde, çocukların aileden bağımsız bir şekilde beslenmeye başlaması ile karbohidrat ve yağ ağırlıklı bir diyet uygulamaları mikrobesein öğeleri açısından eksikliklere yol açabilir. Proteinden fakir beslenme yanı sıra, obezlerin çoğunda görülen non-alkolik karaciğer yağlanması (NAKY), depolanma ve biyoyararlanımı karaciğerde gerçekleşen B 12 vitamini eksikliğine yol açan bir diğer nedendir. Klinik laboratuvarında vücuttaki B 12 vitamini durumunun geleneksel belirteci, serum B 12 vitamin düzey ölçümüdür. Ancak, ölçüm yöntemi kısıtlılığı nedeniyle hücre içi B 12 vitamin durumunu tam olarak yansıtmamaktadır. Son yıllarda hücre içi B12 vitamin durumunu anlamak açısından B 12 vitaminin duyarlı ve özgül fonksiyonel biyobelirteçleri olan metilmalonik asit ve homosisteinden yararlanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı; obez adölesanlarda vitamin B12 düzeylerinin sağlıklı kontrollerle karşılaştırılması ve fonksiyonel biyobelirteçlerinin B12 eksikliğindeki tanısal değerinin incelenmesidir.

Gereç ve yöntem: Çalışmaya 12-18 yaş arasında 58 obez adölesan ve 30 normal kilolu adölesan katıldı. Serum B12 vitamini, ferritin ve folik asit düzeyleri otomatize fotometrik yöntem ile, homosistein düzeyi otomatize kemilüminesans yöntem ile plazma metilmalonik asit düzeyi ise sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrik yöntem ile ölçüldü. Metilmalonik asit yönteminin analitik performansını değerlendirmek için kantitasyon limiti, tespit limiti, gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları yapıldı. Verilerin istatistiksel analizleri için SPSS 21.0 programı kullanıldı. $p \leq 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular: 0,1-2,5 $\mu\text{mol/L}$ aralığındaki kalibrasyon standartları ile değerlendirilen MMA yönteminin doğruluğu $\%100 \pm 4$ bulundu. Eğim doğrusal olarak saptandı. Gün içi ve günler arası $\%CV$ 4.0' dan küçük bulundu. Tespit ve kantitasyon limitleri sırasıyla 0,03 $\mu\text{mol/L}$ ve 0,06 $\mu\text{mol/L}$ bulundu. Obez ve normal kilolu gruplar karşılaştırıldığında iki grup arasında MMA düzeyleri açısından anlamlı fark bulundu, homosistein ve B12 vitamini düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı. Obez adölesanlarda serum B12 ölçümü esas alındığında $\%12$ oranında, MMA düzeyleri ile $\%65$ e yakın, Hcy düzeyi ile ise $\%22.5$ oranında B12 vitamini eksikliği saptandı. Birleşik b12 için gruplar arasında anlamlı fark tespit edildi. ROC analizi sonucunda eğri altında kalan alan Hcy için 0,897, MMA için 0,857, serum B12 için 0,148 olarak belirlendi.

Sonuç: Çalışmamız, obez ve normal kilolu adölesanlarda serum B12 vitamini düzeyleri normal sınırlar içinde olsa bile, B12 vitamininin fonksiyonel biyobelirteçleri olan MMA ve Hcy düzeylerinin normal sınırlar dışında olabileceğini, obez grupta fonksiyonel B12 vitamini eksikliğinin normal kilolu gruba göre daha yüksek oranda bulunabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Obezite, adölesan, B12 vitamini, fonksiyonel B12 vitamini eksikliği, homosistein, metilmalonik asit, nonalkolik karaciğer yağlanması, LC MS/MS, kobalamin, eksiklik, Kombine B12, Birleşik B12, ROC eğrisi

INVESTIGATION OF B12 VITAMIN DEFICIENCY WITH THE SERUM METHYLMALONIC ACID AND HOMOCYSTEINE LEVELS IN OBESE ADOLESCENTS AND COMPARISON WITH NORMAL WEIGHT ADOLESCENTS

Recep TURAN

Dokuz Eylül University, Health Sciences Institute, 35340, Inciraltı, Izmir

ABSTRACT

Introduction and Aim: Obesity is defined as abnormal or excessive fat accumulation that presents a risk to health by World Health Organization. Obesity was a high priority health problem for adults for last century, now it has become threatening for children and adolescents by increasing prevalence three times in last 20 years. Parents who have obese child might be mistaken for assuming that their child has no lack of nutrients due to their excessive food consumption. However, especially in puberty children start to eat independently from their parents, thus, consumption of carbohydrates and fat can increase and it can lead lack of nutrients. Besides eating protein-poor food, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) which has big incidence to occur in obese people, lead B12 vitamin deficiency. In clinic laboratories, serum B12 vitamin level is measured to determine B12 level in the body. However, due to limitations of this method, level of B12 vitamin inside the cell cannot be detected. Recently, methylmalonic acid (MMA) and homocysteine (Hcy), which are specific and functional biomarkers of B12 vitamin, have been measured to detect B12 level inside the cells. Aim of this study is to compare B12 vitamin levels between obese and normal weighted adolescences and analyse functional markers of B12 in diagnosis of B12 vitamin deficiency.

Methods and Materials: 12-18 age ranged 58 obese adolescents and 30 normal weighted adolescents participated to this study. Serum B12 vitamin, ferritin and folic acid levels were measured with automated photometric technique. Hcy level was measured with automated chemiluminescence method. Plasma MMA was measured with liquid chromatography-tandem mass spectrometry technique. In order

to determine analytic performance of MMA measurement, optimization of quantitation limits, determination limits and accuracy between days and intradays were done. Data were statistically analysed using SPSS 21.0 program. Statistical significance was taken as $p \leq 0.05$.

Results: Accuracy of MMA technique was $\%100 \pm 4$ (0,1-2,5 $\mu\text{mol/L}$ ranged calibration standards were used). Incline was linear. CV% of intraday and between days was less than 4. Determination and quantitation limits were 0,03 $\mu\text{mol/L}$ and 0,06 $\mu\text{mol/L}$, respectively. When we compared Obese and normal weight groups based on MMA levels, there was a significant difference between the groups. However, homocysteine and B12 vitamin levels were similar within the groups. Obese adolescents have 12% probability to have B12 vitamin deficiency if we based on only serum B12 vitamin level, however, if we consider MMA levels, the B12 deficiency is nearly %65, if we consider Hcy level, the deficiency probability is 22,5%. Combine B12 were significantly different between obese and normal weight adolescents. After performing ROC analysis, the area under the slope calculated as 0,897 for Hcy, 0,857 for MMA and 0,148 for serum B12.

Conclusion: Our study showed that despite non-obese and obese adolescents have normal serum B12 vitamin level, levels of MMA and Hcy, which are markers of functional B12 vitamin, were not in the normal range, obese group had more tendency to have functional B12 deficiency compared to the non-obese group.

Key words: Obesity, adolescent, B12 vitamin, functional B12 vitamin deficiency, homocysteine, methylmalonic acid, non-alcoholic fatty liver disease, LC MS/MS, cobalamin, deficiency, combine B12, ROC curve

1.Giriş ve Amaç

Obezite, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından vücutta sağlık için risk oluşturabilecek düzeyde anormal yağ birikmesi olarak tanımlanır (1). Obezite başta kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve kanser olmak üzere çok sayıda kronik hastalık için önemli bir risk faktörüdür. WHO verilerine göre gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde prevalansı giderek artan obezite, son yüzyılda yüksek derecede öncelikli bir halk sağlığı problemi olarak kabul edilmektedir. Özellikle çocuk ve ergenlerde prevalansı son 20 yılda üç kat artarak endişe verici boyutlara ulaşmıştır (2, 3). Bu nedenle, son yıllarda diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi normalde çocukluk ve ergenlik çağında sık görülmeyen hastalıklar bu yaş grubunda artış göstermektedir.

Obez çocuklardaki aşırı besin alımı aileleri tarafından herhangi bir besin ögesi eksikliği bulunmadığı yanlış algısını oluşturabilir. Ancak özellikle ergenlik döneminde çocukların aileden bağımsız bir şekilde beslenmeye başlaması ile karbohidrat ve yağ ağırlıklı bir diyet uygulamaları mikrobesein öğeleri açısından eksikliklere yol açabilir (4,10). Esansiyel bir vitamin olan ve özellikle hayvansal kaynaklı gıdalarda bulunan B12 vitamininin eksikliği obezlerde önemli bir problemdir. Proteinden fakir beslenmenin yanı sıra, obezlerin çoğunda görülen non-alkolik karaciğer yağlanması (NAKY), depolanma ve biyoyararlanımı karaciğerde gerçekleşen B12 vitamininin eksikliğine yol açan önemli bir nedendir. B12 vitamini eksikliği nöro-psikiyatrik, hematolojik ve gelişimsel bozukluklara yol açması nedeniyle çocukluk çağında özel bir öneme sahiptir. Vücuttaki B12 durumu geleneksel olarak serum B12 düzeyleri ile belirlenmektedir. Ancak, serum B12 vitamini ölçümünde normal değer aralığının çok geniş olması, hücre içi B12 vitamini durumunu tam olarak yansıtmaması, düşük özgüllüğe ve duyarlılığa sahip bir parametre olması nedeniyle, özellikle “düşük normal” serum B12 düzeyi olan olgularda yanıltıcı olarak normal aralıkta ölçülmektedir. Hücre içinde B12 vitamini metilmalonil Koa'nın suksinil Koa'ya dönüşümünde ve homosisteinin metiyonine dönüşümünde kofaktör olarak görev alır. B12 vitamini eksikliği durumunda bu reaksiyonlar engellenir, metilmalonik asit (MMA) ve homosistein (Hcy) gibi ikincil metabolitlerde artış görülür. MMA ve Hcy, B12 vitamini eksikliğin “fonksiyonel belirteçleri” olarak son yıllarda dikkat çeken güvenilir parametreleridir. Dünyada henüz yaygınlaşmamakla birlikte, belli başlı

merkezlerde klinik uygulamalarda hücre içi vitamin B12 durumunun belirlenmesi için MMA ve Hcy düzeyleri ölçümleri tercih edilmeye başlanmıştır.

Literatürde çocukluk obezitesinde B12 vitamin eksikliğini inceleyen araştırmalar genellikle serum B12 vitamini düzeyleri değerlendirilerek gerçekleştirilmiş ve çelişkili sonuçlar bildirilmiştir (4,5,10,11,12,160,86). Bu nedenle hücre içi B12 düzeylerini yansıtan ve vitaminin fonksiyonel belirteçleri olan MMA ve Hcy gibi parametrelerle yapılan çalışmalara gereksinim vardır. Yapılan literatür incelemesinde obez adölesanlarda kan MMA, homosistein ve B12 vitamini düzeylerinin birlikte değerlendirildiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızın amacı;

1. Obez adölesanlarda fonksiyonel belirteçler olan metilmalonik asit ve homosistein aracılığı ile B12 vitamini eksikliğini araştırılması, normal kilolu adölesanlarla karşılaştırılması; bulguların antropometrik ve diğer biyokimyasal verilerle ilişkilerinin incelenmesi,
2. Obez adölesanlarda ve normal kilolu adölesanlarda metilmalonik asit ölçümünün geleneksel olarak kullanılan serum B12 vitamini ölçümüne göre tanısal değerinin araştırılmasıdır.

2. Genel Bilgiler

2.1. B12 Vitamini

2.1.1. B12 Vitamininin Tanımı ve Tarihçesi

Suda eriyen, 1355,42 Da ağırlığında, mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilen vitamindir. En büyük molekül ağırlığına sahip ve metal içeren tek vitamindir.

B12 vitamininin metabolizmadaki rolü, eksikliği ve tedavisinin tam olarak anlaşılması yüz yıla yakın bir süreçte aşamalı olarak gerçekleşmiş ve bu sürece katkısı olanlara iki farklı Nobel ödülü kazandırmıştır. 1824'te aneminin ölümcül olan formunun midede hasar ile ilişkili olduğunu J.S. Combe, Edinburgh'da yaptığı çalışmalar ile göstermiştir. Londra'da Guy's hastanesinde çalışan Dr. Thomas Addison sonraki yıllarda Addison-Biermer hastalığı olarak tanımlanan, kendisinin ise idiyopatik anemi olarak tanımladığı hastalığı 1855'te bulmuştur. 1855'de Zürih'te Anton Biermer hastalığı "progresif pernisiyöz anemi" olarak tanımlamıştır. Alman patolog Paul Erlich (1854-1915) değişik kan hücrelerini değişik renklerde boyayabilen tekniği geliştirerek, progresif pernisiyöz anemi hastalarının kemik iliği örneklerinde, megaloblasti olup olmadığı, nükleuslarının büyük olup olmadıklarını incelemiştir. James Russel (1863-1939) ise hastalığın nörolojik boyutunu ilk kez spinal kortta demiyelinizasyonu göstererek ortaya koymuştur. 1877'de Samuel Fenwick glandüler lezyonları ve artrofiyi addison anemisi olan hastaların postmortem mide dokularında göstermiştir (12).

Birinci Dünya Savaşı sırasında, birçok askerin kan kaybından öldüğünü gözlemleyen George Whipple (1885-1950), hematopoezis üzerinde çalışmış, köpeklerin diyetinde pişmiş karaciğer yerine çiğ karaciğer verince kan değerlerinde iyileşme gözlemlemiştir. 1926 da Minot ve Murphy'nin 45 olgu ile yaptıkları çalışmada, diyetine az pişmiş karaciğer eklenen hastaların retikülosit sayılarının fazla olduğunu tespit edilmiştir. 1934 Nobel ödülü Minnot, Murphy ve Whipple'a bu çalışmalarından dolayı verilmiştir. Aynı dönemlerde pernisiyöz anemide hidroklorik asit eksikliğini inceleyen William Castle adlı araştırmacı, tedavinin sadece diyetle ilgili olmadığını hastaların kendilerine bağlı bir eksiklikle ilişkili olduğu ve bu eksikliğin

emilimle ilgili olduğu savını ortaya atmış; emilimin midedeki (intrensek) ya da diyetle alınan kırmızı etteki (ekstrensek) faktörlere bağlı olabileceğini vurgulamıştır. İntrensek faktörün gastrik paryetal hücrelerden salgılanan glikoprotein olduğu ve reseptörler aracılığıyla ileumdan emilimi sağladığı uzun yıllar sonra gösterildi (12).

Minnot ve Murppy'nin çalışmasından sonra çiğ karaciğerin kimyasal birleşenleri iki farklı grup tarafından 1948'de eş zamanlı olarak çalışıldı. Bir grup araştırmacı Carl Folkers başkanlığında Merck Sharp ve Dohme Laboratuvarında "küçük kırmızı iğneler" adını verdikleri moleküllü karaciğer dokusundan izole ettiler. Anti-pernisiyöz anemi faktörünün *Lactobacillus lactus* un gelişimini artırdığını gösterdiler ve anti-pernisiyöz anemi faktörünü B12 vitamini olarak tanımladılar. İngiltere'de Smith ve Parker'in Glaxo Laboratuvarı'nda kırmızı B12 kristalleri izole edildi. Kısa bir süre sonra iki grup B12 vitaminin kobalt içerdiğini buldular (12).

B12 vitaminin tanımlanmasından sonra sıra vitaminin birleşimini ve yapısını tanımlamaya gelmişti. Brink ve arkadaşları kapalı formülünün $C_{61-64}H_{86-92}N_{14}O_{13}PCo$ olduğunu ve siyanid varlığını gösterdiler. 1955 yılında Dorothy Hodgking, büyük moleküllerin yapısını x-ray kristalografi tekniği kullanarak ortaya koyduğu çalışmasında B12 vitamininin yapısını ve korrin halkasını tanımladı. Bu çalışma ve insülinin yapısını ortaya koyduğu çalışması ile 1964 yılında Nobel ödülünü kazandı (12).

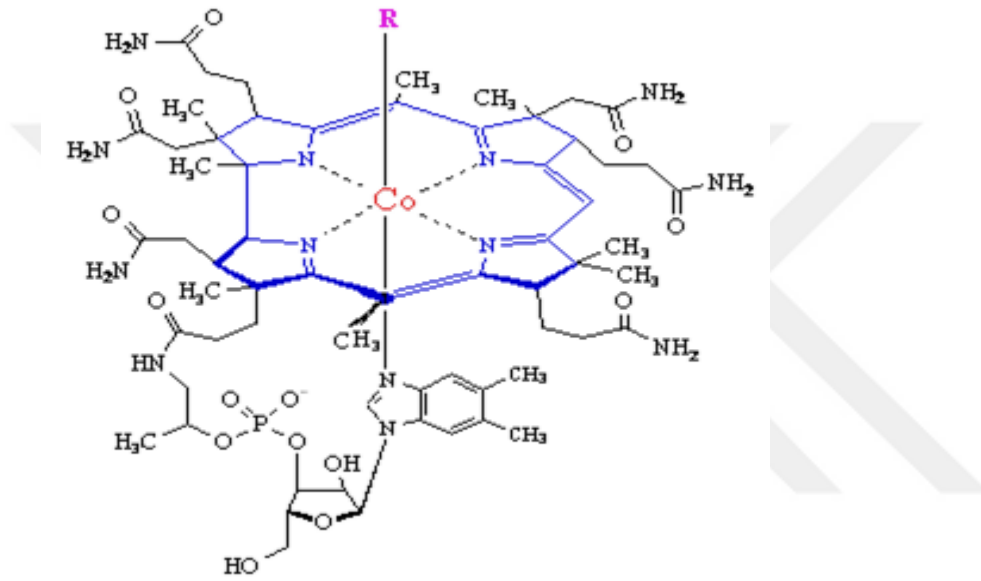
1950 li yıllarda Horace Baker (1907-2000) ilk izole edilen B12 vitamin koenzimini ve diğer koenzim sistemlerini bakterilerde keşfettiler. İnsanda iki koenzim sisteminde B12 vitaminin görev aldığı bulundu. Metionin sentetaz, metilkobalamini kullanarak 5-metiltetrahidrofollatın metil donörü olduğu bir reaksiyon ile homosisteinin metionine dönüşümünde rol alır. Deoksiadenozilkobalamini kullanan mutaz enzimi ise dallanmış zincir aminoasitleri ve tek zincirli doymuş yağ asitlerinin katabolizmasında görev alır (12).

Folik asidin keşfi B12 vitaminin keşfi ile yakın zamanlarda olmuş ve pernisiyöz anemi tedavisinde B12 varlığı ile beraber folik asit varlığının da gerekli olduğunu göstermiştir. 1962'de Herbet, Zeluski, Noronha ve Silverman metil kapanı hipotezini ortaya atmıştır. B12 vitamini eksikliği sayesinde hücresel folat 5-metil form olarak

metabolik tuzak haline gelir. Hücre böylece fonksiyonel folat eksikliğine girer. Metilfolat tuzağı atıkları interselüler folat metabolizmasında B12 vitamini eksikliğinin etkilerini açıklar (12).

2.1.2. B12 Vitamininin Moleküler Yapısı

B12 vitamini kobalamin grubu taşıması nedeniyle, kobalt korinoidler ailesinin üyesi olarak tanımlanır. Koenzim B12 yapısı üç bölümden oluşur.



Şekil 1 B12 vitamininin moleküler yapısı.

1. Merkezi Kobalt Atomuna Bağlı Dört Liganddan Oluşan Kobalt Halkası: Merkezinde dört pirol halkasından oluşan düzlemsel korrin halkası içerir. Porfirin (hemoglobin) ve klorinlerden (klorofil) farklı olarak dört pirol halkasıyla çevrilmiştir, özellikle hidrojene olmuş A ve D halkaları metil köprülerini kaybetmiştir. Diğer farklılıklar, yan halkaların sayısı ve tipi, merkezdeki şelatlanmış metal iyonu ve oksidasyon bölgesidir.

2. Alfa Aksiyal Ligand: Düzlemin altında kalan kısımdır. Bilinen nükleotid yapısından farklı olarak 5,6 dimetilbenzimidazol (DMB) bazı içerir. DMB N7 atomu ile korrin halka yapısına bağlanırken, diğer ucu propiyonik asidin aminopropanol grubundaki fosfat ile kovalent bağ yapar (13).

3. **Beta Aksiyal Ligand:** Düzlemin üzerinde kalan kısımdır. Buradaki karbon- kobalt bağı biyolojik moleküllerde tanımlanan ilk metal-karbon bağıdır, görece zayıftır ve ayrılma enerjisi yaklaşık 130 Kj/mol dür (113). Bu sayede ayrılan grup reaktifleşip B12 nin izomeraz, redüktaz ve metiltransferazlar için kofaktör olarak görev yapmasını sağlar (14,15). B12 vitaminin çeşitli formları, bu ligandda bulunan kobalt atomuna bağlanan R grubuna göre isimlendirilir.

2.1.3. B12 Vitamini Formları: B12 vitaminin insan metabolizmasında biyolojik olarak önemli olan dört formu bulunur.

1. **Siyanokobalamin (CNKbl):** İlk bulunan B12 vitamini formudur. Kobalt halkasına radikal grup olarak siyanid (-CN) bağlanmasıyla oluşur. Işık ve pH' karşı hassas olmasına rağmen, B12 vitaminin en stabil formudur. Bakteriyal fermentasyon ile elde edilmesi ve kristal hale geçmesi çok kolaydır. Bu nedenlerden ötürü ticari olarak en çok kullanılan formdur. Yarılanma ömrü 6 (karaciğerde 40) gündür. Hücre döngüsünde aktif formlar olan, metil kobalamin ya da adenzil kobalamin için prekürsor görevi görür. Koyu kırmızı renkte kristal yapıda bir birleşiktir. Erime ısısı 300 °C dir. Sulu çözeltilerinde 278,361 ve 550 nm. lere absorpsiyon spektrumu gösterir.

2. **Hidroksikobalamin (OHKbl):** Kobalt halkasına radikal grup olarak hidroksil (OH) iyonu bağlanmasıyla oluşur. Biyolojik olarak aktif değildir, metilkobalamin ve adenzil kobalamin için prekürsor görevi görür. Ticari olarak intravenöz ve intramuskuler kullanımı mevcuttur. Yarılanma ömrü 6 gündür. Oral yoldan alındıktan sonra en yüksek serum değerlerine 8-12. saatlerde ulaşır. Koyu kırmızı renkte, toz formdadır. Erime ısısı 200 °C dir. Sulu çözeltilerinde 279, 325, 359, 516, 537 nm. lere absorpsiyon spektrumu gösterir.

3. **Metilkobalamin (MeKbl):** Kobalt halkasına radikal grup olarak metil (-CH₃) bağlanmasıyla oluşur. Biyolojik olarak aktiftir. Koordinasyon kimyası açısından bakıldığında metal alkil bağlarına verilen klasik bir örnektir. 354,390 ve 550 nm. lere absorpsiyon gösterir (16,17) . Erime ısısı 300 °C dir.

4. **Adenzilkobalamin (AdoKbl):** Kobalt halkasına radikal grup olarak 5'-deoksiadenzil bağlanmasıyla oluşur. Koenzim B12 ve kobamamid olarak da anılır.

470, 520, 570 ve 600 nm. lerde absorpsiyon spektrumu gösterir (18). Sitoplazma, ekstraselüler matriks, mitokondri ve bazal membranda bulunur.

2.1.4. B12 Vitamini Kaynakları

Diğer B vitaminlerinin aksine B12 vitamini bitkisel kaynaklardan elde edilemez. Diyetle alımda B12 vitaminin asıl kaynağı hayvansal besinlerdir. Kalın barsakta bakteriler tarafından üretilen B12 vitamini kalın barsak tarafından emilemez ve gaita ile vücut dışına atılır. İnce barsakta çok az miktarda B12 vitamini sentezlenir ve emilir. Asidik ve nötral ortamda ısı ile vitamin B12 kaybı olmaz. Bu yüzden pişirme yöntemi besinlerin içerdiği B12 vitamini oranını çok fazla etkilemez. Kaynamış yumurtanın 55 gramında 1.7 µg B12 vitamini bulunurken, aynı miktardaki sahanda yumurtada 1.56 µg B12 vitamini bulunur (19). Bazı besinlerde bulunan B12 vitamini miktarları şöyledir:

Tablo 1 Bazı besinlerin B12 vitamini içerikleri (19).

Besin türü	Miktar	B12 içeriği (µg)
Süt ve süt ürünleri		
Homojenize süt	250 mL	1.2-1.4
Kaymak	250 mL	1.3
Tereyağı	250 mL	1.0
Çikolatalı süt	250 mL	0.09
Peynir türevleri		
İsveç peyniri	50 gr	1.7
Süzme peynir	250 mL	1.1-1.5
Çedar, mozerella	50 gr	0.7
Yoğurt türevleri		
Yoğurt	175 gr	0.3-0.6
Meyveli yoğurt	175 gr	0.5-0.6
Ayran	200 mL	0.5

Et türevleri		
Karaciğer	75 gr	52.9-66.0
Böbrek (kuzu)	75 gr	59.2
Böbrek (süt danası)	75 gr	27.7
Taşlık (hindi)	75 gr	12.0
Böbrek (dana)	75 gr	18.7
Karaciğer (hindi, tavuk)	75 gr	12.6-23.4
Ezme (tavuk, kaz ciğeri)	75 gr	6.1-7.1
Kümes hayvanları		
Hindi, ördek, tavuk	75 gr	0.2-0.3
Dana	75 gr	2.4-2.7
Domuz	75 gr	0.4-2.0
Hazır etler	75 gr	0.4-1.5
Muhtelif hayvanlar		
Geyik	75 gr	5.0
Salam (dana)	75 gr	2.1
Sosis	75 gr	0.4-2.0
Hazır etler	75 gr	0.4-1.5
Deniz ürünleri		
İstiridye	75 gr	13.2-26.1
Midye	75 gr	18.0
Uskumru	75 gr	13.5-14.3
Ringa	75 gr	14.0
Ton balığı	75 gr	8.2-9.3
Havyar	75 gr	6.0-9.0

Yengeç	75 gr	8.6
Sardalye	75 gr	6.8
Alabalık	75 gr	3.1-5.6
Somon	75 gr	3.7-4.4

2.1.5. B12 Vitamininin Günlük Alınması Gereken Miktarları

Günlük B12 vitamini ihtiyacı ile ilgili olarak, çeşitli kuruluşlar önerilerde bulunmuşlardır. D-A-CH (Almanca Konuşan Ülkeler konsorsiyumu) 2015 yılında yaptığı çalışmada, hematolojik parametreleri baz alarak bir kişinin B12 vitamini ihtiyacının miktarının belirlenebileceğini ileri sürmüştür. Bu çalışmaya göre, sağlıklı bir yetişkinin günlük B12 vitamini ihtiyacının 2 µg/gün olduğu belirlenmiş; ancak protein ve karbohidrattan oluşan karma diyetle emilim verimliliğinin %50 olduğu göz önüne alınarak, yetişkinler için günlük diyetle alınması gereken miktarın 3 µg olduğunu belirtmiştir (20).

NCM (İskandinav Bakanlar Konseyi) 2014 yılında, İskandinav beslenme tavsiyeleri çalışmasında pernisiyöz anemili hastalarda normal hematolojik değerlere gelmesi için günlük kobalamin ihtiyacını 0.7 µg olarak hesaplamış, %50 emilim verimliliği, %15 CV değeri ve 2 SD lik ekleme ile günlük diyetle alınması gereken miktarın 2 µg olduğu sonucuna ulaşmıştır (21).

Dünya Sağlık örgütü (2004), yetişkinler için günlük besin miktarı önerisini (1998) verilerinden yola çıkarak oluşturmuştur ve yetişkin bireyler için günlük 2.4 µg B12 vitamini alımını tavsiye etmiştir (22). Hollanda Sağlık Konseyi (2003), WHO/FAO' nun 1970 yılında yaptığı çalışmada (23), vücuttaki B12 depo miktarının 500 µg olduğunu baz almış, maksimum %0.2 lik günlük kaybı ve %50 emilim verimliliğini hesaba katıp %20 lik CV kullandığında yetişkinler için günlük alınması gereken miktarın 2.8 µg olduğu sonucuna varmıştır (24). Afssa (Fransız Gıda Sağlığı ve Güvenliği Ajansı) (2001), 2.0 µg/günlük ihtiyaç olduğunu ve %10 luk CV değeri göz önüne alındığında günlük alınması gereken miktarın 2.4 µg olduğunu kararlaştırdı (25). IOM (A.B.D. ilaç

Enstitüsü) (1998), günlük alınması gereken kobalamin miktarının 2.0 µg olduğunu ve CV nin %10 olduğunu varsayarak günlük gereksinimin 2.4 µg olduğunu açıklamıştır (26). SCF (A.B. Bilimsel gıda komitesi) (1993), günlük 1 µg gereksinim için %20 CV varsayarak günlük alım miktarını 1.4 µg olarak belirledi (27). UK COMA (Birleşik krallık gıdaya tıbbi yaklaşım komitesi) (1991) vejerteryan bireylerle yaptığı çalışmalar sonucunda günlük 1.5 µg kobalamin alımını tavsiye etti (28). Avrupa gıda güvenliği konseyi (EFSA) (2015) Avrupa komisyonundan gelen istek üzerine Avrupa vatandaşlarının günlük besin ihtiyaçlarını bildirir bir çalışma yapmış ve yetişkinler için günlük B12 alımı miktarını 4 µg olarak belirlemiştir (29).

Bu kuruluşların önerileri doğrultusunda yetişkinler için günlük alınması gereken B12 vitamini miktarı en az 1.4 µg ile 4 µg arasında olmalıdır. Günlük alım miktarı kişinin yaşına, kilosuna, ihtiyacına göre değişiklik gösterir.

2.1.6. B12 Vitamini Sindirim, Emilim ve Taşınması

B12 vitaminin emiliminde iki farklı mekanizma rol almaktadır (Şekil 1). Aktif mekanizma, gıdalardaki fizyolojik miktarlardaki B12 vitaminin emilimi sırasında işlev görür. Kobalamin gıdalarda genellikle proteinlerle kompleks oluşturmuş şekilde bulunur. Tükürük orijinli bir protein olan haptokorrin gıdalardaki kobalamin ile bağlanır. Pankreatik bikarbonat ve proteolitik enzimlerin birlikte etkisiyle duodenumda kobalamin haptokorrinden ayrılıp, serbest kalır. Serbest kobalamin daha sonra midedeki paryetal hücreler tarafından salgılanan gastrik İntrensek faktör ile bağlanır. İntrensek faktör yüksek hassasiyet ve afinite ile kobalaminlere bağlanır, bu bağlanma için İntrensek faktörün kobalaminin 5,6- dimetilbenzidamizol kısmını tanıması gerekir. Terminal ileumda İntrensek faktör - kobalamin kompleksi doğrudan reseptör aracılıklı endositoz ile absorbe edilir. Kobalamin daha sonra serbest kalır ve İntrensek faktör lizozomların etkisi ile yıkılır. Kobalamin daha sonra metil ve deoksiadenozil türevlerine metabolize olur. Kobalamin dolaşıma metilkobalamin formunda girer (29). Emilim için intrensek faktör kadar önemli bir diğer sınırlayıcı faktör barsak reseptörlerinin sayısıdır (33).

Plazmada kobalamin, kobalamin bağlayıcı proteinler olan, haptokorrin ve transkobalamine bağlanır. Transkobalaminin yarılanma ömrü 18 saattir ve kobalamin

alımındaki değişikliklere karşı duyarlıdır (34). İleal hücrelerde transkobalamin kobalamin ile birleşip holotranskobalamini oluşturur (36). Vücuda yeni alınan holotranskobamin, ilk olarak dolaşımında 3 saat sonunda holotranskobamin olarak görülür ve en yüksek plazma konsantrasyonuna 8-12. saatlerde ulaşır (34). Holotranskobaliminin yarılanma ömrü dolaşıma girdikten sonra çok kısadır (60-90 dk.). Holotranskobalamin toplam plazma kobalaminin %10-30 unu oluşturur ve transkobalamin saturasyon değerleri %3,8 ile 17,9 arasında bildirilmiştir (37).

Plazma kobalaminlerinin büyük bir bölümü (%70-90) haptokorrinlere (eski adıyla transkobalamin I ve III) bağlanır (38). Yarılanma ömürleri 9-10 gündür (39).

Holotranskobalamin tüm dokulara hızlı bir şekilde kobalamini taşır. Hücre içine alımı kalsiyuma bağımlı transkobalamin reseptörü (TCb1R) aracılığıyla endositoz yoluyla olur (40). Böbrek ve barsaklarda diğer bir reseptör olan megaline rastlanmıştır (41).

Özellikle oral replasman tedavileri sırasında gözlemlenen ikinci emilim mekanizması olan pasif mekanizmada, incebarsaklara kobalamin fizyolojik miktarın üzerinde ulaştığında ($>500 \mu\text{g}$) , direk olarak jejunum ve ileumdan emilim gerçekleşir. Oral alımın yaklaşık %1 kadarı bu yolla emilir. (30,31) B12 transkobalamin II' ye bir kere bağlanır ve tüm vücut boyunca aynı taşıyıcı protein ile taşınır (32).

2.1.7. B12 Vitaminin Emilim Sonrası Metabolizması

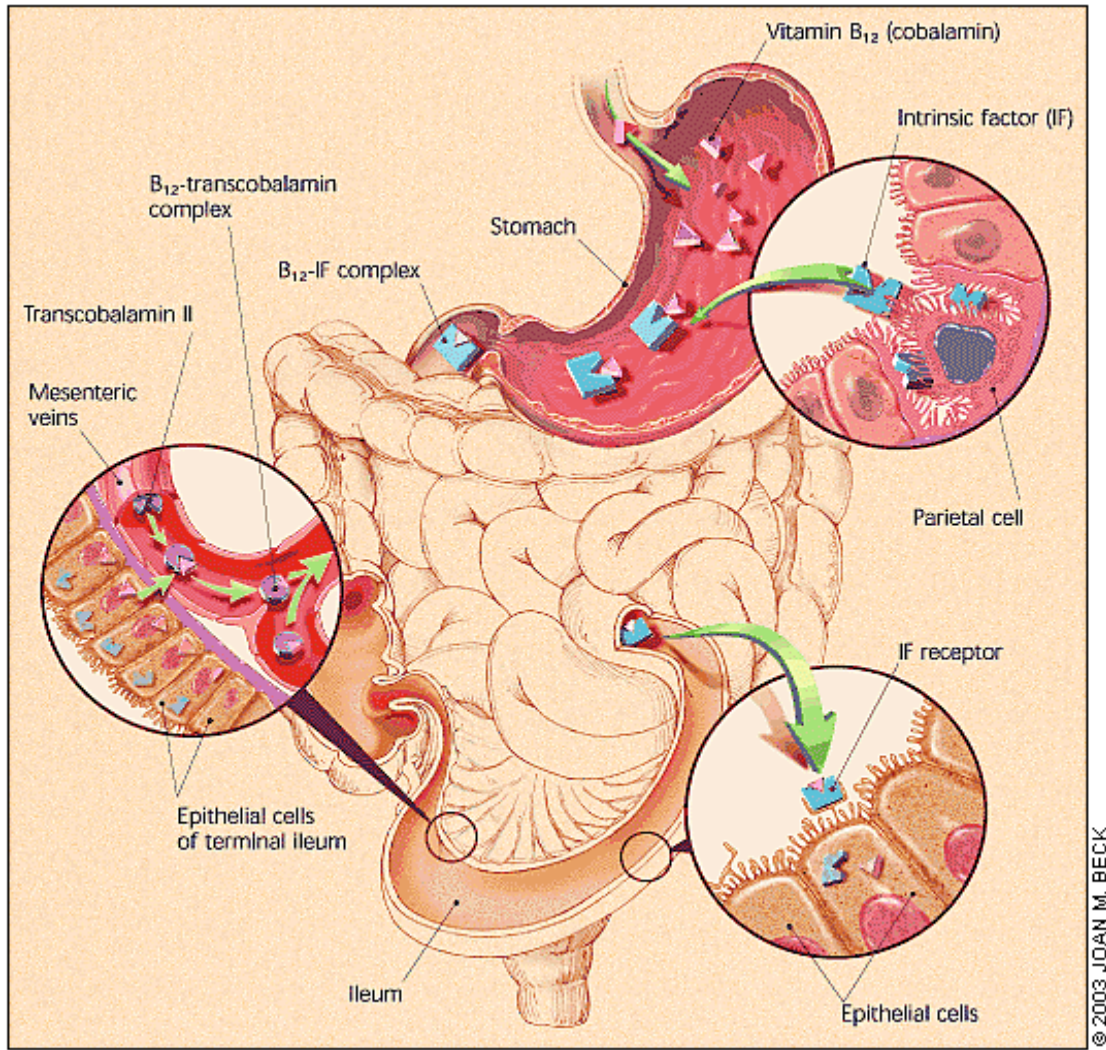
Hidroksikobalamin hücre içinde aktif koenzim formları olan adenzilkobalamin ve metilkobalamine dönüştürülür. Hidroksikobalaminin bu formlara dönüşmesi için merkezi Co^{+3} atomunun indirgenmesi gerekir. Önce Co^{+3} sitozolde Co^{+2} izotopuna indirgenir. Daha sonra mitokondriye alınıp Co^{+1} formuna indirgenir (42).

2.1.8. B12 Vitamini Depolanması

Radyoaktif işaretli oral ve parenteral kobalamin uygulaması sonrası yapılan ölçümlerde sağlıklı bir insanın vücudunda ortalama 2-3 mg kobalamin bulunduğu tespit edilmiştir (43).

Vücuttaki toplam kobalaminin yaklaşık yarısı karaciğerde depolanır. Sağlıklı bireylerde ortalama karaciğer dokusu kobalamin konsantrasyonu $1\mu\text{g/gr}$ olarak tespit edilmiştir (44). Karaciğerdeki kobalaminlerin çoğunu haptokorrinlere bağlı kobalamin oluşturur. Böbrek dokusunda da kobalamin konsantrasyonu oldukça yüksektir. Kobalamin birçok dokuda birikim yapmaz ama aktif taşıma ile dokulara giriş yapabilir.

Dokulardaki kobalaminin çok az bir kısmı serbest kobalamin olarak bulunur; çoğunlukla metioninin sentaz ve metilmalonil Co-A mutaza bağlı olarak bulunduğu düşünülmektedir (45). Kobalaminin depolandığı dokulardan nasıl serbest dolaşıma katıldığı tam olarak bilinmemektedir. Serum kobalaminindeki azalma tipik olarak önce karaciğer depolarındaki eksilme ile başlar (46).



Şekil 2 B12 vitamininin emilimi ve taşınması (32).

2.1.9. B12 Vitaminin Atılımı

Çeşitli çalışmalarda kobalaminin günlük kaybının toplam depo miktarının %0,1-0,2 si arasında olduğu gösterilmiştir (47,48). En fazla kobalamin atılımı dışkı ile olur. Fekal kobalaminin en önemli kaynakları gıdaların veya safranin absorbe olmamış kobalaminleri, dökülen hücrelerin kobalamin içerikleri, gastrik ve intestinal sekresyonlar ve kolonda bakteriler tarafından sentezlenen kobalaminlerdir.

Yirmi dört saatlik idrar örneklerindeki kobalamin konsantrasyonları diyetle alımla korelasyon göstermemektedir (49). Megalinin aracılık ettiği, holotranskobalaminin proksimal tüp reseptör aracılıklı reabsorbsiyonu ve filtrelenmesi, vitaminlerin kaybını etkili bir şekilde önler (50). Ancak dolaşımdaki kobalamin kanın kobalamin bağlama kapasitesinin üzerinde bir konsantrasyona ulaşırsa idrarla atılır.

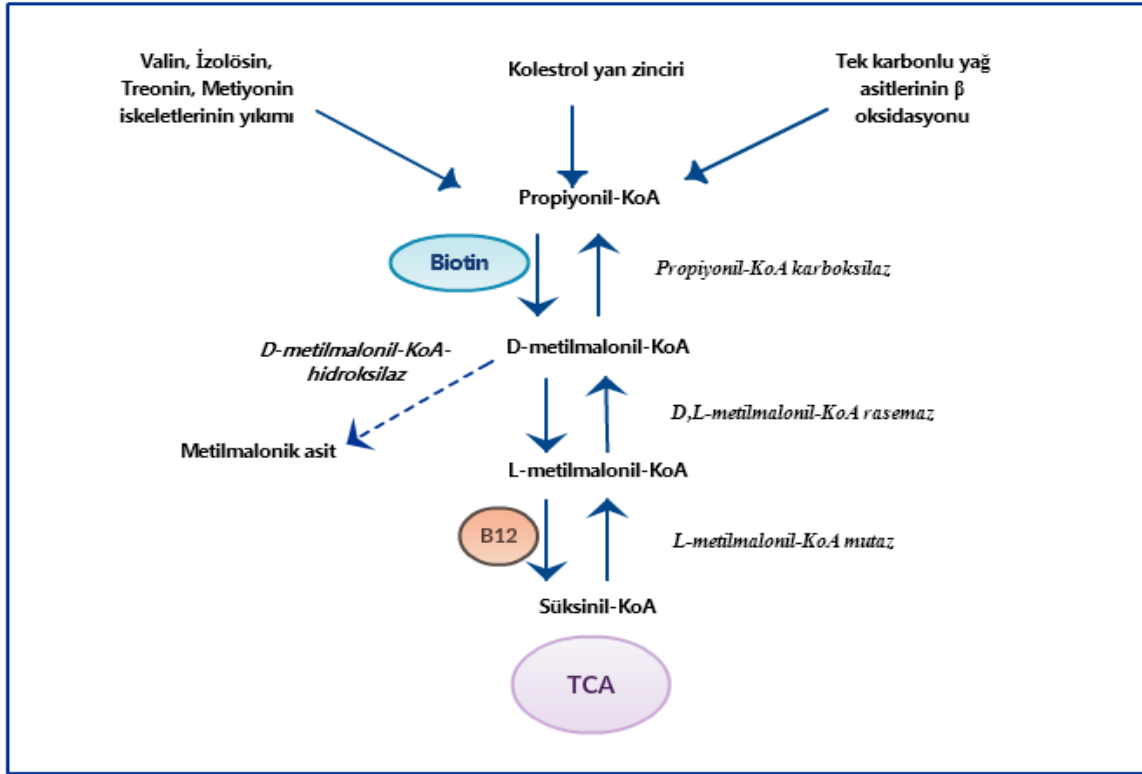
2.1.10. B12 Vitamininin Biyokimyasal Fonksiyonu

B12 vitamini insan biyokimyasında başlıca iki hücrel enzimatik reaksiyonda rol oynar. Birincisi metilmalonil KoA mutaz (EC 5.4.99.2)'ın katalizlediği metilmalonil KoA' nın suksinil KoA' ya dönüştüğü reaksiyon, ikincisi ise metiyonin sentetaz (EC 2.1.1.13)'ın katalizlediği homosisteinin metiyonine dönüştüğü reaksiyondur. Bu nedenlerle serumda B12 eksikliği MMA ve homosistein artışına neden olur.

2.1.10.1. Metilmalonik asit metabolizması

Valin, izolosin, metionin, treonin gibi bazı amino asitlerin karbon iskeletlerinin ve kolesterol yan zincirinin katabolizması ve tek karbonlu yağ asitlerinin beta oksidasyonu sonucunda propiyonil KoA oluşur. Propiyonil KoA, biyotin aracılıklı bir enzim olan propiyonil KoA karboksilaz sayesinde D-metilmalonil KoA 'ya dönüşür. D-metilmalonil KoA, D,L-metilmalonil rasemaz enziminin katalizlediği rasemizasyon reaksiyonu sonucunda L-metilmalonil KoA ya dönüşür. L-metilmalonil KoA, koenzim olarak adenosilkobalamin formundaki B12 vitaminine ihtiyaç duyan bir enzim olan L-metilmalonil KoA mutaz sayesinde TCA döngüsünde rol alan suksinil KoA ya izomerize olur. Metilmalonil KoA mutaz enziminin eksikliğinin yol açtığı otozomal resesif geçişli bir hastalık olan ve ağır bir klinik tablo oluşturan metilmalonik asideminin üç tipi vardır. Tip 1 metilmalonil KoA mutaz eksikliğinde, tip 2 B12 vitamini

eksikliğinde, tip 3 D,L- metilmalonil KoA rasemaz enzimi yetersizliklerinde ortaya çıkar (64). Bu durumlarda D-metilmalonil KoA, D-metilmalonil hidroksilaz enzimi aracılığı ile metilmalonik aside dönüşür ve dokularda birikir (**Şekil 3**) (54,83).



Şekil 3 D-metilmalonil CoA mutaz ve MMA ilişkisi

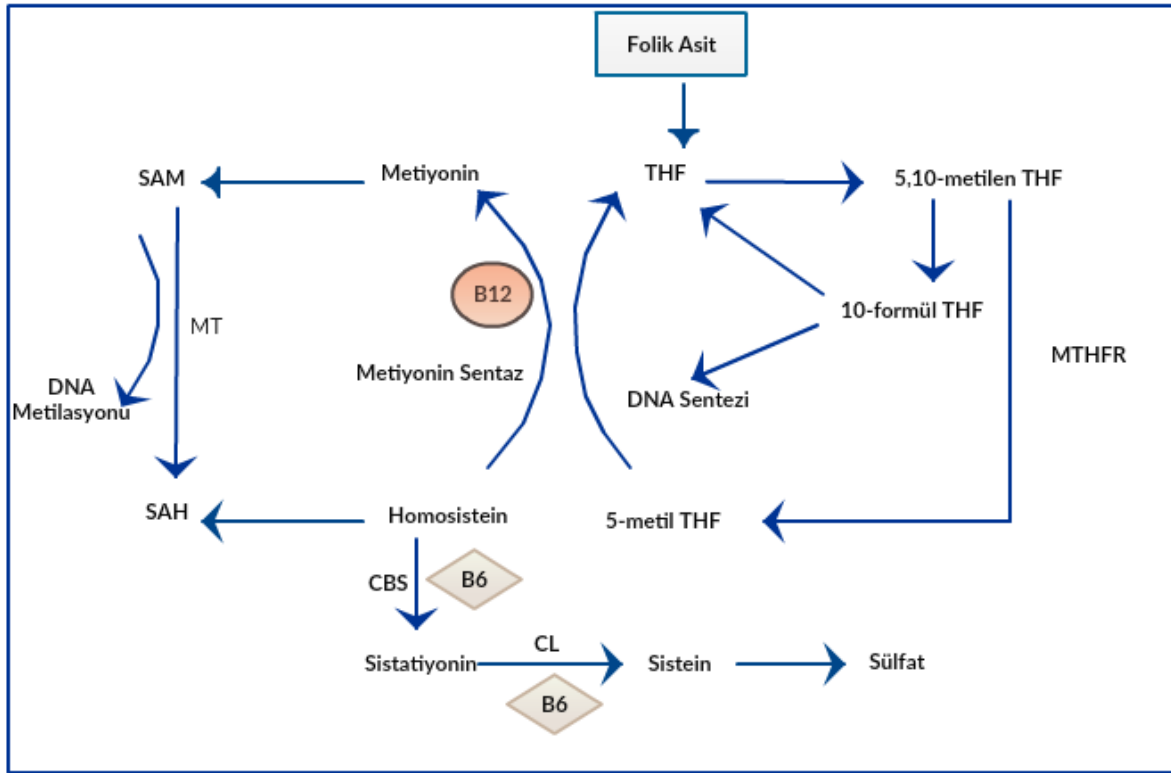
2.1.10.2. Homosistein Metabolizması

Homosistein metiyoninden metabolize olan tiyollü esansiyel bir amino asittir. Remetilasyonunda B12 vitaminine, sülfirasyonunda ise B6 vitaminine ihtiyaç duyulur. İnsan plazmasında albümine bağlı olarak, dimerler halinde (homosistin), sistinlerle birleşerek veya serbest homosistein olarak bulunurlar. Bu farklı formlardaki homosisteinlerin ölçüm sonuçları total homosistein (t Hcy) olarak saptanır.

MTHFR677T (677C→T) mutasyonu, fiziksel aktivite eksikliği, uzun süreli açlık, sistatyonin β sentaz genindeki mutasyonlar, yaşlılık, cinsiyet (erkek), sigara kullanımı, aşırı kafein alımı, menopo, renal yetmezlik, B12 ve B6 vitamini eksiklikleri, diyabet, fenitoin ve karbomezapin gibi ilaçların kullanımı hiperhomosisteinemi nedenleri arasında yer alır.

Homosistein vücutta ya remetilasyon ya da transsülfürasyon yolu ile metabolize olur. Transsülfürasyon yolunda homosistein, fonksiyonu için B6 vitamini ihtiyacı duyan bir enzim olan sistatyonin β sentaz aracılığı ile sistatyonine dönüşür. Sistatyonin yine B6 vitamini ve γ sistatyonaz'ın aracılığı ile sisteine hidrolize olur. Son olarak sistein sülfat'a hidrolize olur.

Transmetilasyon yolunda, homosistein metiyonin döngüsünde BHTM (betain homosistein metiltransferaz) enzimi betainin metil grubunu homosisteine aktararak metiyonini oluştururken kendisi dimetilglisine dönüşür. Folat döngüsünde 5-10 metiltetrahidrofolat MTHFR (metilentetrahidrofolat redüktaz) enzimi aracılığı ile 5-metiltetrahidrofolata dönüşür. 5-metiltetrahidrofolatın bir metil grubu B12 vitamini ve Metiyonin sentetazın aracılığı ile homosisteine aktarılırak metiyonin oluştururken, diğer taraftan da tetrahidrofolat meydana gelir (65,66).



Şekil 4 Metiyonin sentaz ve Homosistein ilişkisi

2.2. B12 Vitamini Eksikliği

2.2.1. B12 Vitamini Eksikliği Prevalansı

B12 vitamini eksikliği bütün dünyada yaygın bir halk sağılığı problemi haline gelmiştir. B12 eksikliği prevalansı toplumdan topluma farklılık gösterir, hatta aynı toplumda farklı yaş gruplarında, farklı sosyoekonomik gruplar ve farklı beslenme alışkanlıklarına sahip gruplarda yapılan çalışmalarda değişik sonuçlar alınmıştır. Çok değişken sonuçlar alınmasının bir diğer nedeni ise, eksikliğin anlaşılması için kullanılan testlerin ve referans aralıklarının farklı seçilmesidir. İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde 1-5 yaşları arasındaki 404 çocuk ile yapılan bir çalışmada, B12 vitamini eksikliği prevalansı %23,3 olarak saptanırken (67), Şanlıurfa'da 9-12 yaş arasında 203 çocuk ile yapılan başka bir çalışmada eksiklik prevalansı %10,8 olarak saptanmıştır (68).

2.2.2. B12 Vitamini Eksikliği Nedenleri

B12 vitamini eksikliği nedenleri diyetle eksik alım, malabsorbsiyon bozukluğu ve kalıtsal nedenler başlıkları altında toplanabilir.

2.2.2.1. Diyetle Eksik Alım

B12 vitamini et, süt ürünleri, deniz ürünleri ve yumurta gibi hayvansal gıdalarda yüksek miktarda bulunur. Vücutta 2-5 mg depo B12 vitamini vardır, bu nedenle katı vejetaryen diyetlerde bile ancak 2-5 yıl sonra B12 vitamini eksikliğine bağlı klinik bulgular ortaya çıkar. Gelişmekte olan ülkelerde B12 vitaminine erişim ekonomik açıdan daha zor olduğu için diyetle eksik alıma bağlı olarak B12 eksikliğinin daha çok görülmesi beklenir.

Gebelik sürecinde ve laktasyonda B12 vitamini ihtiyacı artar. Ülkemizde süt çocukluğu döneminde görülen B12 vitamini eksikliğinin nedeni de annenin serum B12 vitamini düzeyinin düşük olmasıdır, bu durum kobalamin depoları yetersiz çocukların doğmasına neden olur. Ayrıca annenin dolaşımında intrensek faktör (IF) antikorları var ise bu antikorlar plasenta yoluyla fetusa geçer ve fetusta bu antikorun titresi yüksek ise doğumdan itibaren ilk birkaç hafta içinde intestinal emilim bozulur. Altıncı aydan sonra bebeklerin ek gıda almaya başlamasıyla tekrar B12 vitamini seviyeleri artmaya başlar. Gebelik takibi sırasında folik asit kullanımında olduğu gibi uygun bulunan gebelere B12 vitamini desteği önerilmelidir. Böylece infantil B12 vitamini eksikliğinin önüne geçilebilir (61).

2.2.2.2. Malabsorbsiyon Bozuklukları

B12 malabsorbsiyon bozukluğuna verilebilecek en klasik örnek pernisiyöz anemidir. Gastrik paryetal hücrelere karşı antikor üretimi, çoğu olguda görülür. Paryetal hücrelerde harabiyet, intrensek faktör ve hidroklorik asit salgılanmasında azalmaya neden olarak B12 vitamini emilimini kısıtlar.

Total ve parsiyal gastroktemiden sonra paryetal hücreleri içeren dokular alındığı için B12 emilimi azalmakta ve bir süre sonra klinik bulgular ortaya çıkmaktadır, İleal rezeksiyonda özellikle terminal ileumun çıkarıldığı durumlarda da B12 vitamini eksikliği görülebilir.

İnce bağırsakta aşırı bakteri çoğalması B12 vitamininin emilemeden önce bakteriler tarafından kullanılarak, eksikliğine neden olabilir. Özellikle intestinal parazit enfeksiyonlarında parazitin besine ortak olması, yeme isteğinin azalması, bağırsak duvarlarında parazitler nedeniyle enflamasyon oluşması B12 vitamini malabsorbsiyonuna neden olmaktadır.

İleri yaşlarda B12 vitamininin vücut tarafından emilmesi zorlaşır. Araştırmalar 65 yaş üzeri kişilerin %40 ında B12 vitamini yetersizliği olduğunu göstermektedir. İleri yaşlı bireylerde paryetal hücrelerde azalma ve mide salgısında azalma meydana geldiği için B12 vitamini eksikliğine daha sık rastlanır.

Omeprazol gibi gastrik asit salınımını baskılayan ilaçlar da besinlerden B12 vitamini emilimini engelleyebilir. Korozi ajanların içilmesi sonucunda gastrik mukozanın ciddi olarak hasar gördüğü durumlarda IF kaynağı zarar gördüğü için B12 vitamini emilimi engellenir. Asit sekresyonunu inhibe eden H2RA ve PPI ler IF sekresyonunu azaltarak bağırsakta bakteri kolonizasyonuna neden olduklarından malabsorbsiyona neden olurlar. Kolestramin, metformin, kolçisin, nitroz oksit, aspirin B12 vitamini eksikliği ile suçlanan diğer ilaçlardır (60). Ayrıca nonsteroid antienflamatuvar ilaçlar da aynı mekanizma ile gastrik mukozal hasar yaparak B12 vitamini malabsorbsiyonuna neden olur.

2.2.2.3. Kalıtsal Hastalıklar

Konjenital İF eksikliği, gastrik IF'yi kodlayan gendeki (11q12.1) mutasyonlara bağlıdır. Otozomal resesif geçiş gösterir. GİF geninde 7 farklı mutasyona rastlanmıştır (OMIM No: 261000).

İmerslund-grasbeck sendromu otozomal resesif geçişlidir. CUBAM kodlayan iki farklı gendeki mutasyonlarla ilişkilidir. CBN geni;10p13. ve AMN geni;14q.32.32 yerleşim yeridir (OMIM No: 261100).

Transkobalamin II eksikliği, TCN2 genindeki (22q12.2) otozomal resesif geçişli bir mutasyon sonucunda B12 vitamini hücre içine alınamaz (OMIM No:275350).

2.2.3. B12 Vitamin Eksikliğinin Klinik Belirtileri

B12 vitamini, folik asit ve B6 vitamini ile birlikte DNA sentezinde görev alır. Bu vitaminlerin eksikliğinde hematopoetik sistem etkilenir. Kan hücreleri bölünemez ve anormal derecede büyürler. Makrositoz denilen bu fenomen genellikle teşhiste ilk adımı oluşturur. B12 vitaminin diğer bir önemli fonksiyonu aerobik solunumda sitrik asit döngüsünde yer alan suksinil KoA ile ilişkilidir. Dolayısıyla eksiklik birden fazla sisteme etki eder. Eksiklik şiddeti ve süresine göre belirtiler heterojenite gösterir.

2.2.3.1. Hematolojik Belirtiler: Megaloblastik anemi B12 eksikliğinin en klasik bulgusudur. Kobalamin eksikliğinde aneminin görülme nedeni, azalmış DNA sentezi hızıdır. Bu durum eritrositlerde ortalama hücre hacmi (MCV) artışını beraberinde getirir. Bununla birlikte MCV ölçümü B12 vitamini için duyarlı ve özgül denilemez. Birçok olguda MCV yükselmeden hastalarda nörolojik bulguların ortaya çıktığı görülmüştür. Ayrıca demir eksikliklerindeki mikrositer anemi B12 vitamini eksikliğindeki makrositer anemiye maskeleyebilir. Laboratuvar bulgularında ayrıca nötrofillerde hipersegmentleşme, lökopeni, trombositopeni, yüksek LDH, AST ve indirekt bilirubin değerleri, düşük haptokorrin düzeyleri görülebilir (69).

2.2.3.2. Nöropsikiyatrik Belirtiler: B12 vitamini ve folik asit sinir sistemindeki çeşitli metabolik yollar için gerekli olan vitaminlerdir. B12 vitamininin aracılık ettiği homosistein metabolizmasında görevli bir enzim olan SAM (S-Adenozil metiyonin), merkezi sinir sisteminde ve nörotransmitterlerde gerçekleşen, nöronları koruyan ve

fonksiyon görmelerini sağlayan 35 kadar transmetilasyon reaksiyonunda metil donörü olarak görev yapmaktadır. Bu metilasyon işlemlerinin inhibe olması, çeşitli nörolojik ve psikiyatrik hastalıkların patogenezinde rol oynar. B12 vitamini ve folik asit düşüklüğünde metiyonin sentaz aktivitesi bozulacağı için homosistein düzeyi artar. Homosistein yüksek konsantrasyonlarda nöron hücreleri için toksiktir. Homosisteinin, nöronal plastisiteyi bozup nöronal dejenerasyonu aktive ederek nörodejeneratif ve psikiyatrik bozuklukların patogenezinde katkıda bulunduğu öne sürülmektedir (70). Homosisteinin oksidasyonu sırasında oluşan homosisteik asit gibi metabolitler hücre içi Ca^{+2} artışı ile proapoptotik proteinleri aktive ederek apoptoza neden olur. Ayrıca, homosisteinin oksidasyonu sonucu oluşan reaktif oksijen türlerinin oksidatif stres tetiklediği ve serbest radikal aracılı oksidatif stresin ise, nörodejeneratif ve psikiyatrik hastalıkların altında yatan en önemli sebep olduğu belirtilmektedir.

B12 vitamininin organizmada koenzim olarak görev aldığı diğer bir önemli reaksiyon olan metilmalonik asitin suksinil CoA ya dönüşümü reaksiyonu yağ asitlerinin metabolizmasında önemli bir role sahiptir. Bu nedenle B12 vitamini eksikliğinde anormal lipidlerin birikimi saptanmıştır. Bu birikim nörodejenerasyona sebep olabilmektedir. Bu durum, subakut kombine dejenerasyon olarak bilinir (73). Subakut kombine dejenerasyon sonucunda demans, depresyon, Alzheimer ve parkinson hastalığı görülebilir. B12 vitamini eksikliği; ekstremitelerde yanıcı tarzda ağrı veya duyu kaybı, güç kaybı, spastisite ve paralizi, konfüzyon, oryantasyon bozukluğu ve bunama gibi ciddi ve sıklıkla geri dönüşümü olmayan nörolojik bozukluklara neden olur (71). Ayrıca, B12 vitamini eksikliği sonucunda sık olmamakla birlikte; ajitasyon, irritabilite, negativizm, yönelim bozukluğu, bellek kaybı, konsantrasyon bozukluğu, dikkat eksikliği, apati, uykusuzluk, kişilik değişiklikleri, halüsinasyon, şiddete meyil, paranoya gibi psikiyatrik belirtiler görülürken; depresyon, bipolar bozukluk, psikoz, fobi, kronik yorgunluk sendromu gibi psikiyatrik bozukluklar da gelişebilmektedir (72,73).

2.2.3.3. Kardiyovasküler Hastalıklar: Kardiyovasküler hastalıklar bulaşıcı olmayan hastalıklardan doğan mortalitenin başta gelen nedenlerindendir. Homosisteinürilerde aterosklerozun sık görüldüğü anlaşıldıktan sonra ilk kez 1975 yılında McCully tarafından aterosklerozda homosistein teorisi ortaya atılmış ve

yüksek homosistein düzeylerinin kardiyovasküler hastalıklara neden olabileceği bildirilmiştir (74). Son yıllarda yapılan çalışmalarda hiperhomosisteinin endotel hücrelerde hasara yol açabileceği, endotelin antikoagulan özelliğini prokoagulan özelliğine dönüştürebileceği ve in-vitro düz kas hücrelerinde proliferasyona neden olabileceği gösterilmiştir (75). Ayrıca hiperhomosisteinin felç vakalarında görüldüğü bildirilmiştir (76).

2.2.3.4. Gastrointestinal Hastalıklar: Vitamin B12 eksikliği olan bazı hastalarda anemi ve nörolojik bulgulara rastlanmazken, gastrointestinal sistem bulguları görülebilir. Gastrointestinal sistem hücreleri yüksek yenilenme potansiyeli ve DNA sentezinde artış nedeniyle B12 eksikliğine karşı hassastır (77). Ayrıca gastrointestinal sistem hastalıklarının bir kısmının malabsorbsiyona da neden olması, GİS hastalıklarında B12 eksikliğinin sık görülmesine neden olur. İştahsızlık, bulantı, kabızlık, diare, İBS, mukozal atrofi, pamukçuk, glossite bağlı dilde ağrı, gluten kaynaklı enteropati, ve hunter dili (kırmızı-papillar atrofik dil) görülebilir (78-79-80).

2.2.4. B12 Vitamini Eksikliğinin Belirlenmesinde Kullanılan Biyokimyasal Parametreler

B12 vitamini eksikliğinin erken tanısı, yüksek prevalansı ve önemli hastalıkları beraberinde getirmesi nedeniyle insan sağlığı açısından önem taşır. Rutin olarak kullanılan testler B12 vitamini durumunu göstermek için yetersiz kalmaları nedeniyle B12 durumunu belirleyen daha özgül ve duyarlı testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Aşağıda rutin ve henüz rutin olarak kullanımı yaygınlaşmamakla birlikte duyarlılık ve özgüllüğü geleneksel parametrelere göre daha yüksek olan testler yer almaktadır:

2.2.4.1. Ortalama Eritrosit Hacmi (MCV)

MCV rutin hemogram panelinde yer alan bir diğer B12 eksikliği göstergesidir. B12 vitamini eksikliğinin sonucunda DNA sentezinde yavaşlama olması, mitotik bölünme hızındaki azalma makrositoz oluşumuna ve MCV düzeylerinde artışa neden olur. Artmış MCV düzeyleri folik asit eksikliği, aşırı alkol kullanımı, ilaç kullanımı ve miyelodisplastik sendromda da görülebildiği için MCV, B12 vitamini durumunu göstermek için özgün bir biyobelirteç değildir. Ayrıca B12 eksikliğinin geç bir

biyobelirtecidir (81). B12 vitamini eksikliği ile ilişkili nörolojik bulguları olan hastaların ancak %25'inde MCV düzeyleri yüksek bulunmuştur (82).

2.2.4.2. Serum B12 vitamini

B12 vitamini eksikliği tanısı için başlangıçta yapılan rutin ve klasik bir ölçümdür. Ucuz, yaygın ve otomatik bir ölçüm yöntemine sahip olması gibi avantajları olmakla birlikte düşük özgüllük ve duyarlılığa sahip olması açısından tartışmalıdır. Serum B12 düzeyi ölçümü, dolaşımdaki B12 vitaminin yaklaşık %80 ini oluşturan hücrenin içeriğine alınamayan pasif formu (haptokorrin'e bağlı olan form) ve yaklaşık %20 sini oluşturan aktif formu (transkobalamin II' ye bağlı olan form) birlikte ölçen bir parametredir (83). Bazı ölçümlerde yüksek titreli İntrensek faktör antikoruna sahip hastalarda hatalı olarak normal değerler arasında sonuçlar alınmıştır.

Serum B12 düzeyi ölçümünün tanı açısından sınırlayıcı olan bir diğer yönü de ciddi eksiklik halinde bile hücre içi depoların harcanarak serum B12 düzeylerinin korunması nedeniyle eksikliğin maskelenmesidir (83).

Bir diğer tartışmalı durum "subklinik B12 vitamini eksikliği" kavramının tanımlanmasıdır. Klinik belirti göstermeden ve sonuçlar normal değer aralığı içerisindeyken bile B12 eksikliğinden söz edilebilir. Genellikle 148 pg/mL nin altındaki serum B12 vitamini konsantrasyonları B12 vitamini eksikliği için tanı koydurucu olarak yeterlidir. Özellikle serum B12 vitamini konsantrasyonları 148 pg/mL ile 200 pg/mL arasında olan hastalar olmak üzere hastada biyokimyasal bulgular oluşmadan dahi nöropsikiyatrik ve metabolik belirtiler ortaya çıkabilmektedir. Bu yüzden B12 vitamini normal değer aralığı tartışmalı bir konudur.

2.2.4.3. Holotranskobalamin (holoTC)

Serumda B12 vitamini iki farklı bağ yapar. Holohaptokorrin oluşturmak için haptokorrine bağlanır veya holotranskobalamini oluşturmak için transkobalamine bağlanır. Hücreler B12 vitaminini sadece holotranskobalamin şeklinde alabilirler. Bu nedenle holotranskobalamin ölçümü plazma kobalamin düzeyinin aktif fraksiyonu ölçümü olarak nitelendirilebilir. Bazı araştırmacılar holotranskobalamin ölçümünün, B12 eksikliği tanısında MCV düzeyleri ve serum B12 vitamini ölçümüne göre daha

spesifik olduğunu savunurken (85), bazı araştırmacılar B12 vitamini ve MCV ye eşdeğer olduğunu savunmuştur (87).

Holotranskobalamin ölçümü için alt değerler çalışılan yöntemle göre 19-42 pmol/L, üst değerler 134-147 pmol /L arasında değişmektedir (87). Alt ve üst değer aralıklarının belirlenmesi için daha geniş popülasyonlarla yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır. Laboratuvarların kendi referans aralıklarının kendilerinin belirlemesi veya kit sağlayıcının önerdiği referans aralıklarının kullanılması önerilmektedir. Oral kontraseptif ilaç kullananlarda ve hamilelerde B12 vitamini durumunu daha spesifik olarak gösterdiği kanıtlanmıştır (88).

Holotranskobalamin ölçümü için herhangi bir ön hazırlığa ihtiyaç duyulmaması ve örneklerin uzun süre saklanıp toplu halde çalışılabilmesi gelecekte rutin kullanımı için umut vaat etmektedir.

Holotranskobalamin ölçümü için üç farklı yöntem geliştirilmiştir. Birinci yöntem transkobalaminin iyonlarla çöktürülmesi ve çöktürme sırasında sıkışan B12 vitamini miktarının ölçümüne dayalıdır (89). İkinci yöntem iyonik separasyondan ziyade transkobalamine yönelen antikorların ölçümü esasına dayanır (90). Ulleland ve arkadaşları bu ikinci yöntemi geliştirerek tutulan B12 vitamininin izotoplarının ölçülmesi esasına dayanan radyoimmunoassay (RIA) yöntemini buldular (91). Üçüncü yöntem ise ELISA yöntemidir (92).

2.2.4.4. Homosistein (Hcy)

Metiyoninden köken alan ve sülfür içeren bir aminoasittir. Plazmada homosisteinin büyük kısmı (>%80) disülfid bağlarıyla proteinlere bağlı olarak bulunur. Yüzde ikiden daha az bir kısmı serbest tiol şeklinde bulunur. Tüm Hcy formları kanda total Hcy (tHcy) olarak ölçülmektedir (83). Normal değer aralığı 5-15 µmol/L dir.

Koenzim olarak B12 vitaminine ihtiyaç duyan metiyonin sentaz enzimi aracılığı ile metiyonine dönüşür. Bu durumun doğal bir sonucu olarak B12 eksikliğinde Hcy düzeyi artar. Eksiklik derecesi arttıkça Hcy'deki yükselme artar. B12 eksikliğine karşı duyarlıdır ama özgül değildir çünkü B6 vitamini eksikliğinde de serum homosistein düzeylerinde artış görülür. Homosistein metabolizması reaksiyonlarında,

homosisteinin sistatyonine ve sistatyonin sisteine dönüşümünde B6 vitaminine ihtiyaç vardır (şekil 2). Dolayısıyla yeterli B6 vitamini olmadığı durumlarda homosistein düzeyinde artış görülür. Böbrek yetmezliği, hipotroidi, genetik polimorfizmler ve folik asit düşüklüğünde de Hcy yükselebilir.

Homosistein düzeyinin kardiyovasküler hastalıklar için başlı başına bir risk faktörü olarak tanımlanmasından sonra, klinik biyokimya laboratuvarları açısından önemli bir parametre haline almaya başlamış, güvenilir ve otomatik ölçüm yöntemleri geliştirilmesi için teknikler geliştirilmeye başlanmıştır. Öncelerde Hcy için aminoasit analizörlerinde ninhidrin kullanılarak düşük duyarlılıkla sonuçlar alınmıştır. 1980 lerin ortalarında enzimatik, kromatografik ve spektrofotometrik yöntemler geliştirilmiş, 1990 ların ortalarında ise immünoassay yöntemi geliştirilmiştir. Günümüzde çoğu laboratuvar LC ile çalışılmaktadır. Sıvı kromatografik şartlarda elde edilen bileşiğe ait piklerin rezolüzyonunda ve bileşiğin özgüllüğünde problem yaşanabilir. Bu yüzden GC/MS ve LC-MS/MS yöntemleri geliştirilmiştir.

Homosistein ölçümünün uygulamada klinik biyokimya laboratuvarı açısından dezavantajları; plazma örneğinin +4 derece altındaki sıcaklıklarda tutulmasının gerekmesi dolayısıyla soğutmalı santrifüj kullanılması ve 2 saatten önce santrifüjünün yapılarak plazmanın eritrositlerle temasının kesilmesi gerekmektedir.

2.2.4.5. Metilmalonik asit (MMA)

Son yıllarda metabolit düzeylerinin ölçümü aracılığı ile kobalamin eksikliği tanısı konulması giderek yaygınlaşmaktadır. Homosisteinin folat eksikliğinde de yükselmesi nedeniyle, metilmalonik asit ölçümü B12 vitamini eksikliği için daha spesifik bir test olarak kabul edilmektedir (93).

Metilmalonik asit dört karbonlu bir moleküldür $[\text{COOH}-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOH}]$. B12 vitaminin besinsel ve fonksiyonel eksikliğinde adonozilkoblamin bağımlı bir mitokondriyal enzim olan metilmalonil KoA mutaz inaktive olur ve MMA dokularda birikir. Bu reaksiyon başka bir vitamin tarafından katalizlenemediği için MMA düzeyi B12 vitamini eksikliği için son derece spesifik bir biyobelirteçtir. Özellikle serum B12 düzeylerinin normal sınırlarda olduğu ancak, hücre içi düzeylerinin düşük bulunduğu “subklinik B12 eksikliği olarak tanımlanan erken evrede metilmalonik asit, serum B12

düzeylerinden daha önce yükseldiği için erken biyobelirteç olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca oksidatif strese bağlı olarak B12 vitamini hücrelerde fonksiyon görmese de hastada total B12 düzeyinin normal değer aralığında çıktığı durumlar olabilir, bu gibi durumlarda da MMA ölçümü değerlidir.

Diğer yandan, B12 eksikliği dışında da MMA düzeylerinin arttığı durumlar olabilir. Bu durumlara bir örnek olan böbrek yetmezliğinde idrarda MMA çalışılarak idrar kreatinin değerleri ile normalize edildiğinde bu dezavantaj ortadan kalkmaktadır. Ayrıca, metilmalonik asidüri olarak adlandırılan metilmalonil KoA mutaz enziminin doğumsal eksikliğinde idrar ve kanda MMA düzeyleri artabilir, ancak bu doğumsal hastalığa sahip çocuklarda, serum B12 vitamini düzeyi değişmemektedir. Hipovolemiye neden olan durumlar ve barsakta bakteri artışı da MMA'nın yükselmesine neden olabilir (129).

Amerikan Ulusal Sağlık ve Beslenme Değerlendirmesi Çalışması (NHANES) programı subklinik B12 vitamini durumunu göstermek için tercihan serum B12 ve holoTC arasından B12 vitamini düzeyini, metabolik biyobelirteçler (MMA ve homosistein) arasından ise tercihan MMA olmak üzere en az iki biyobelirteç kullanılmasını önermektedir (83).

Metilmalonik asit düzeylerinin belirlenmesi amacıyla kan ve idrar kullanılabilir. İdrar örneği ile çalışmanın avantajı ölçüm aralığının geniş olmasıdır. Metilmalonik asit düzeyleri idrarda kandaki konsantrasyonuna göre 40 kat fazladır. Böbrek yetmezliği bulunan hastalarda serum ve plazma ile yapılan MMA ölçümleri hatalı sonuçlar verebilir, çünkü idrarla atılacak olan MMA tam olarak vücuttan uzaklaştırılmaz ve serum ve plazmada birikir. Kan örneği çalışmanın örnek toplamada kolaylık, hastanın diyetinin serum ve plazma MMA düzeyini daha az etkilemesi ve normalizasyon için idrarda gerektiği gibi kreatinin ölçümüne ihtiyaç duyulmaması gibi avantajları vardır (129). Yukarıda belirtilen biyolojik sıvılara ek olarak 1982 yılında yapılan bir çalışmada Artkur B. ve ark. prenatal amacıyla amniyon sıvısı örneklerinde MMA düzeyini belirleyebilmek için stabil izotop dilüsyon metodunu geliştirmişlerdir (130).

Biyolojik sıvılarda MMA analizi için kullanılan başlıca yöntemler yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC), kapiller elektroforez, gaz kromatografi kütle spektrometri (GC/MS) ve sıvı kromatografi tandem kütle spektrometri (LC MS/MS) dir (131,132,133). Kapiller elektroforez yöntemi türevlendirme gerektirdiği ve işlem süresinin uzun olması gibi nedenlerle tercih edilmemektedir. HPLC yöntemi yetersiz ayırlama ve internal standartın olmayışı nedeniyle özgüllüğün düşük olması ve türevlendirme işleminin sonuç sürelerini uzatması gibi nedenlerle tercih edilmemektedir. MMA nın hidrofilik ve uçucu olmayan yapısı nedeniyle doğrudan GC/MS ile ölçümü mümkün değildir, türevlendirme gereklidir. GC/MS ile çalışmak, matriks bileşenlerinin temizlenmesi, kurutma ve türevlendirme gerekliliği nedenleriyle sonuç süresinin uzamasına yol açmaktadır. LC MS/MS in, GC/MS e göre daha hızlı, hassas ve düşük maliyetli olması, daha az örnek hacmi ile çalışılabilmesi, yüksek tekrarlanabilirliği ve doğruluğu nedeniyle tercih edilmektedir. LC MS/MS ile MMA ölçümünün diğer bir avantajı ise MMA nın yapısal izomeri olan suksinik asitten ve girişim yapabilecek diğer izobarik bileşiklerden yeterli ayrımın sağlanmasıdır (83). 2015 yılında yapılan bir çalışmada, MMA analizi açısından LC MS/MS ile GC /MS karşılaştırılmış, LC MS/MS in daha güvenilir sonuçlar verdiği ortaya konmuştur (129).

2.3. OBEZİTE

2.3.1. Obezitenin tanımı ve tarihte obezite

En basit tanımıyla obezite, vücutta aşırı yağ birikmesidir. Dünya sağlık örgütü obeziteyi, sağlığı bozacak ölçüde yağ dokularında aşırı miktarda yağ birikmesi olarak tanımlamıştır. Yetişkin erkeklerde vücut ağırlığının %15-20'sini, kadınlarda ise %25-30'unu yağ dokusu oluşturmaktadır. Erkeklerde bu oranın %25'in kadınlarda ise %30'un üzerine çıkmasıyla obeziteden söz edilir.

Obezite Latince yemek yeme anlamına gelen "obedere" kelimesinin geçmiş zaman hali olan iyi beslenmiş anlamına gelen "obesus" sözcüğünden türemiştir. Türkçe karşılığı olan şişman sözcüğü ise kabarık, kitle anlamlarına gelen "şiş" sözcüğünden türemiştir (94).

Obezite insanlık tarihinin eski dönemlerinde savaş ve kıtlık tehlikesinin de etkisiyle bir sağlık sorunu olarak görülmemiş, aksine refah zenginlik ve sağlık belirtisi olarak görülmüş, obez bireylerin daha dirençli olduklarına inanılmıştır. Kıtlık zamanında enerjiyi en verimli şekilde depolayabilen bireylerin hayatta kalma şansları artar. İnsanoğlu diğer avcı ve toplayıcılardan farklı olarak yiyecek işleme ve saklama metodlarını geliştirmesi, vahşi doğanın ona yiyecek sunduğu zaman aralığında değil daha uzun süre açlıktan kurtulmayı sağlamak gibi faydalar sağlasa da bu durum istenmedik bir durum olan obeziteyi de beraberinde getirmiştir.

Toplumsal normlar ve yaklaşımlar sanat eserlerini etkiler. Paleolitik çağa ait birçok heykel ve gravürde kalça ve göğüs kısmı çok şiş olanlara rastlanmıştır. Avusturya'da 23000 yıl öncesine tarihlenen Willendorf venüsü adlı heykelde abdominal obezite dikkat çekmektedir. Anadoluda bulunan M.Ö. 5000 yılına tarihlenen ana tanrıça heykeli de obezitenin betimlendiği bir diğer heykeldir. Benzer figürler Avrupa ve diğer kıtalarda da bulunmuştur (128). Antik Mısırda firavun 3. Ramses ve karısı Inhapy'nin mumyalarından yola çıkılarak obez oldukları anlaşılmıştır. Obezitenin hastalıklarla ilişkili olabileceği ilk olarak antik Yunanda düşünülmüş Hipokrat obezitenin infertilite ve erken ölümlere neden olabileceğini öne sürmüştür (128).

Obez olma durumu daha sonraki yıllarda da bazı sanatçılar tarafından estetik bulunmuş, Rubens (1571-1640) ve Renoir (1841-1919) gibi ressamın eserlerinde obez figürlere daha çok yer vermişlerdir. Estetik kaygılar ile soylu ailelerin çocuklarını aşırı beslenme yoluyla şişmanlamaları için yeme kamplarına aldıkları kaydedilmiştir.

Sanayi devrimi ile birlikte obezite yavaşlık, problemli ve sağlıklı olma gibi kavramlarla beraber anılmaya başlamıştır (95). Günümüzde ise obezite acil önlem alınması gereken bir durum olarak algılanmakta, obez bireylerde benlik saygısı ve beden algısında bozulmalar görülmektedir (96).

2.3.2. Obezitenin prevalansı

Obezite tüm dünyayı etkilemektedir. Gelişmiş ülkelerden sonra gelişmekte olan ülkelerde de özellikle kentsel alan etrafındaki popülasyonda obezite artışı gözlenmiştir. Önceleri sadece yetişkinler için önlemler alınırken günümüzde çocukluk çağında bile prevalansı artmıştır. Bunun başlıca nedenleri arasında hareketsiz yaşam tarzı, çocukların oyun kültürlerinin değişip, sokakta içeriğinde egzersiz olan oyunlarla değil, elektronik ortamdaki oyunlar ile vakit geçirmeleri, hazır gıdalara yönelip daha çok karbohidrat ve yağ oranı içeren gıdalar ile günlük kalori ihtiyaçlarını gidermeleri alış veriş merkezlerine giderek sinema izleyen ve çıkışında fast food tarzı yemek yiyerek sosyalleşen gençlerin varlığı yer alabilir. Obezite yaş ve sosyal durum gözetmeksizin toplumun her kesiminde görüldüğü ve mortalitesi yüksek hastalıklara da neden olduğu için Dünya Sağlık Örgütü tarafından mevcut durum” Küresel Obezite Epidemisi “olarak tanımlanmıştır.

TÜİK verilerine göre 2008 yılında ülkemizde obezite oranı %15,2 iken, 2014 yılında %31,1 oranında artış göstererek %19,9 a ulaşmıştır. 15 yaş üzeri bireylerde yapılan çalışmaya göre, artış oranı kadınlarda %32,3, erkeklerde ise %24 olarak ölçülmüştür (101).

Tablo 2’deki değerler genel olarak incelendiğinde, düşük kilolu ve obez bireylerin oranlarında kadınların, normal ve fazla kilolu bireylerin oranlarında ise erkeklerin yüksek olduğu görülmektedir. Buna karşılık fazla kilolular ve obezler toplandığında (%53.8) ve erkeklerin(%53.5) yaklaşık olarak aynı oranda obez olduğu görülmektedir.

Dünya Sağlık Örgütü tarafından Asya, Afrika ve 6 Avrupa ülkesinde yapılan MONICA çalışmasına göre 10 yılda obezite prevalansı %10-30 arasında artış göstermiştir.

Obezitenin en sık görüldüğü ülke olan ABD’de Kronik hastalıkları önleme ve kontrol merkezi (CDC) tarafından ABD ulusal beslenme ve sağlık araştırması (NHANNES) çalışmasına göre obezite prevalansı erkeklerde %31.1, kadınlarda %33.2, 2006 yılında ise erkeklerde %33.3 kadınlarda %35.3 tür.

Avrupa’da yetişkinlerde fazla kilolu olma prevalansı erkeklerde %32-79, kadınlarda %28-78 arasında değişmektedir. Avrupa’da fazla kilolu olmanın en çok görüldüğü ülkeler, Arnavutluk, Bosna-Hersek, İngiltere(İskoçya bölgesi)’dir. En az görülen ülkeler ise Türkmenistan ve Özbekistan’dır. Bu ülkelerde obezite prevalansı erkeklerde %5-23, kadınlarda ise %7-36 arasında değişmektedir.

Tablo 2 Bireylerin VKİ değerlerinin yaş ve cinsiyete göre dağılımı.

Yıl ve cinsiyet (+15 yaş)		Düşük kilolu	Normal kilolu	Fazla kilolu	Obez (%)
2008	Toplam	4,2	48,2	32,4	15,2
	Erkek	2,7	48,1	36,9	12,3
	Kadın	5,9	48,2	27,4	18,5
2010	Toplam	4,7	45,5	33,0	16,9
	Erkek	3,5	46,1	37,3	13,2
	Kadın	5,9	44,7	28,4	21,0
2012	Toplam	3,9	44,2	34,8	17,2
	Erkek	2,7	44,7	39,0	13,7
	Kadın	5,1	43,6	30,4	20,9
2014	Toplam	4,2	42,2	33,7	19,9
	Erkek	2,8	43,7	38,2	15,3
	Kadın	5,5	40,7	29,3	24,5

Tablo 3 OECD ülkelerinde obezite prevalansı

Ülkeler	% (15+ yaş)	Ülkeler	% (15+ yaş)
Türkiye*	19,9	Hollanda	11,8
A.B.D.	28,7	İsrail	15,7
Almanya	15,7	İsveç	11,7
Belçika	13,7	İsviçre**	10,3
Danimarka	14,2	İtalya	10,3
Estonya**	19	İzlanda**	22,2
Finlandiya	15,7	Kanada	18,2
Fransa**	14,5	Kore	2,4
*veri 2014 yılına aittir, ** veri 2012 yılına aittir. Diğer ülkelerin verileri 2013 yılına aittir.			

Bazı OECD ülkelerine ait istatistikler incelendiğinde sonuçların farklı yıllarda elde edilmesi göz ardı edildiğinde (**Tablo 3**), obezitenin en yüksek olduğu ülke %28.8 ile ABD olurken, ikinci en yüksek obezite oranı %22.2 ile İzlanda' ya aittir, ülkemiz ise üçüncü sırada yer almaktadır. Bu durum göz önüne alındığında diğer birçok hastalığa neden olan obezitenin ülkemiz için çok önemli bir halk sağlığı sorunu olduğu görülmektedir.

Obezitenin en düşük oranda görüldüğü ülkeler ise %2.4 ile Güney Kore, %10.3 ile İzlanda ve İtalya olduğu görülmüştür (101).

Sağlık Bakanlığı tarafından 2010 yılında yapılan "Türkiye beslenme ve sağlık araştırması-2010" ön raporlarına göre coğrafi bölgelere göre obezitenin görülme sıklığı incelenmiş en yüksek görüldüğü bölgeler sırasıyla %33.1 ile Doğu Karadeniz, %33.0 ile İstanbul ve Batı Anadolu bölgeleri olmuştur (102).



Şekil 5 Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması-2010 sonuçlarına göre bölgelere göre obezite (102).

Obezite eğilimi özellikle çocuk ve adölesanlarda alarm verici boyuta ulaşmıştır. Çocukluk çağı obezitesindeki artış oranı yetişkin obezitesindeki artış oranının çok üzerine çıkmış, 1970 lerdeki değerlerin 10 katına çıkmıştır (102).

ABD’de CDC tarafından çocuk ve adölesanlarda obezite prevalansı NHANNES çalışmaları ile belirlenmiş, 2000 yılı persentil değerlendirme kurallarına göre 95 ve üzeri persentiller obez kabul edilmiş ve prevalans %16.3 olarak tespit edilmiştir (102).

Okul çağı çocuklarında Avrupa’nın değişik ülkelerinde yapılan çalışmalarda obezite prevelansı en yüksek olan ülke İspanya (6-9 yaşta %35) ve Portekiz(7-9 yaşta %32). En düşük olan ülkeler ise Slovakya (7-9 yaşta %15), Fransa (7-9 yaşta %18), İsviçre (6-9 yaşta %18) ve İzlanda (9 yaşta %18)’dir (102).

Boy uzunluğu ve vücut ağırlıklarında güvenilir verilerin elde edildiği 2 büyük uluslararası çalışma vardır. Birincisi Avrupa’da 2003 yılında 9 ülkede yayınlanan ve 11 yaşındaki çocukları baz alan “The Pro Children” adlı araştırmadır, obezite prevalansı erkeklerde %17, kızlarda %14 olarak tespit edilmiştir. İkinci büyük çalışma “Health Behavior in School-Aged Children Survey (HSBC)’dir. 41 ülkede 2001 ve 2002 yıllarında 11, 13 ve 15 yaş esas alınarak yapılmış bir çalışmadır. 13 yaş grubunda kızların %24’ü erkeklerin %34’ü fazla kilolu bulunmuştur. 15 yaş grubunda kızların %31’i erkeklerin %28’i fazla kilolu bulunmuştur. Obezite prevalansı ise 13-15 yaş grubunda kızlarda %5 erkeklerde %9 olarak saptanmıştır (103).

Ülkemizde de obezite sıklığı Dünyadaki duruma paralel olarak artmaktadır. Türkiye'nin farklı bölgelerinde 2000-2010 yılları arasında yapılan 12 farklı çalışmaya göre 6-18 yaş arası çocuklarda aşırı kiloluluk durumu prevalansının %10.3-17.6, obezite prevalansının ise %1.9-7.8 arasında değiştiği saptanmıştır (103).

Türkiye Beslenme ve sağlık araştırması-2010 verilerine göre 0-5 yaşta obezite sıklığı %8.5(erkek %10.1, kız%6.8), 6-18 yaş arası %8.2(erkek %9.1, kız %7.3) olarak saptanmıştır (104).

Sağlık Bakanlığı, Milli Eğitim Bakanlığı ve Hacettepe Üniversitesi tarafından 2009 yılında yapılan " Türkiye'de okul çağı çocuklarının büyümesinin izlenmesi projesi" raporunda 6-10 yaş arası çocuklarda fazla kiloluluk oranının % 14.3, obezite oranının ise % 6.5 olduğu saptanmıştır.

Ülkemizin çeşitli bölgelerinde çocukluk ve adölesan dönem obezitesi ile ilgili yapılan çalışmalarda değişik sonuçlar alınmıştır. Muğla'da 6-15 yaş arası 1170 bireyle yapılan çalışmada kızların %18.1'inin fazla kilolu, %6.6'sının obez olduğu, erkeklerin ise %16'sının fazla kilolu,%7.6'sının obez olduğu saptanmıştır (105). İstanbul, Ankara ve İzmir'de 1044 çocukla yapılan bir çalışmada %12 fazla kilolu, %2 obez çocuk tespit edilmiştir (106). Kayseri'de yapılan bir çalışmada %10.6 fazla kilolu, %1.6 obez çocuk tespit edilmiştir (107). Ankara'da 3963 çocukla yapılan bir çalışmada çocukların %11.1 i fazla kilolu %7.5'i obez olarak saptanmıştır (108). İzmir'de 7-18 yaş arası 2200 bireyle yapılan bir çalışmada kız öğrencilerde obezite prevalansı %8.4, erkeklerde %13.1 bulunmuş fazla kiloluluk prevalansı ise kızlarda %12.1 erkeklerde %15.1 olarak tespit edilmiştir (109). İzmir'de yapılan ve Karşıyaka ilçesini kapsayan başka bir çalışmada kızlarda obezite oranı %17.3, erkeklerde %36.5, toplamda %26.9 bulunmuştur (110). Muğla, İstanbul ve Iğdır illerinde 1134 öğrencinin katıldığı bir başka çalışmada %10.8 oranında fazla kilolu, %5.3 oranında obez olduğu görüldü (111). İzmir'de Menemen ilçesini kapsayan başka bir çalışmada 12-16 yaş grubundan 740 adölesan ile çalışılmış, obezite oranı %7.8 olarak saptanmıştır (112). İzmir ili Balçova ilçesinde 15-17 yaş arası 1089 öğrenci ile yapılan bir çalışmada %10.1 aşırı kilolu, %9.1 obez adölesan tespit edilmiştir (113).

2.3.3. Obezite Ölçüm Teknikleri:

Obezite ile etkin mücadele için ilk adım doğru ve hızlı bir şekilde obezitenin tanısının konmasıdır. Obezitenin farklı tanımları olması ve henüz genel kabul görmüş bir değerlendirme standardının olmayışı uluslararası bağlamda karşılaşılan sorunlardandır (97).

Obezite ölçümlerinde en doğru yöntemler vücudun yağ miktarının doğrudan ölçüldüğü yöntemlerdir, ancak maliyetli ve zaman alıcı yöntemler olduğu için bu yöneme paralel sonuçlar veren dolaylı yöntemler kullanılmaktadır.

2.3.3.1. Vücut Kitle İndeksi: Belçikalı istatistikçi Lambert Adolphe Jacques Quetelet tarafından 1835 yılında bulunmuş bir ölçüm yöntemidir. Bu nedenle ilerleyen yıllarda Quetelet indeksi olarak da isimlendirilmiştir (98). Vücut yağ oranını erişkinlerde iyi yansıtan bir indekstir. Kilogram cinsinden ağırlığın, metre cinsinden boyun karesine bölünmesi ile elde edilir. Dünya sağlık örgütünün tanımlamasına göre 19-24,9 arasında VKİ değerine sahip bireyler normal kilolu, 25-29,9 arasındaki VKİ ye sahip bireyler kilolu, 30-34,9 arası 1. derece obez, 35- 39,9 arası bireyler 2. derecede obez 40 ve üzere ise 3. derecede (morbid) obez olarak nitelendirilir.

VKİ ile vücut yağ oranı arasındaki ilişki toplumlara göre farklılık göstermektedir. Farklı etnik gruplarda aynı VKİ değerleri farklı miktarda vücut yağı anlamına gelebilir. Bu nedenle toplumlara özgü VKİ değerleri belirlenmelidir. Bazı sporcularda vücut kas kitlesinin artışına bağlı olarak VKİ hatalı olarak yüksek bulunabilir. Ayrıca vücudunda yaygın ödem bulunan kişilerde de VKİ artmıştır. Aynı VKİ oranına sahip bireyler arasında kadınların yağ oranı erkeklerden, yaşlılarıngi gençlerden ve sarı ırkın yağ oranı beyaz ırktan fazladır (98).

2.3.3.2. Deri kıvrım kalınlığı (skinfolds thickness): Geçmiş yıllarda kliniklerde obezite için sıklıkla kullanılan bir metot olarak yer almıştır. Triseps, biseps, subskapular, suprailiak bölgelerden, kaliper ile ölçülerek cinsiyet ve yaşa göre geliştirilmiş tablolardan değerlendirme yapılır. Çocuklarda ise sadece triseps deri kıvrımı ölçülür. Yetişkinlerde Dumin ve Womersley veya Jackson ve Pollock formülleri ile vücut yağ oranları saptanmaktadır. Günümüzde daha çok araştırma amaçlı kullanılmaktadır (98).

2.3.3.3. Bel/kalça çevresi oranı: Yağ dağılımını ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. Ölçüm yapılırken belin en ince ve kalçanın en kalın kısmı baz alınır. Bel/kalça oranı bireyin android(santral) ve jinoid(periferik) şişmanlık tanısında kullanılır. Karın bölgesinde yağ birikimi olması iç organlarda yağ tutulumu olduğunu gösterir. Bu durum insülin direnci gelişimi ve tip 2 diyabet için risk faktörüdür. Dünya sağlık örgütüne göre bel/ kalça oranı kadınlarda 0,80(bazı otoritelere göre0,85), erkeklerde ise 0,95 in üzerinde olması obezite anlamına gelmektedir (98).

2.3.3.4. Dansitometri yöntemi: Hidrodansitometri yöntemi de denir. Ölçüm prensibi yağ dokunun yoğunluğunun 0,9 kg/L iken yağ dışı dokuların yoğunluğu 1,1kg/L olmasıdır. Bu yüzden kişinin yağ miktarı arttıkça vücut yoğunluğunun azalması beklenir.

1942 yılında Amerikan futbolu oynayan askerlik çağına gelmiş gençlerin kilolarının fazla olması gerekçesiyle askerlikten muaf olmaları sonucunda bahriye doktoru A.R.Behnke, su altında ölçüm yöntemini geliştirmiştir. Ancak maliyetli ve emek gerektiren bir yöntem olması nedeniyle fazla kullanılmamaktadır (98).

2.3.3.5. Biyoelektrik impedans yöntemi: Dokulara verilen düşük voltajlı alternatif akım yardımıyla dokudaki su miktarı oranıyla ters orantılı olarak impedans ölçülür. Doğru şartlarda uygulanırsa hata oranı çok düşüktür (99).

2.3.3.6. Total Vücut Potasyum Ölçümü: Vücudun toplam potasyum durumu radyoaktif yöntemle ölçülmektedir. Yağsız dokunun potasyumu emmemesi nedeniyle kas ve yağ kütlesi oranı hesaplanabilir (100).

2.3.3.7. Ultrasonografi tekniği: Yüksek frekanslı ses dalgalarının vücuda gönderilerek yansıma sonrasında ölçümü prensibine dayanan bir yöntemdir. Sesin absorpsiyon frekansı dokunun absorpsiyon katsayısı ve doku kalınlığı ile doğru orantılı sonuç verir (100).

2.3.3.8. Persentil ve z skoru: Çocuk ve adölesanlarda, yetişkinlerde olduğu gibi belirli bir kriter yoktur. Bunun yerine en sık kullanılan yöntem toplumsal düzeyde yüzdelik (persentil) ve/veya z skoru değeridir. Dünya sağlık örgütü tarafından 2006 yılında 0-5 yaş arası çocuklar için büyüme standartları, 2007 yılında ise 5-19 yaş arası adölesanlar için büyüme referans değerleri yayınlanmıştır. Böylece çocuklarda

yaşı ve cinsiyete göre VKİ değerleri fazla kiloluluk ve obezite için kullanılmaya başlamıştır.

2.3.4. Obezitenin sınıflandırılması:

Yağ Dokusunun Dağılımına göre:

a. Android tip obezite (abdominal) : Yağ dokusu vücudun karın ve göğüs bölgesinde birikmiştir.

b. Gynoid tip obezite (gluteal): Yağ dokusu vücudun kalça ve uyluk bölümlerinde toplanmıştır.

2.3.4.2. Anatmik yapıya göre:

a. Hipselüler obezite: Yağ hücresi sayısında artışın olması ile karakterizedir. Çocukluk çağı obeziteyi genellikle bu gruptadır.

b. Hipertrofik Obezite: Yağ hücrelerinin büyüklüğü ve lipit içeriğindeki artış ile karakterizedir. Genellikle gebelikte ve erişkin dönemde başlayan obezite bu tiptedir.

2.3.4.3. Etiyolojiye göre:

a. Basit obezite: Obez bireylerin büyük bir çoğunluğunda altta yatan tıbbi bir problem yoktur. Bu obezite çeşidine eksojen obezite de denir.

b. Metabolik ve hormonal bozukluklara bağlı sekonder obezite: Cushing sendromu, hipotalamik obezite, hipotiroidizm, büyüme hormonu eksikliği, ilaçlar vb.

c. Genetik sendromlarla birlikte görülen obezite: Turner sendromu, Bardet-Biedl sendromu, genetik kökenli insülin rezistansı v.b.

2.4. Ergenlik Dönemi:

M.Ö dördüncü yüzyılda Platon, insanoğlunun gelişim evrelerini tanımlarken ergenlik döneminden söz etmiştir. Aristo ergenlik sürecinin insanoğlunun seçim yapmaya başladığı bir dönem olduğundan bahsetmiştir. Hall 1904 yılında ergenlik konusunda iki ciltlik "Adolescence" kitabını yayınlamıştır. Hall ergenliği stresli ve fırtınalı bir dönem olarak nitelendirmiştir (114).

Biyolojik gelişim ile başlayan ergenlik bedensel, zihinsel, ruhsal ve sosyal gelişim ile devam eder. Ergenlik süreci hormonal etki ile başlamaktadır. İlk belirtiler genellikle kızlarda 10, erkeklerde 12 yaşında gözlemlenmektedir.

Ergenliğin üç aşamasının olduğu kabul edilmektedir. Ön ergenlik; 11-14 yaş arasında, hızlı değişimlerin görüldüğü dönemdir. Bu dönemde kişi cinsel olarak gelişmeye başlar, en hızlı gelişimin görüldüğü ve çocukluğun sonu ergenliğin başı arasındaki dönem, erinlik dönemi olarak da adlandırılır. Boy ve kiloda ani artış, erkeklerde sakal gelişimi, kızlarda göğüs gelişimi, her iki cinsiyette pubis bölgesi ve koltuk altı tüylenmeleri bu dönemde görülür. Orta ergenlik; yaklaşık 15-17 yaş arasında ergenlik dönemine ait gelişimlerin neredeyse tamamlandığı dönemdir. Son ergenlik ise gencin yetişkinlik görünümüne ulaştığı 18-21 yaş arasını kapsayan dönemdir.

Fiziksel gelişimin yanı sıra ergenlikte zihinsel yetenekler ve ilgi konuları da değişir, benmerkezcilik ve karşı koyma, uyma davranışları gözlenebilir. Sosyal yaşamda da ergenlerde pek çok değişiklik görülür. Arkadaş çevreleri ailelerinden daha önemli konuma gelmiştir. Bu dönemde ergenler kendi ilgi alanlarına yakın bireyleri arkadaş olarak seçme eğilimindedirler.

2.5. Ergenlik ve Obezite

Çocukluk ve ergenlik çağı obezitesi birçok ülkede endişe verici boyutlara ulaşmıştır. Birleşmiş Milletler tarafından 2015 yılında belirlenen sürdürülebilir kalkınma hedeflerinde, bulaşıcı olmayan hastalıkların kontrolü ve önlenmesine öncelik verilmiştir. Bulaşıcı olmayan hastalıklardan obezite, özellikle azalan ömür beklentisi ve yaşam kalitesi ile öncelikle mücadele edilmesi gereken hastalıklar arasındadır.

Çocukluk ve ergenlik obezitesi ile karşılaşan bireylerin hayatlarının sonraki dönemlerine obez olarak devam etme ihtimalleri çok yüksektir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2014 yılında çocukluk ve ergenlik obezitesi ile mücadele komisyonu kurulmuştur. Komisyon Dünya çapında obezite ile mücadeleye değişik şartlar altında değişik öneriler getirmiştir. Gıda tipindeki değişimler, gıdaların kullanılabilirlik, ulaşılabilirlik ve pazarlamasındaki değişiklikler ile birlikte ekran başında geçirilen

zamanın klasik oyun yerine geçmesi ve hareket azlığı bu yaş grubunda obeziteyi artıran bir nedendir. Bir başka neden ise ergenlik döneminde kendi kararını kendi veren bireylerin ebeveynlerinin tavsiyelerinin aksine hazır gıdaları seçme eğiliminde olmalarıdır.

Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2014 yılında oluşturulan çocukluk ve ergenlik obezitesini engelleme komitesi hükümetlere bir dizi önerilerde bulunmuştur. Bunlar başlıca yedi başlıkta toplanmıştır:

- 1- Sağlıklı gıdaların daha fazla alınması, şekerli gıdaların ve içeceklerin daha az alınması.
- 2- Beden sağlığını artırmak için çocuk ve ergenlerde sedanter davranışın engellenmesi.
- 3- Çocukluk ve ergenlik çağı obezitesi için doğru yönergelerin hazırlanması.
- 4- Uyku, bedensel etkinlik ve doğru diyet bilgilerinin çocuklar tarafından benimsenmesini sağlamak.
- 5- Okulların sağlık şartlarının belirlenmesi, çevre, sağlık, beslenme ve fiziksel aktivitelere okulda çocukların ulaşabilirliğinin artırılması.
- 6- Aile bazlı sağlıklı yaşam stili danışmanlığının oluşturulması.

Obezite salgını dünya çapında pek çok olumsuzluğa neden olmuştur, yıllar boyunca hijyen, halk sağlığı ve tıp alanındaki ilerlemeler yaşam süresinin uzamasını sağladı. Obezite tüm bu gelişmelerin getirdiği kazanımları tehdit eder boyutlara ulaştı. Birçok kültürde kilolu çocukların daha sağlıklı olduğuna dair olan inanç nedeniyle kilolu çocukların ebeveynleri genelde çocuklarını obez olarak algılamazlar. Yüksek gelirli ülkelerde obezite alt sosyoekonomik sınıfın ve göçmen bireylerin çocuklarında görülürken gelişmekte olan ülkelerde genellikle orta ve üst sosyoekonomik sınıfın çocuklarını tehdit etmektedir. Obezite sağlıklı bir çevre ve yetersiz biyolojik ve davranışsal koşulların beraber rol aldığı bir kombinasyon sonucunda oluşur. Çocuk veya ergen tarafından bu olumsuz şartlara verilen tepki ve yanıtlar değişik şiddet ve yoğunlukta olabilir. Küreselleşme ve şehirleşme gıda, gıdaya ulaşım, gıda

kullanılabilirliği ve türünde değişikliklere neden oldu. Oyun türlerindeki ve ulaşımdaki değişiklikler aktivite azalmasına, işlenmiş, besin değeri düşük hazır ve paketli gıdalara eğilimin artmasına neden oldu. Okullarda beden eğitimi ders saatlerinin azaltılması, ekran oyunları ile vakit geçirme ise salgının boyutlarını artırdı.

Kültürel değerler ve normlar sağlıklı vücut ölçüsü algısını oluştururlar. obezitenin çevre şartlarının hakim olduğu bazı toplumlarda obezite sağlıklı bir durum olarak algılanabilir. Bu da obezitenin devam etmesini sağlar.

Obezite bir kuşaktan diğer bir kuşağa geçebilir. Nesiller boyu davranışsal etkiler, sosyal statü, kültürel normlar, davranışlar, yeme ve fiziksel davranışlar ailesel olarak aktarılır. Obez aileler tarafından evlat edinilen çocuklarda obezite oranının fazla olduğu görülmüştür. Bazı aileler çocuklarını sağlıklı yiyeceklere alıştırmak için ödül olarak şekerli yiyecekleri kullanırlar. Başlangıçta işe yarayan bu ödüllendirme sonradan çocuğun şekerli yiyeceği ödül olarak algılamasına ve kalori ihtiyacını şekerli gıdalar ile gidermeyi tercih etmesine neden olur. Yağ ve kas oranının vücut sağlığı açısından önemi büyüktür. Vücut yağının ölçümü her ne kadar popülasyon bazlı çalışmalarda kullanılamasa da yeni yöntemler olan x ışını absorpsiyometresi, MR görüntüleme ve yağ ve kas dokusu empedans ölçümleri ile yapılabilir.

Çocukluk ve ergenlik çağında obezite, daha az sosyalleşme ve eğitim hayatından yeterli verimi alamama, depresyon gibi sorunları beraberinde getirir. Birey hayatının daha sonraki dönemlerinde de obeziteden kurtulmuş bile olsa bu durumdan etkilenir.

Çocukluk obezitesinin önemi, yetişkin obezitesinin öncülü olmasından kaynaklanmaktadır. Çocukluk çağı obezitesinin maliyetini inceleyen çalışmalarda görülmüştür ki, maliyet tahmin edilenin çok üzerindedir. Bu boyutu ile incelendiğinde büyük bir halk sağlığı problemi halini almıştır.

Ülkemizde de Sağlık Bakanlığı "Türkiye Obezite ile Mücadele ve Kontrol Programı" nı hayata geçirmiş ve obezite ile mücadele politikalarında sağlık, tarım, spor, ulaşım, eğitim, maliye, belediyeler gibi kamu kurumlarının koordineli bir çalışma

yapmasını sağlamıştır. Bu çalışmanın ana amacı çocuk ve ergenlerde obezitenin azaltılmasıdır.



2.6. OBEZİTENİN NEDEN OLDUĞU SAĞLIK SORUNLARI

Obezite çok yönlü bir hastalıktır. Bu nedenle multidisipliner yaklaşım gerektirir. Morbidite ve mortalite oluşumunda risk faktörüdür. Santral yağlanmada artış mortalitenin başlıca nedenlerindendir. Obezitenin yol açtığı birçok sağlık sorunu bireyin yaşam kalitesini düşürür. Bunlardan başlıcaları şunlardır:

2.6.1. Tip 2 Diabetes Mellitus: Tip 2 diyabet için obezite önemli bir risk faktörüdür. Obezitede vücut yağ oranı artar. Vücutta artan yağ dokusu insülin hormonunun vücutta dağılımına engel olarak diğer dokuların insüline tepkisini azaltır. İnsülin direnci gelişimi beraberinde obezite, kardiyovasküler hastalıklar ve kansere yatkınlığı da getirir, bu açıdan bakıldığında önemli bir sağlık problemidir. Geçmişte çocuklarda daha az görülen tip 2 diabetes mellitus vakalarına çocukluk çağı obezitesindeki artışa bağlı olarak 4-10 kat daha fazla rastlanılmaya başlamıştır (110).

2.6.2. Kardiyovasküler Hastalıklar: Koroner kalp hastalığı, tromboz, hipertansiyon, serebrovasküler hastalık, varikoz venler obezitenin kardiyovasküler sistemde risk faktörü olduğu hastalıklardandır (108).

Hipertansiyon, obezlerde sağlıklı bireylere göre daha fazla karşılaşılan bir problemdir. Vücut yağ dağılımı ile hipertansiyon arasındaki ilişki çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Vücut yağ oranında %10'luk artış sistolik basınçta ortalama 6mm/hg, diastolik basınçta ortalama 4 mm/hg artışa neden olmaktadır. Artmış bel/kalça oranı, insülin direnci, hipertrigliseridemi, lipid oksidasyonu, hiperkoagulabite ve hipofibrinoliz gibi obezite ile ilgili yeni risk faktörleri tanımlanmıştır (109). Erişkinlere benzer biçimde obezite oranı arttıkça çocuk ve adölesanlarda HDL kolesterol düşmekte LDL kolesterol ve serum trigliserit düzeyleri artmaktadır. Obez adölesanların 50 yıl izlendikten sonra normal kiloya ulaşmış olsalar dahi normal kilolu adölesanlık dönemi geçirmiş bireylere kıyasla daha yüksek morbidite ve mortalite oranına sahip oldukları gösterilmiştir (111). Bu durum adölesan obezitesinin ciddi kardiyovasküler risk taşıdığını göstermektedir.

2.6.3. Solunum Sistemi Hastalıkları: Göğüs duvarı ve karında aşırı yağ birikimi solunum faaliyetlerini kısıtlayabilir. Pediyatrik yaş grubunda obez bireyleri en çok etkileyen solunum sistemi hastalığı ise uyku apnesidir. Uyku apnesi kabaca bir

gecede birçok defa gelişen solunum yolu tıkanması olarak tanımlanır. Apne süresi bazen 1-2 dakika sürebilir. Apne sırasında boğulma hissi yaşanabilir. Obez bireylerde çoğu kez akciğerlerde bir rahatsızlık olmamasına rağmen kandaki oksijen miktarı uyku sırasında düşmektedir (111).

2.6.4. Kemik, Eklem, Bağ dokusu ve Deri Komplikasyonları: Obez bireylerde eklemlerdeki travmalara bağlı olarak osteoartrit gelişir. Obezitede artmış abdominal basınç, plevral ve kardiyak basınç artışına neden olur. Bu durum serebral venlerde, karşı dirence bağlı pseudotümör cerebri'ye neden olur (108). Ayrıca obezite çocuklarda düztabanlık gelişimini de artırmaktadır. Femoral epifiz bezi kayması ve blount hastalığı da obezite ile ilişkili olduğu bilinen hastalıklardandır (112). Deride ise akontozis nigrikans ve intertrigo obezite ile ilişkili hastalıklardır (112). Obez bireylerin cildinde strialara sık rastlanır. Bunlar derinin lobuler yağ doku altında ezilmesiyle oluşur. Mantar enfeksiyonları, selülit, lenfödem gelişme riski de normal bireylere göre daha sık görülür.

2.6.5. Gastrointestinal Sistem Hastalıkları: Safrada taş oluşumu obez bireylerde sıkça görülen komplikasyonlardandır. Obezite ile birlikte kolesterolün biliyer atımı safra taşı oluşumuna neden olmaktadır. Safra taşı olan çocukların %8-33 ünde obezite saptanmıştır.

Nonalkolik steatohepatosis de obez bireylerde sıkça görülür. Obezite ile birlikte serum trigliserit değerlerinin artması karaciğerde yağlanmaya neden olmaktadır (108).

2.6.6. Kanser ve Obezite ilişkisi : Obez bireylerde bazı kanser türlerine daha sık rastlanılır. İnsülin direncindeki yükselme kansere yatkınlığı artırmaktadır. Erkeklerde kolon ve prostat, kadınlarda safra kesesi, endometriyum, yumurtalık ve meme kanserleri, her iki cinsiyette de multipl miyelom, karaciğer ve lenfoma kanserleri obez bireylerde normal kilolu bireylere göre daha çok görülür.

2.6.7. Psikososyal Bozukluklar ve Obezite: Obez ergenlerde psikososyal sorunlara sıklıkla rastlanmaktadır. Psikolojik sorunlar obezitenin nedeni olduğu gibi sonucu da olabilmektedir. Crisp ve Guinness 1976 yılında yayınladıkları makalede "jolly fat" kavramından bahsetmiş ve ankisiyetenin orta yaşlı şişman bireylerde daha

az görüldüğünü kanıtlamışlardır (116). Daha sonraki yıllarda yapılan birçok çalışmada ise obez bireylerde psikosyal problemlerin normal popülasyona göre daha sık görüldüğü belirtilmiştir (114,115,117). Pamukkale üniversitesinde obezite tedavisi gören kadınlarla yapılan bir çalışmada normal kilolu kadınlara göre obez kadınlarda daha fazla psikiyatrik bozukluk ve depresyona rastlanmıştır (114).

Obezite ile majör depresyon, çocukluk travmaları ve istismarları gibi ortak çevresel faktörleri paylaşmaktadır. Yapılan bir çalışmada zorlayıcı aile yapısına sahip ve çocukluk travması geçirmiş ergen kızların normal gruba göre obezite riskinin yüksek olduğu saptanmıştır (119). Obez ergenlerde intihar girişimi ve düşüncesi, majör depresyon oranı normal kilolu bireylere göre daha fazla görülür (120). Dikkat dağınıklığı ve hiperaktivite bozukluğu açısından değerlendirilen obez ergenler normal kilolu ergenlere göre daha fazla dikkat dağınıklığı oranına sahiptir (121). Bipolar bozukluk, panik bozukluk ya da agorafobi prevalansı artar, özellikle posttravmatik stres bozukluğu, sigara bağımlılığı, aleksitimi, distoni, yeme bozuklukları, öfke nöbetleri, dışlanma ve değersizlik duygusu, özbenlik saygısında azalma, buna bağlı olarak sosyal ilişkilerde bozulma görülür. Şizofreni hastalarında da obeziteye sık rastlanılır. Sosyal izolasyon, paranoya, apati ve gibi semptomlar şizofreni hastalarının düzenli beslenmemelerine ve hareketsiz yaşam sürmelerine sebep olabilir (118).

Psikoanalitik yaklaşıma göre obez kişilerde seksüel gelişimin oral döneme saplandığı vurgulanmaktadır. Bu döneme saplantı aşırı bir iyimserlik ya da karamsarlık, oburluk, hırs, bağımlılık ve sabırsızlık ile karakterize tipik bir kişilik yapısı oluşturmaktadır. Psikoanalitik teorilerde aşırı yemenin güçlü kompulsif, motive edici özellikler taşıdığı kabul edilmekte ve aşırı yeme, depresyon ve anksiyete ile kötü uyumlu baş etme tepkisi olarak görülmektedir (118). Obezitenin tedavisinden sonra, yoğun stres altında kalan hastaların eski kilolarına ulaştıkları görülmüştür (115).

2.6.8. Mineral eksiklikleri ve obezite

2.6.8.1. Magnezyum eksikliği ve obezite

Magnezyum eksikliği hiperlipidemi, diyabet, hipertansiyon, kronik kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili bulunmuştur. Diyet ile eksik magnezyum alımının idrarda tromboksan konsantrasyonunu artırarak anjiyotensinin indüklediği

aldosteron sentezi uyarak lipid birikimi ve dolayısıyla obeziteye neden olabileceğini öne sürülmüştür (138).

2.6.8.2. Selenyum eksikliği ve obezite

Amerika’da Bariatrik cerrahi hastaları ile yapılan bir çalışmada cerrahi öncesinde hastalardan analiz için kan örneği alınmış obezlerde kontrollere göre %28 daha fazla selenyum eksikliği bulunmuştur. Cerrahi girişimden bir yıl sonra aynı hastalar tekrar analiz için çağırılmış ve kilo kaybından sonra selenyum düzeyi düşük bireyler ile kontrol grubu arasındaki fark % dörde düşmüştür (139). Menapoz öncesi VKİ yüksek kadınlarda, normal kilolu kadınlara göre daha fazla selenyum eksikliği olduğu gösterilmiştir. Selenyum eksikliğinin kardiyovasküler hastalıklar ve hiperhomosisteinemi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (140).

2.6.8.3. Demir eksikliği ve obezite

Demir eksikliği en sık rastlanılan mineral eksikliklerindendir. 321 adölesan ile yapılan bir çalışmada obez grupta %38.8, aşırı kilolu grupta % 12.1 olan demir eksikliği prevalansı normal kilolu adölesanlarda %4.4 olarak saptanmıştır ayrıca VKİ ile serum demir düzeyleri arasında ters yönlü ve anlamlı korelasyon saptanmıştır (141). 2-16 yaş arası çocuklarla yapılmış bir kesitsel çalışmada obez ve aşırı kilolu çocukların normal kilolu çocuklara göre iki kat daha fazla demir eksikliği görülme riski taşıdıkları gösterilmiştir (142).

2.6.8.4. Krom eksikliği ve obezite

Krom, memelilerde glukoz, karbohidrat, insülin, lipidler ve proteinlerin metabolizmasına rol alan esansiyel bir besin maddesidir. Glukozun alımında insülinin kofaktörüdür ve krom eksikliğinde insülin etkinliği azalacağı için hücreye glukoz alımı azalacağından glukoz toleransı bozulur. Diyetle alınan kromun eksikliğinin diyabet ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisinin gösterildiği çalışmalar mevcuttur (143).

2.6.8.5. Çinko eksikliği ve obezite

Obez bireylerde serum çinko düzeylerinin düşük olduğu gösterilmiştir. Bunun nedeni çinkonun insülinin aktive edilmesinde insülin reseptör tirozin kinaz aktivasyonunda görev almasıdır. 137 Adölesanla yapılan bir çalışmada, normal kilolu

gruba göre kan örnekleri dikkate alındığında %22 oranında, saç teli örnekleri dikkate alındığında %34 oranında daha düşük çinko düzeylerine rastlanmıştır. VKİ ile çinko arasında zıt yönlü ve anlamlı bir korelasyon saptanmıştır (144).

Bunlara ek olarak obez bireylerle yapılan bazı çalışmalarda birden fazla mineral ve vitamin eksikliğinin görüldüğü çalışmalar da mevcuttur. 2016 yılında Sanchez ve ark. tarafından 103 obez kadın üzerinde yapılan çalışmada katılımcıların %13 ünde demir, %10 unda B12 vitamini eksikliği görülmüştür (134). İspanyada bariatrik cerrahi öncesinde 115 obez birey ile yapılan çalışmada obez bireylerin %9.5 inde B12 vitamini eksikliği, %25 inde folik asit eksikliği, %64ünde bakır, %74 ünde çinko eksikliği bulunmuştur (135). Bariatrik cerrahi öncesinde alınan örneklerle yapılan bir çalışmada hastaların %35 inde magnezyum, %19 unda demir, %17sinde A vitamini eksikliği görülmüştür (136). 2008 yılında Amerika'da 110 morbid obez ile yapılan bir çalışmada A, B1, B6 folik asit, C ve D vitamini düzeyleri normal kilolu bireylere göre daha düşük olarak tespit edilmiştir (137).

2.6.9. Vitamin eksiklikleri ve obezite

2.6.9.1. Tiamin (B1 vitamini) eksikliği ve obezite

Birçok biyokimyasal reaksiyonda koenzim olarak görev alan B1 vitamini eksikliğinde ciddi metabolik bozukluklar ortaya çıkar. Morbid obezler diyetlerinde karbohidratlı besinlere daha çok yer verirler ve bu besinlerde tiamin bulunmadığı için eksiklik görülebilir. 303 morbid obezli birey ile yapılan bir çalışmada 47 hastada (%15.5) tiamin eksikliği görülmüştür(145).

2.6.9.2. Folat eksikliği (B9 vitamini) ve obezite

Suda çözünen bir vitamin olan folatın eksik alımı ile kardiovasküler hastalıklar, kolon ve meme kanseri, anemi, nöral tüp defektleri ile ilişkili bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada bariatrik cerrahi öncesi ve sonrasında serum folat düzeyleri karşılaştırılmış, cerrahi öncesi folat eksikliğinin %6 daha fazla olduğu tespit edilmiştir (146).

2.6.9.3. D vitamini eksikliği ve obezite

Yapılan bir çalışmada VKİ ile D vitamini düzeyleri arasında negatif bir korelasyonun olduğu gösterilmiş ve obezitenin D vitamini eksikliği için risk faktörü olduğu ortaya konulmuştur. Bazı araştırmacılar obez bireylerin daha az dışarı çıktıklarını ve dolayısıyla güneş ışığından daha az faydalandıklarını bu nedenle D vitamini düzeylerinin düşük olduğunu ileri sürmüşlerdir (147).

2.6.9.4. A ve E vitamini ile obezite

Obez çocuklarda yapılan bir çalışmada çocukların % 50 sinde A vitamini, % 25 inde ise E vitamini eksikliğinin görüldüğü bildirilmiştir. Bir başka çalışmada 12-17 yaş arasındaki obez çocuklarla çalışılmış Afro Amerikanlarda beyaz ırka göre daha düşük A ve E vitamini düzeyleri tespit edilmiş, bu durumun ırksal bir özellik olmadığı ve diyet ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (148). A ve E vitaminleri aterosklerozun ilk basmağı olan LDL oksidasyonunu engellediği için kardiyovasküler hastalıklar gelişebilir. A ve E vitamini eksiklikleri morbid obeziteye eşlik eden oksidatif stres, insülin direnci, bozulmuş glukoz metabolizması gibi hastalıkların riskini artırır (127).

2.6.9.5. C vitamini ve obezite

Askorbik asit olarak da adlandırılan C vitamini endojen kolesterol sentezinde görevlidir. 19-65 yaş arası erkek ve 19 yaş üstü kadınlarda yapılan bir çalışmada artmış VKİ ile serum askorbik asit düzeyleri arasında ilişki gösterilmiştir (126).

2.6.9.6. B12 vitamini ve obezite

Literatürde erişkinlerde obezite-B12 eksikliği ilişkisini inceleyen çalışmalarda çelişkili sonuçlar ortaya konmakla birlikte, ağırlıklı olarak obezitenin B12 eksikliğine yol açtığı bildirilmiştir. 2017 yılında 278 yetişkin morbid obez ile çalışılmış, hastalarda B12 vitamini ve MMA arasında korelasyon saptanmış, metabolik sendrom belirtileri arttıkça MMA anlamlı olarak yükselirken, Hcy ve B12 vitamininde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (84). Dikkat çeken bir olgu sunumunda, bariatrik cerrahi sonrasında normalde B12 emilimi eksikliğinde görülen nörolojik bozuklukların görüldüğü bir olguda hastaya vitamin B12 takviyesi yapıldıktan sonra ölçümler yapılmış, vitamin B12 ve homosistein değerlerinin normal düzeyde olduğu ancak MMA düzeyinin azaldığı anlaşılmıştır. Cerrahi sonrası gelişen B12 eksikliğinden kaynaklanan nörolojik hasarın erken tanısı için MMA açısından

hastaların değerlendirilmesi gerektiği düşünülmüştür (63). 2017 yılında yapılan bir çalışmada 74 bariatrik cerrahi hastası çalışmaya alınmış ve %16 oranında B12 eksikliği tespit edilmiştir (124). Bu çalışmaların aksine erişkinlerde obez grup ile normal kilolu grup arasında B12 vitamini açısından fark olmayan araştırmalar da mevcuttur. 2008 yılında Norveç'te yapılan bir çalışmaya 100 morbid obez ve 58 normal kilolu erişkin dahil edilmiş ve gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir (137). Amerika'da 2008 yılında yapılan bir çalışmada Mahabir ve arkadaşları 14 obez, 17 fazla kilolu ve 20 normal kilolu birey ile çalışmış, gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir (9). 2002 yılında Restman ve arkadaşları İsrail'de 25 obez ve aynı yaşlardaki 25 kontrol ile çalışmış B12 vitamini açısından gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir (51).

Konuya obez adölesanlar açısından bakıldığında ise, bu kişiler karbohidrat ve yağ bakımından zengin gıdalardan oluşmuş kötü beslenme alışkanlıklarından dolayı esansiyel mikronütrientleri alamazlar. Genelde hayvansal gıdalarda bulunan B12 vitamini de obez adölesanların diyetle az aldıkları mikronütrientlerdendir. Literatürde obez adölesanlarda B 12 eksikliğini inceleyen çalışmalar son derece sınırlıdır ve sonuçlar erişkinlerde olduğu gibi çelişkilidir. Ağırlıklı olarak B12 vitamini eksikliğunun serum B12 düzeyleri ile değerlendirildiği bu çalışmalarda B12 eksikliği görülme olasılığı %7.8 ile %51.2 arasında değişmekle birlikte, normal kilolu adölesanlarda eksiklik oranları %2.9 ile % 28 oranında değişmektedir. Literatürde obez ve normal kilolu adölesanlar arasında B12 vitamini eksikliği açısından anlamlı farkın bulunmadığı aksi yönde çalışmalar da mevcuttur. Yapılan tüm bu çalışmalarda B12 eksikliği sıklıkla sadece serum B12 düzeyleri ile belirlenmiş olup, hücre içi B12 eksikliğunun güvenilir "fonksiyonel biyobelirteçleri" olan homosistein, MMA ve B12 vitamin düzeylerinin obez adölesanlarda birlikte incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu bilgiler ışığında gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada, obez adölesanlarda göz ardı edilebilen bir durum olan B12 vitamini eksikliğunun ortaya konmasında, vücuttaki B12 vitamini durumunu tam olarak yansıtmayan serum B12 vitamini ölçümü yanı sıra "fonksiyonel biyobelirteçleri" olan MMA ve Hcy ölçümünün önemi obez ve normal kilolu adölesanlarda karşılaştırmalı olarak ortaya konmuştur. Gerçekleştirdiğimiz araştırma bu konuda bir ilktir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın tipi

Yapılan araştırma kesitsel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma Mart 2013 tarihinde literatür tarama ile başlamış, Nisan 2019'da tez savunması ile sona ermiştir. Çalışma Mayıs 2013- Nisan 2019 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Tıp Anabilim Dalı ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/ Çalışma grupları

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Gastroenteroloji Polikliniği'ne başvuran, böbrek fonksiyonları normal olan, herhangi bir kronik rahatsızlıktan dolayı sürekli ilaç kullanmayan yaşları 12-18 arasında olan 58 obez adölesan dahil edildi.

Dışlanma kriterleri:

- Böbrek fonksiyonları normal olmayan adölesanlar, yüksek serum üre değerlerine sahip olanlar,
- Kronik bir rahatsızlığı olduğu için sürekli ilaç kullanan hastalar,
- Multivitamin desteği alanlar.

Kontrol grubu olarak Dokuz Eylül Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'na tarama testi (hepatit, tiroid hastalıkları) yaptırmak için başvuran normal kilolu olan ve aynı yaş grubunda bulunan 30 adölesan çalışmaya dahil edildi.

3.4. Çalışma Materyali

Etik kurul onayını (Ek 1) takiben hasta ve kontrol grubundaki katılımcıların kendileri ve aileleri çalışma hakkında bilgilendirildi ve çalışmaya katılmayı kabul ettiklerine dair onam formu imzalatıldı (Ek 2 ve EK 3).

Araştırmada kullanılan materyal, hasta ve kontrol gruplarına ait bireylerden alınan kan örnekleridir. Dokuz Eylül Üniversitesi Pedyatrik Gastroenteroloji

Polikliniği'ne gelen bireylerden Dokuz Eylül Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda çalışılmak üzere serum üre, kreatinin, glukoz, AST, ALT, GGT, total bilirubin, direk bilirubin düzeyleri için ve T3, T4, TSH ve B12 vitamini, ferritin, folik asit analizleri için 5'er cc'lik 2 tüpe düz kan alındı. 20-25 dakika oda ısısında bekletilerek pıhtılaştıktan sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi (Hettich, Rotina38, Almanya). Ayrıca hemogram ve homosistein düzeyi ölçümleri için 2'er cc EDTA'lı tüplere kan alındı. Homosistein düzeyi ölçümü için alınan EDTA'lı kan örneği soğuk zincir kurallarına uygun olarak taşındı, +4°C'de 3000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi (Hettich, Rotina35 R, Almanya). Plazma MMA ölçümleri için EDTA'lı tüpe 2 cc kan alındı, soğuk zincir kurallarına uygun olarak Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda +4 °C'de 2000 g'de 10 dk. santrifüj edildi. Analizlere kadar -80°C'de saklandı.

Çalışma için hazırlanan veri kayıt formlarına hasta ve kontrollerin isimleri, kilo, boy, doğum tarihi, kan alım tarihi, vitamin takviyesi alıp almadıkları kaydedildi. Boya göre ağırlık % persentil olarak hesaplanıp kaydedildi.

3.5. Araştırmanın değişkenleri

Bağımlı değişken: B12 vitamini eksikliği

Bağımsız değişken: Obezite

Kontrol değişkeni: Yaş ve cinsiyet olarak obez grup ile benzer olan ancak normal kilolu olan adölesanlar.

3.6. Kullanılan Kimyasallar, malzemeler ve cihazlar

Tablo 4 Çalışmada kullanılan kimyasallar ve malzemeler

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

Tablo 5 Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Markası	Kodu/ Modeli
Yüksek performans sıvı kromatografisi	Shimadzu	LC-20A Prominence
Tandem kütle spektrometresi	AB Sciex	4000QTRAP
Distile su cihazı	Milipore	Elix 5
Vakum filtrasyon sistemi	Sartorius	
Ultrasonik banyo	Elma	Transsonic T660/H
Vorteks	Heidolph	Reax Top
Manyetik karıştırıcı	Ikamag	RH
Soğutmalı santrifüj	Heraeus	Biofuge Stratos
Hassas terazi	Sartorius Extend	ED224S
Şırınga	Hamilton	1001
Şırınga pompası	Harvard Apparatus	70-2208
-80 °C derin dondurucu	Thermo Scientific Forma	705
+4 °C buzdolabı	Beko	BK7751 T

3.6.1. Rutin Biyokimya Analizleri

Serum B12 vitamini, insülin, ferritin, folik asit, serbest T3, serbest T4 ve TSH ölçümleri Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda kemilüminesans yöntemi ile (Beckman DXI 800, ABD), kan sayımı hemogram cihazı ile (Beckman coulter LH780, ABD), homosistein düzeyi ölçümü immunoassay yöntem ile (Siemens Immulite 2000XPI, ABD), açlık kan şekeri, AST, ALT, GGT, üre, kreatinin, total ve direkt bilürubin, trigliserit, total kolesterol, HDL ölçümleri fotometrik yöntemi esas alan otoanalizör ile (Olympus AU2700, Japonya) yapıldı.

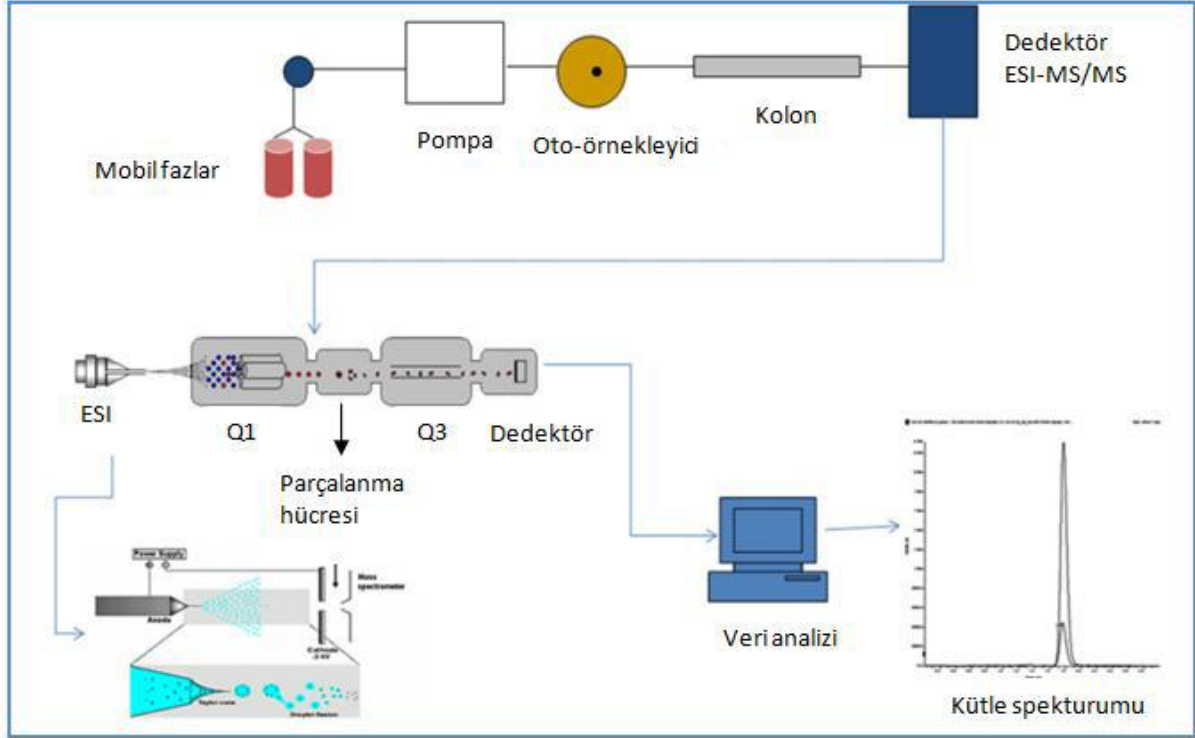
3.6.2. Metilmalonik asit (MMA) Analizi

Plazma MMA düzeyleri, yüksek performans sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresinde (LC-MS/MS), stabil izotop dilüsyon multiple reaction monitoring (SID-MRM) modunda, türevlendirme gerektirmeyen örnek hazırlığı ve kısa analiz süresi olan bir yöntemle belirlendi (35,83).

Sıvı kromatografi tandem kütle spektrometri, sıvı kromatografik bir ayırım ardından moleküllerin m/z (kütle/yük) oranlarına göre ölçümlerinin yapıldığı yüksek özgüllük, duyarlılık ve doğruluğa sahip bir yöntemdir. LC-/MSMS sisteminde ilk aşama bileşiğin kromatografik olarak ayrımlandığı sıvı kromatografi (LC) kısmında gerçekleşir. LC, kompleks biyolojik karışımların sabit faz ile hareketli faz arasındaki farklı etkileşimlerine göre ayrımlanması sağlar. Biyolojik karışımdaki bileşikler kolon içinde farklı hızlarda hareket ederek ayrılır. Alıkonma zamanı (retention time [RT]), bileşiklerin kolona ilk girişlerinden kütle spektrometresine ulaştığı zamana kadar geçen süredir ve her bileşik için karakteristiktir.

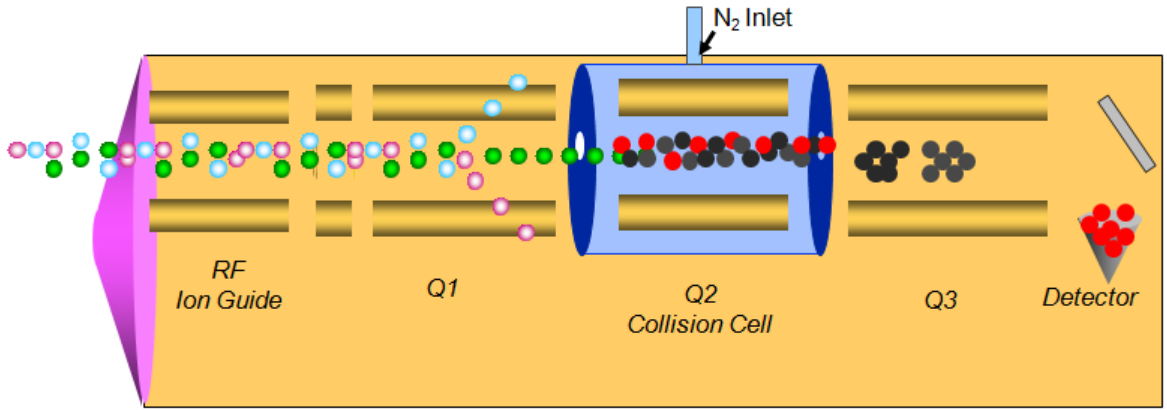
Kütle spektrometresinin (MS) prensibi, iyonize edilen analitlerin elektromanyetik bir alan içerisinde sıvı fazdan gaz fazına geçirilerek analitlere özgü m/z (kütle/yük) oranlarına göre ayrıştırılması esasına dayanır. En sık kullanılan MS iyonizasyon tekniklerinden biri olan ESI (elektrosprey iyonizasyon) ile sıvı örneğin bir iğne ucundan püskürtülerek kararsız yüklü damlacıklar haline gelmesi sağlanır. İyonizasyon kaynağından yüklü halde geçen damlacıklar belirlenen m/z oranlarına göre ayrımLANACAĞI kütle analizörü kısmına gelir. Kütle analizöründeki elektriksel alan belirli iyonların geçişine izin verirken belirli iyonlar için m/z filtresi görevi görerek

iyonları tutar. İki kütle analizörünün art arda gelerek oluşturdukları sisteme sıralı kütle analizörü (Tandem MS) adı verilir (83).



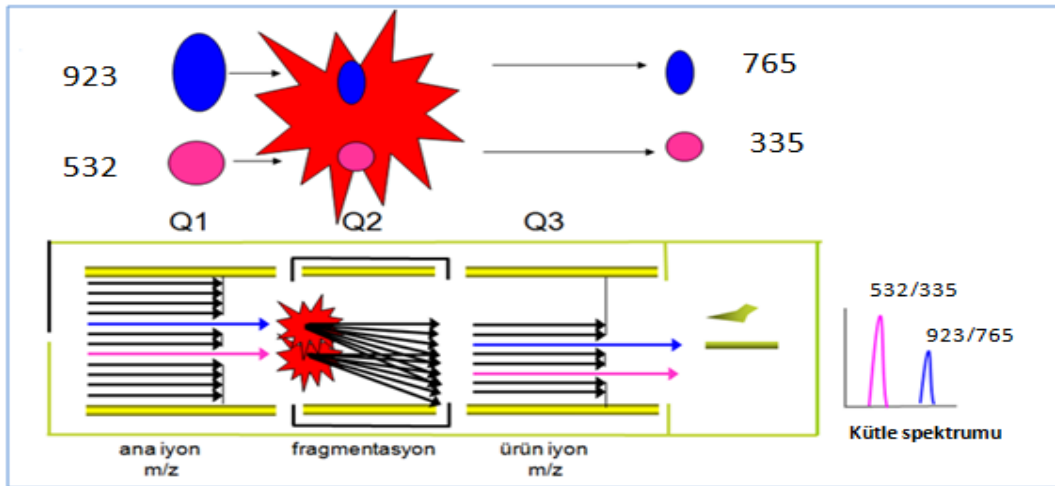
Şekil 6 LC-MS/MS sisteminin şematik gösterimi (57).

Triple quadrupole lineer iyon trap (QQQ/LIT), tandem MS özelliğinde olup analitlerin mutlak kantitasyonuna ve kalitatif karakterizasyonuna olanak sağlayan hibrid bir kütle analizörüdür. Ardışık üç quadropol kütle analizöründe (QQQ) ana iyonların filtrelenmesinin gerçekleştirildiği Q1 olarak adlandırılan ilk kısımda analite ait belirli m/z değerindeki ana iyon seçilir. Q2de parçalanma sonucu oluşan ürün iyonlar Q3e geldiklerinde belirlenen m/z değerlerindeki ürün iyonlar seçilir. Seçilen ana iyon/ürün ikilisi dedektöre ulaştığında, m/z değerine karşı iyonların sinyal yoğunluğu (intensite) kütle spektrumu olarak kaydedilir. Kantitasyon amacıyla kullanıldığında Q3 bölgesi standart quadrupole kütle spektrometresi olarak çalıştırılır; kalitatif çalışmalarda bu bölgenin lineer iyon trap özelliğinden yararlanılarak duyarlılık artırılmış olur. Her iki konfigürasyonun birlikte kullanımı ile ayrı ayrı kullanımına göre daha yüksek duyarlılık ve doğrulukla sonuçlar alınabilir (83).



Şekil 7 Triple quadrupole iyon trap tandem kütle spektrometresi(QTRAP MS/MS)

SID-MRM LC-MS/MS adli toksikolojide ilaç düzeyi araştırmalarında, yeni doğan metabolik hastalıklarının tanı ve taramasında, hormon/ vitamin/ biyolojik aminler, pestisit vb. analizleri gibi pek çok alanda kullanılan hedefli, yüksek doğruluk ve özgüllüğe sahip bir kantitasyon metodudur (58). Analitin LC'deki kromatografik alıkonma zamanı bilgisine ek olarak, MRM-MS/MS de o analite özgü ve daha önceden tanımlanmış birden fazla ana iyon/ ürün iyon ikilisinin izlenmesi ile kantitasyon kesinliği artırılmış olur (Şekil 7).



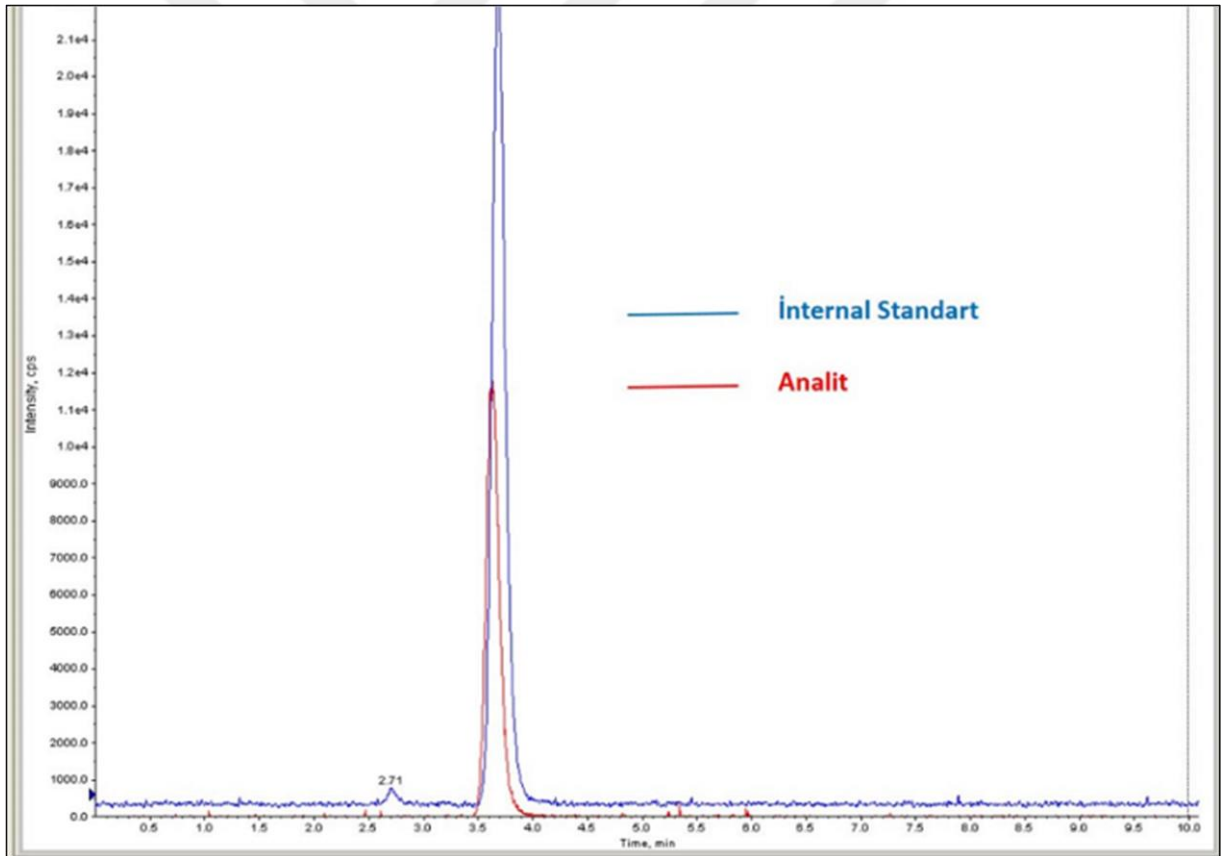
Şekil 8 MRM modunda seçilen ana iyon/ürün iyon ikilisinin izlenmesi.

Bu yöntemde ayrıca kantitasyonun güvenilirliğini artırmak amacıyla çalışmanın başında her bir örneğe belirli konsantrasyondaki stabil izotoplarla işaretlenmiş internal standart (IS) eklenmesiyle MS öncesi (ekstraksiyon, HPLC enjeksiyonu v.b.) ve MS koşullarında (iyonizasyon v.b.) oluşabilecek değişiklikler normalize edilmiş olur. İnternal standartlar ^{13}C , ^{15}N veya ^2H ile işaretlenebilir. Stabil izotop işaretli IS

ların kimyasal özelliği, kromatografik ayrımlanma özellikleri, iyonizasyon etkinliği ve fragment iyon dağılımı hedef analit ile aynıdır, hedef analitten tek farkı ^{12}C yerine ^{13}C 'ün, ^{14}N yerine ^{15}N 'in ve ^1H yerine ^2H atomunun geçmesi nedeniyle daha yüksek moleküler kütleye sahip olmasıdır.

Çalışmamızda SID-MRM LC-MS/MS ölçüm yöntemi ile MMA kantitasyonunu gerçekleştirmek için döteryum ile işaretlenmiş internal standart ($\text{d}_3\text{-MMA}$) kullanıldı. Tüm örneklerle, örnek hazırlık aşamasının en başında belirli konsantrasyonda döteryum ile işaretli IS eklendi. MRM modunda ana iyon/ürün iyon ikilisinin izlenmesi ile elde edilen kütle spektrumundan analiz edilen analitin pik alanının IS pik alanına oranından yararlanılarak kantitasyon yapıldı (**Şekil 9**).

Şekil 9 MRM modunda izlenen analit ve internal standardının iyon kromatogramı.



3.6.3.1. LC-MS/MS Özellikleri ve Çalışma koşulları

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

3.6.3.1.1. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC)

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

a)HPLC özellikleri

HPLC kısımları ve kullanılan kolonlar;

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

b) Kullanılan mobil fazlar ve hazırlanması

Mobil faz A: % 0.233 formik asit içeren distile su

Bidistile su 0.22 µm'lik membran filtre ile vakum yardımıyla filtrelendi. % 0.233 formik asit eklendi. Hazırlanan mobil faz A cam şişeye alınarak degaze edilmek için 15 dakika boyunca ultrasonik banyoda bekletildi.

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

c) HPLC çalışma koşulları

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

Tablo 6 HPLC çalışma koşulları

Mobil Faz A akış hızı	0.475 mL/dk. (%95)
Mobil faz B akış hızı	0.025 mL/dk. (%5)
Akış hızı	0.5mL/dk.
Pompa modu	İzokratik elüsyon
Minimum Basınç	0 bar
Maksimum Basınç	400 bar
Kolon Basıncı	61 bar
Enjeksiyon Hacmi	10 µL
Dengeleme zamanı	3 dk.
Toplam analiz süresi	10.1 dk.
MMA alıkonma zamanı	3.68 dk
d₃-MMA alıkonma zamanı	3.63 dk

d) HPLC sisteminin analiz için hazırlanması

Mobil fazdaki hava kabarcıklarının kolona gitmesini önlemek amacıyla her çalışmadan önce "purge" işlemi yapıldı. Daha sonra analitik kolon, metotta kullanılan kromatografik akış koşulunda 14 dk. boyunca (20 kolon hacmi) yıkandıktan sonra analiz için hazır hale getirildi.

3.6.3.1.2. Tandem kütle spektrometresi (MS/MS)

A)MS/MS ÖZELLİKLERİ

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

B) MS/MS çalışma koşullarının optimizasyonu

Çalışmaya başlamadan önce ilk olarak LC-MS/MS de MMA ve d₃-MMA için bileşik bağımlı parametrelerinin optimizasyon çalışmaları üç tekrarlı olarak yapıldı.

Optimizasyon için MMA standartı ve d₃-MMA standartının hazırlanan 100 ppb konsantrasyondaki infüzyon çözeltileri kullanıldı. Çözeltilerin MS/MS e infüzyonu MS'in HPLC ile kolon bağlantısı kesilerek infüzyon pompası aracılığıyla yapıldı. İnfüzyon pompasının akış hızı 10 µL/dk olarak ayarlandı.

Optimizasyon çalışmaları kapsamında MMA ve d₃MMA için bileşik ve iyonizasyon kaynağı bağımlı parametreler, izlenecek ana iyon/ürün iyon ikilileri ve kromatografik retansiyon zamanları belirlendi.

3.6.3.2. Plazma havuzunun ve MMA standartlarının hazırlanması

3.6.3.2.1. Plazma havuzunun hazırlanması

Laboratuvarımızda daha önce LC-MS/MS ile yapılan optimizasyon çalışmasında su ve plazma havuzu kullanılmıştır (83). Dilüent olarak plazma havuzunun kullanılmasındaki amaç; analizi yapılacak olan bileşiğin bulunduğu matriksde olası girişime neden olabilecek maddeleri göz önüne alarak, örnek matriksi ile standartların matriksini eş kılmaktır. Çalışmamızda, MMA analizi için dilüent olarak su ve plazma havuzu kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrileri karşılaştırıldı.

Plazma havuzu, kontrol grubundaki 30 kişiden alınan plazma örneklerinin bir falkon içerisinde karıştırılması ile hazırlandı. MMA kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında ve yöntem geçerlilik çalışmalarında dilüent olarak kullanıldı. Plazma havuzunun endojen MMA konsantrasyonunu belirlemek için standart ekleme yöntemi kullanıldı.

3.6.3.2.2. Plazma havuzunun endojen MMA konsantrasyonunun belirlenmesi

Çalışmada kullanılan plazma havuzunun endojen MMA miktarını belirlemek için standart ekleme yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde sabit hacimdeki plazma havuzuna bilinen konsantrasyondaki bir standart farklı hacimlerde eklendi. Aynı örneklerle ölçüm koşullarını standardize etmek amacıyla sabit konsantrasyon ve hacimde internal standart ilave edildi. Tüm örnekler distile su ile belirlenen sabit bir hacme tamamlandı. Elde edilen örneklerin LC-MS/MS de oluşturdukları sinyal değişimleri

izlendi. Eklenen konsantrasyonlara karşı MMA/d₃-MMA pik alanı oranları ile grafik çizildi. Standart ekleme metodu için yapılan hazırlıklar **Tablo 7** 'de verilmiştir.

Tablo 7 Standart ekleme metodu ile plazma havuzu endojen MMA miktarının belirlenmesi

Plazma havuzu hacmi (µL)	Eklenen standart* hacmi (µL)	Eklenen IS** hacmi (µL)	Eklenen distile su hacmi (µL)	Son konsantrasyon (µmol/L)
100	-	10	90	E
100	20	10	70	E+0.05
100	40	10	50	E+0.1
100	60	10	30	E+0.15
100	80	10	10	E+0.2
E: endojen, *Standart konsantrasyonu: 0.5 µmol/L, **IS konsantrasyonu: 2.1 µmol/L				

3.6.3.2.3. MMA ve d3 MMA stok standartlarının hazırlanması

a) MMA stok standartları

MMA ana stok çözeltisi (5 mM/L)

5.9 mg MMA (M_A=118.09 g/mol) tartılarak bir miktar distile su ile çözüldü. Hazırlanan çözelti distile su ile 10 mL'ye tamamlandı. -20 °C'de ependorflara bölünüp saklandı.

MMA ara stok çözeltisi (50µM/L)

Metilmalonik asit ana stok çözeltisinden 10mL alıp 1000mL' ye plazma havuzu ile tamamlandı. Ependorflara ayrılarak – 20°C'de saklandı.

MMA çalışma stok çözeltisi (5 µM/L)

Metilmalonik asit ara stok çözeltisi I den 200 mL alıp plazma havuzu ile 2000 mL'ye tamamlandı. Ependorflara ayrılarak – 20°C'de saklandı.

Standart eğrisinde kullanmak üzere MMA çalışma stok çözeltisi kullanılarak standartlar hazırlandı.

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

Standart konsantrasyonu ($\mu\text{mol/L}$)	Standart* hacmi (ml)	Dilüent hacmi (ml)
2.5	250	250
1	50	200
0.5	25	225
0.25	10	240
0.1	10	490
* Standart konsantrasyonu: $5\mu\text{mol/L}$		

b) Döteryumlu internal standart stok çözeltileri

2.5 μM lık d₃-MMA çözeltisi: 400 mL, 5 μM lık plazma havuzu çözeltisinden alındı, 200 mL internal standart eklendi.

1 μM lık d₃-MMA çözeltisi: 200 mL, 1 μM lık plazma havuzu çözeltisinden alındı, 100 mL internal standart eklendi.

0.5 μM lık d₃-MMA çözeltisi: 200 mL, 0.5 μM lık plazma havuzu çözeltisinden alındı, 100mL internal standart eklendi.

0.25 μM lık d3 MMA çözeltisi: 200 mL, 0.25 μM lık plazma havuzu çözeltisinden alındı, 100 mL internal standart eklendi.

0.1 μM lık d3 MMA çözeltisi: 200 mL, 0.1 μM lık plazma havuzu çözeltisinden alındı, 100 mL internal standart eklendi.

3.6.3.3. SID-MRM LC-MS/MS ile MMA analizi için örnek hazırlığı

Plazmadaki protein ve yüksek moleküler ağırlıklı maddeleri uzaklaştırmak için, 30 kDa luk ve daha altındaki moleküllerin geçişine izin veren santrifugal filtreli ultra filtrasyon tüpleri kullanılarak deproteinizasyon işlemi yapıldı.

MMA için kalibrasyon ve kontrol örnekleri, hasta ve kontrol numunelerinin çalışılmasında şu prosedür takip edildi:

1. 200 µL kontrol ve hasta serumu, kalibrasyon standartı, hasta ve kontrol örnekleri ependorfa alındı.
2. 100 µL d₃- MMA eklenip vortekslendi.
3. 30 kDa luk santrifugal filtreli tüplere aktarıldı.
4. 16,300 g'de 30 dk. santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası filtratın 50µLsi insört vial HPLC oto örnekleyiciye yerleştirildi.

3.6.3.4. Yöntem geçerlilik çalışmaları

Biyoanalitik yöntemin geçerliliği, bir analitin konsantrasyonun kantitatif olarak saptanması için kullanılan yöntemin güvenilir olduğunun gösterilmesi amacıyla yapılmaktadır.

3.6.3.4.1. Doğruluk

Analitik ölçüm yönteminin doğruluğu, yöntem ile elde edilen ölçüm değerlerinin gerçek değere olan yakınlığıdır. Bir analitik yöntemin doğruluğu gerçek değer ve yöntem tarafından belirlenen test sonuçlarına dayanır (59). Doğruluk çeşitli yöntemler kullanılarak elde edilebilir. Bu yöntemlerden biri yöntemin sonuçlarını yerleşik, kabul görmüş bir yöntem ile karşılaştırmaktır. Diğer yöntem ise, doğruluğun bilinen konsantrasyonlara sahip bir örneğin analizi ile belirlenmesidir. Analitik doğruluğun kabul edilebilir sınırı ölçülen değer, analitin gerçek değerinin $\pm\%15$ i içinde olmasıdır. MMA yönteminin doğruluğu, ardışık üç günde üç tekrarlı olarak çalışılan kalibrasyon standartlarının ortalamaları alınarak hesaplandı.

3.6.3.4.2. Kesinlik

Yöntemin kesinliği herhangi bir değerin tekrarlanabilme kabiliyeti veya bireysel test sonuçlarının birbirlerine yakınlığının bir derecesidir (59). Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları, plazma havuzu kullanılarak hazırlanan düşük ve yüksek konsantrasyonlardaki iki farklı kontrol örneği ile yapıldı. Her kalite kontrol örneği ile gün içi tekrarlanabilirlik için, bir gün içinde 10 tekrarlı okuma, günler arası tekrarlanabilirlik için 10 ardışık günde birer okuma yapılarak yöntemin kesinliği saptandı. Kesinlik % CV olarak hesaplandı.

Tablo 9 % CV çalışmalarında kullanılan solüsyonların hazırlanması.

Kalite kontrol örneği konsantrasyonu (µmol/L)	Standart* hacim (µL)	Plazma havuzu hacmi (µL)
0.3	30	470
2.5	200	200

*Standart konsantrasyonu: 5 µmol/L

3.6.3.4.3. Tespit limiti ve kantitasyon limiti

Kütle spektrometresinde uygulanan biyoanalitik bir yöntemde tespit limiti (LOD), kullanılan mobil faz v.b. etkilere kaynaklanan arka plan gürültüsünden farklı olarak tespit edilen ancak miktarı belirlenemeyen en küçük analit konsantrasyonudur. Kantitasyon limiti ise (LOQ), uygun doğruluk ve kesinlik sınırları içinde, bir örnekteki analitin kantitatif olarak tespit edilebilen en düşük konsantrasyonudur (83). LOD ve LOQ belirlenmesinde kromatografik ölçümlerde pratik bir kural olan sinyal/gürültü (S/N) oranı kullanıldı.

3.7. Araştırma planı ve takvimi

Literatür tarama: Mart 2013- Mayıs 2013

Hasta örneklerinin toplanması: Mayıs 2013- Şubat 2014

Kontrol örneklerinin toplanması: Nisan 2014- Temmuz 2014

Yöntem geçerlilik çalışmaları: Temmuz 2014

Hasta ve kontrol örneklerinin çalışılması: Ağustos 2014

Tez yazımı: Eylül 2014- Şubat 2019

Tez savunması: Nisan 2019

3.8. Verilerin değerlendirilmesi:

İstatistiksel analizler IBM SPSS 21.0 programıyla yapıldı. Frekans tablolarında nominal değişkenler için sayı ve yüzdelere oluşturuldu. Sürekli değişkenlere ilişkin ortalama, standart sapma gibi tanımlayıcı istatistikler elde edildi. Çapraz tablolar yapıp ki-kare (chi-square) analizi sonucunda p değeri 0,05'den küçük çıktığı durumlar için gruplar arası ilişki, istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

Ayrıca sürekli değişkenler için Spearman Korelasyon yöntemi ile ikili olarak değişkenler arasındaki ilişkiler incelendi, p değeri 0,05 küçük çıktığı durumlar için değişkenler arası ilişki istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi. Korelasyon katsayısı (r) değeri $< 0,2$ için korelasyon yok, $0,2 < r < 0,4$ için zayıf korelasyon, $0,4 < r < 0,6$ için kuvvetli korelasyon, $> 0,8$ değeri çok kuvvetli korelasyon yorumu yapılmıştır.

Sürekli değişkenler için her bir değişkenin normal dağılıp dağılmadığının incelenmesinde, Shapiro-Wilks normallik testi kullanıldı, p değeri 0,05'ten küçük çıkan değerlerin normal dağılmadığı belirlendi. Normallik varsayımına göre kullanılacak istatistiksel testin seçimine karar verilmektedir.

İki gruplu normal dağılıma uymayan sosyodemografik değişkenlerde iki bağımsız grup için Mann Whitney U testi uygulandı. Testler sonucunda p değerleri 0.05'ten büyük olduğunda, gruplar arasında istatistiksel açıdan fark yoktur yorumu yapılabilmektedir.

3.9. Araştırmanın sınırlılıkları

Kontrol ve hasta grubundaki birey sayılarının görece az sayıda olmasının çalışmanın istatistik açıdan kısıtlı yönüdür.

Kullanılan SID-MRM LC-MS/MS cihazında MMA ölçümü ile aynı anda homosistein ölçümü yapılabilmesine karşın homosistein için gerekli olan internal standartın alınamaması nedeniyle homosistein ölçümleri bu yöntemle yapılamamış,

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi Merkez Laboratuvarı'nda kullanılan rutin analiz yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Karaciğer yağlanması da B12 vitamini eksikliğine neden olmaktadır. Hasta ve kontrol gruplarında ultrasonografik görüntüleme yöntemleri ile karaciğer yağlanması açısından tanı çalışması yapılamamıştır.

3.10. Etik kurul onayı

Bu çalışma için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi Etik kurulundan 24.10.2013 Tarihli ve 1186-GOA Protokol numaralı 2013/40-19 karar numarası ile etik kurul onay alınmıştır **(EK1)**.

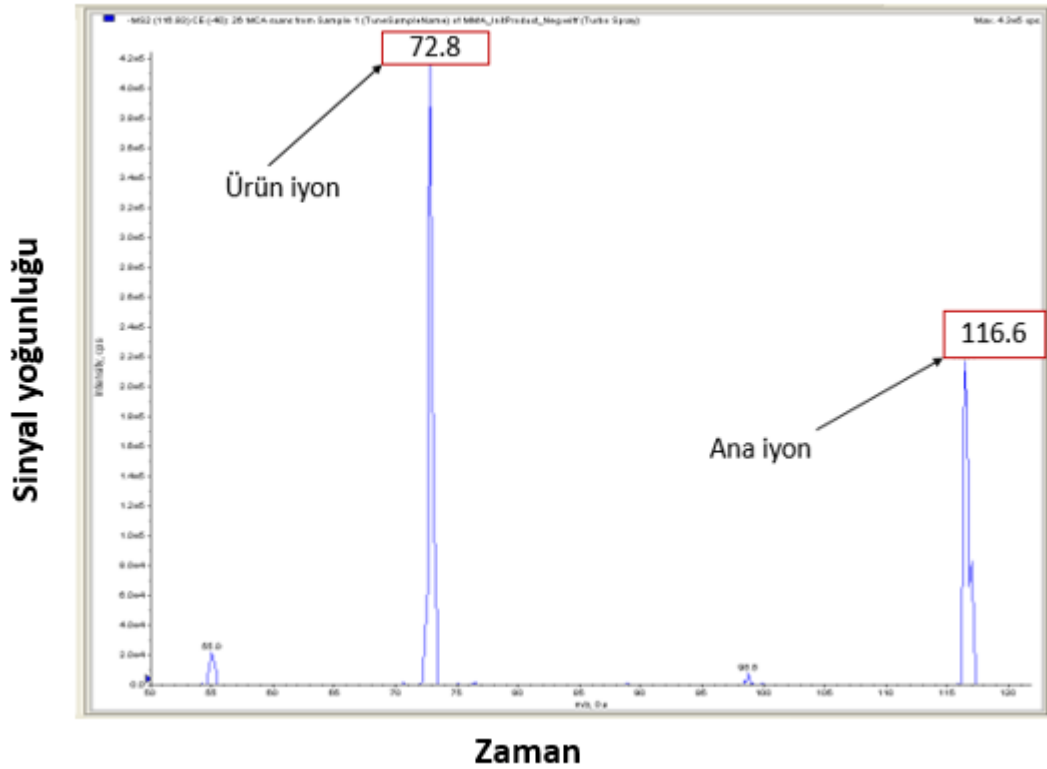


4.BULGULAR

4.1. LC-MS/MS ile MMA Analizi koşullarının optimizasyonu çalışmaları

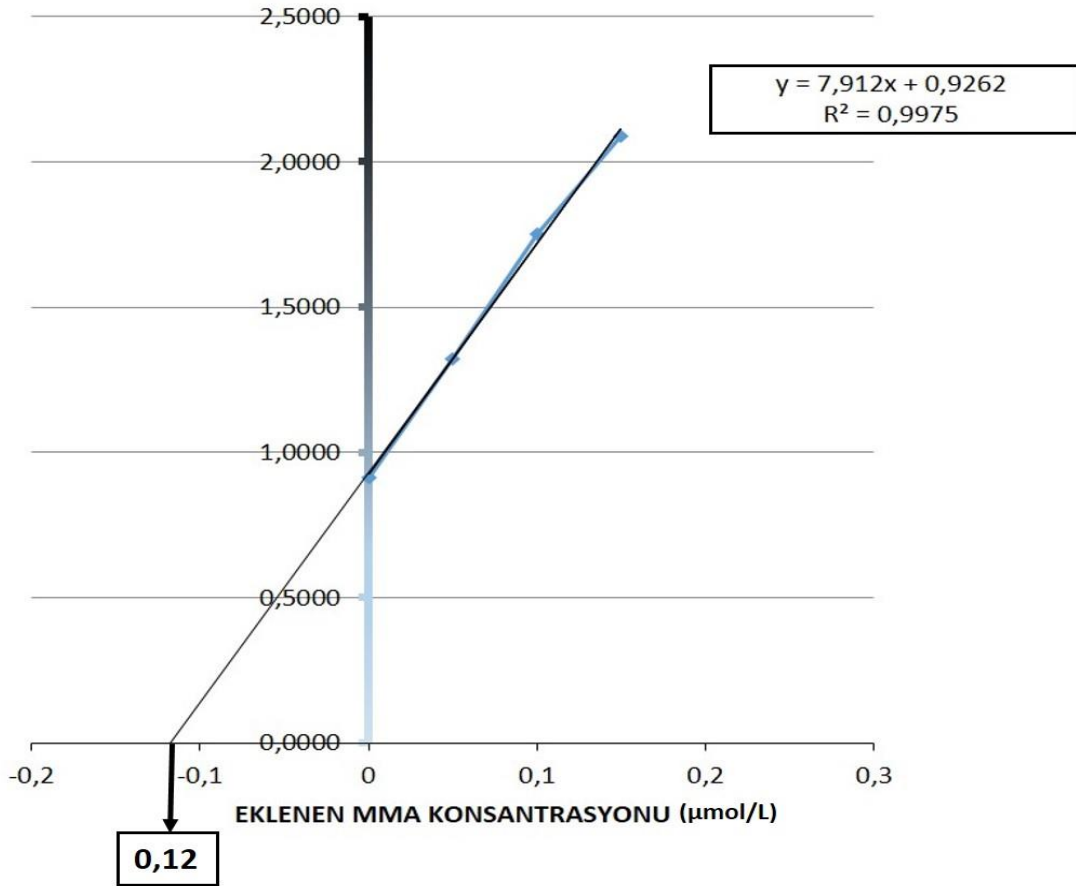
4.1.1 Bileşik ve iyonizasyon kaynağı bağımlı parametrelerin belirlenmesi

MMA ve d₃-MMA için ana iyon/ ürün iyon ikilisi MMA standartı ve internal standartın MS' e infüzyonu ile belirlendi. Ana iyon için izlenecek m/z değeri 116,6 olarak tespit edildi. MMA ana iyonunun parçalanarak bir karboksil grubu ayrılmasıyla oluşan ve en yüksek intensiteyi veren 72,8 m/z değerine sahip iyon ürün iyon olarak seçildi. MMA için ana iyon / ürün iyon ikilisi 116,6/72,8 olarak belirlendi (**Şekil 10**).



Şekil 10 MMA için ESI MS/MS ürün iyon / ana iyon kütle spektrumu.

d₃-MMA standartının moleküler kütlesi MMA standartının moleküler kütlesinden üç dalton fazladır. D3 MMA internal standartı için ana iyon m/z değeri 119,6 olarak belirlendi. Ürün iyon m/z değeri 75,8 olarak seçildi. d₃ –MMA için ana iyon/ürün iyon ikilisi 119,6/75,8 olarak belirlendi (**Şekil 11**).



Şekil 12 Standart ekleme yöntemi grafiği

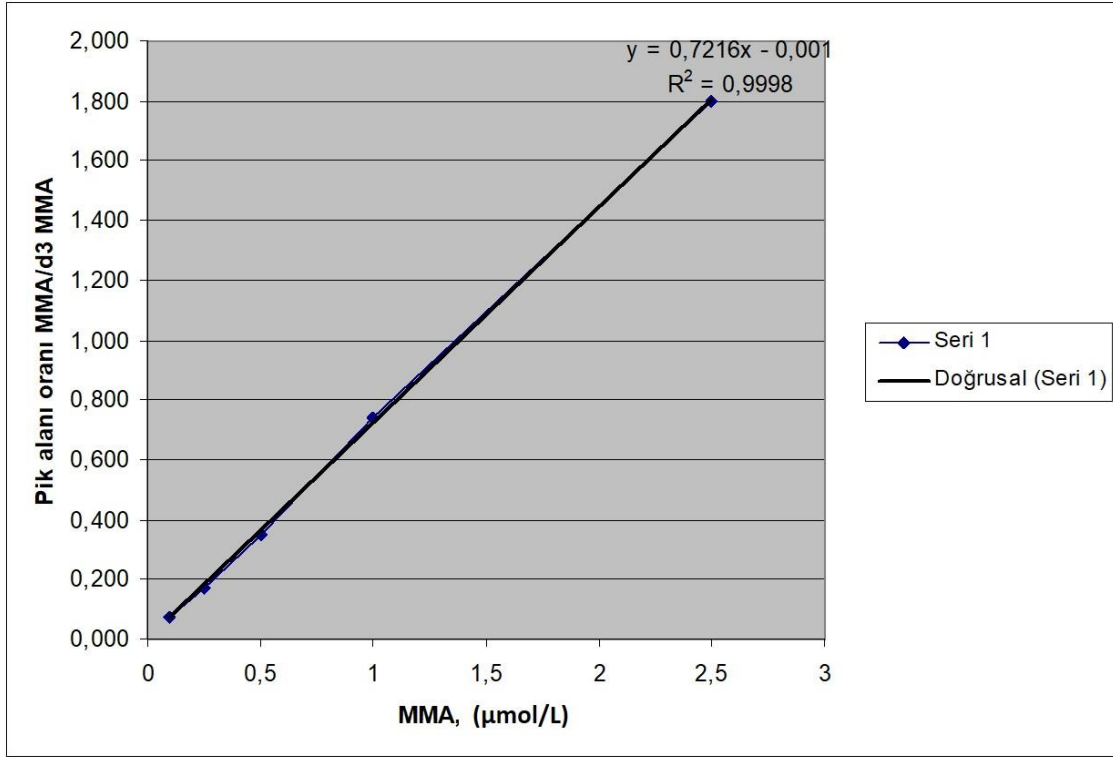
4.3. MMA Kalibrasyon Eğrisi

Günde üç tekrar olarak çalışılan, distile su ile dilüsyonu yapılan kalibrasyon standartlarına ait pik alanı oranları **Tablo 10**'da gösterilmiştir.

Tablo 10 MMA kalibrasyon standartlarına ait pik oranları.

Konsantrasyon ($\mu\text{mol/L}$)	Ortalama pik alanı oranı
0.1	0.075
0.25	0.175
0.5	0.350
1	0.738
2.5	1.799

MMA kalibrasyon eğrisine ait regresyon denklemi $y = 0,7216x - 0,001$ ve korelasyon katsayısı (R^2) değeri 0,9998'dir (**Şekil 13**).



Şekil 13 MMA kalibrasyon eğrisi grafiği

4.4. Yöntem Verifikasyon Çalışmaları

MMA yöntemi daha önce laboratuvarımızda optimize edilmiştir. Yöntem geçerlilik çalışmaları yapılan bu yöntem için verifikasyon çalışmaları yapılmıştır.

4.4.1. Doğruluk

MMA distile su ile hazırlanan 0.1-2.5 µmol/L konsantrasyonları arasındaki standartların günde üç tekrarlı olarak çalışılmasıyla elde edilen % doğruluk değerleri **Tablo 11** de gösterilmiştir. Tüm standartların doğruluğu $\%100 \pm 4$ olarak tespit edilmiştir.

Tablo 11 MMA kalibrasyon eğrisi standartlarının doğruluğu.

Gerçek konsantrasyon (μmol/L)	Ortalama % doğruluk
0.1	104
0.25	96.1
0.5	97.5
1	102.7
2.5	99.6

4.4.2. Tespit ve Kantitasyon Limiti

MMA için LC- MS/MS cihazında sinyal/ gürültü oranının (S/N) >3 olduğu konsantrasyon tespit limiti, S/N > 10 olduğu konsantrasyon ise kantitasyon limiti olarak belirlendi. Tespit limiti 0.03 μmol/L, kantitasyon limiti 0.06 μmol/L olarak tespit edildi (**Tablo 12**).

Tablo 12 MMA yönteminin LOD ve LOQ değerleri.

Dilüsyon oranı	S/N oranı	MMA konsantrasyonu (μmol/L)
1	17.8	0.12
2	11	0.06
4	3.9	0.03

4.4.3. Kesinlik

Düşük ve yüksek konsantrasyonlarda hazırlanan kalite kontrol örnekleri ile uygulanmıştır. Gün içi 10 tekrar ve günler arası 10 tekrar ile çalışma yapılmıştır. Gün içi ve günler arası kesinlik %4'ten küçük bulundu (**Tablo 13**).

Tablo 13 Gün içi ve günler arası kesinlik çalışması.

Kalite kontrol seviyesi	Günler arası kesinlik (% CV)	Gün içi kesinlik (% CV)
Düşük (0.3 µmol/L)	3.21	3.93
Yüksek (2.5 µmol/L)	2.63	1.97

4.5. Obez ve Normal Kilolu Adölesanlara ait Bulgular

4.5.1. Obez ve Normal Kilolu Adölesanların Karşılaştırılması

4.5.1.1. Tanımlayıcı bulgular

Çalışmaya 58 obez ve 30 normal kilolu adölesan dahil edildi. Çalışma için hazırlanan veri kayıt formuna doğum tarihi, yaş, ağırlık (kg), boy (cm), vücut kitle indeksi (VKİ) verileri kaydedildi (**Tablo 14**). Verilerin normal dağılıma uyup uymadığını anlamak için Shapiro-wilk testi uygulandı; hiçbir verinin normal dağılıma uymadığı görüldü. Normal dağılıma uymayan verilerin arasındaki farkların anlamlı olup olmadığını incelemek için Man-Whitney U testi uygulandı; $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Kilo, yaş ve VKİ arasında iki grup arasında anlamlı fark tespit edilirken boy değeri için anlamlı fark bulunmadı.

Tablo 14 Obez ve kontrol gruplarına ait antropometrik ölçümler.

Grup		Boy	Ağırlık	Yaş	VKİ
Obez (n=58)	Ortanca (min-max)	163 (119-191)	81 (38-145)	14 (12-18)	30.25 (23.3-48)
Kontrol (n=30)	Ortanca (min-max)	160 (140-199)	50,5 (29-78)	16 (12-18)	19.6 (14.8-26)
P		0.603	0.000	0.002	0.000

4.5.1.2. Biyokimyasal veriler

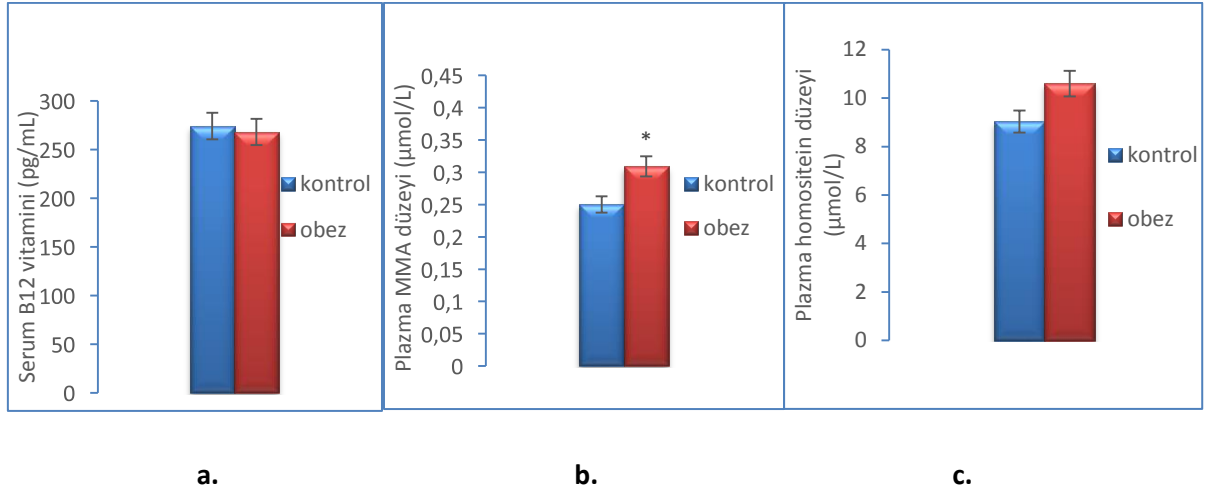
Verilerin normal dağılıma uyup uymadığını anlamak için Shapiro-wilk testi uygulandı; hiçbir verinin normal dağılıma uymadığı görüldü. Normal dağılıma uymayan verilerin arasındaki farkların anlamlı olup olmadığını incelemek için Mann-Whitney U testi uygulandı; $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.5.1.2.1. Serum B12 ve Fonksiyonel B12 belirteçleri

Obez adölesanlar ile normal kilolu adölesanlar B 12 vitamini eksikliği belirteçleri ile ilişkili biyokimyasal parametreler açısından incelendiğinde; Serum B12 ve Hcy değerleri açısından iki grup arasında anlamlı fark bulunmazken, MMA düzeyleri obez grupta normal kilolu gruba göre anlamlı olarak yüksek bulundu (**Tablo 15, Şekil 14**)

Tablo 15 Serum B12 ve fonksiyonel B12 biyobelirteç düzeyleri

		Obez (n=58)	Kontrol (n=30)	p
Serum B12 vitamini (pg/mL)	Ortanca (min-maks)	268 (25-527)	274 (101-987)	0.554
MMA (μmol/L)	Ortanca (min-maks)	0.309 (0.15-2.86)	0.250 (0.12-0.309)	0.002
Hcy (μmol/L)	Ortanca (min-maks)	10.6 (0.5-50)	9.03 (5.6-17.0)	0.133



* p<0.05, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında.

Şekil 14 Obez ve kontrol gruplarında a. Serum B12 b. Plazma MMA c. Plazma Hcy düzeylerinin karşılaştırılması

4.5.1.2.2. Birleşik B12 değeri

2015 yılında Fedosov ve ark. 5211 kişilik bir popülasyon ile, serum B12, plazma Hcy, plazma MMA ve serum holoTC parametrelerini ve yaş verilerini kullanarak, B12 vitamini durumunu tespit edebilecekleri bir birleşik B12 değeri ve bu değer için kesim noktalarını tanımladılar (6).

Birleşik B12 = $\log_{10} [(holoTC \times B12) / (MMA \times Hcy)] - (\text{yaş faktörü})$ formülü ile uygulanan hesaplama sisteminde oluşturulan beş farklı kesim noktası şu şekildedir: Birleşik B12 >1,5 olan değerler yüksek B12 vitaminini; -0,5 ile 1,5 arasındaki değerler normal B12 vitaminini; -0,5 ile -1,5 arasındaki değerler düşük B12 vitamini durumunu, -1,5 ile -2,5 arasındaki değerler olası B12 vitamini eksikliğini ve -2,5 den daha düşük değerler kuvvetli olasılıkta B12 vitamini eksikliğini göstermektedir. Bu katmanlama klinik ve epidemiyolojik amaçlı B12 takviyesi açısından tavsiye nitelikli protokollerin oluşturulmasında kullanılmaktadır (6).

Araştırmacılar bu dört parametreden biri ya da birkaçının eksik olduğu durumlar için farklı yönergeler oluşturmuşlardır. Biz de çalışmamızda serum B12, plazma MMA ve Hcy değerleri ile aşağıdaki formülden yararlanarak birleşik B12 değerlerini hesapladık.

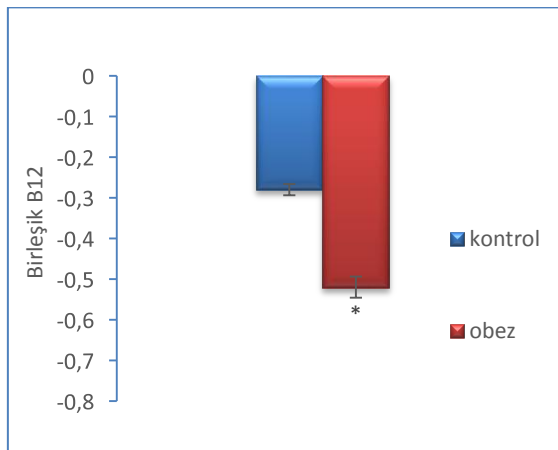
$$\text{Birleşik B12} : (6.136 + 0.8914 \times X + 0.003920 \times \text{yaş faktörü} - 2.6143 \times \sqrt{X + 4})$$

Yukarıdaki formülde “X” değeri eksik olan holotranskobalamin yerine geçmekte olup, log holo TC= log (B12/MMA x Hcy) formülü ile hesaplanmıştır.

Birleşik B12 hesaplamaları sonucunda kontrol grubundaki 30 kişinin %23,3 ünde, obez gruptaki 58 kişinin % 51.8’inde B12 düşüklüğü ve/veya farklı düzeylerde B12 eksikliği belirten değerler saptandı (**Şekil 16**). Birleşik B12 değerleri açısından istatistiksel olarak obez ve kontrol grupları arasında fark olup olmadığını anlamak için pearson ki-kare testi uygulandı; gruplar arasında anlamlı fark tespit edildi (**Tablo 16, Şekil 15**).

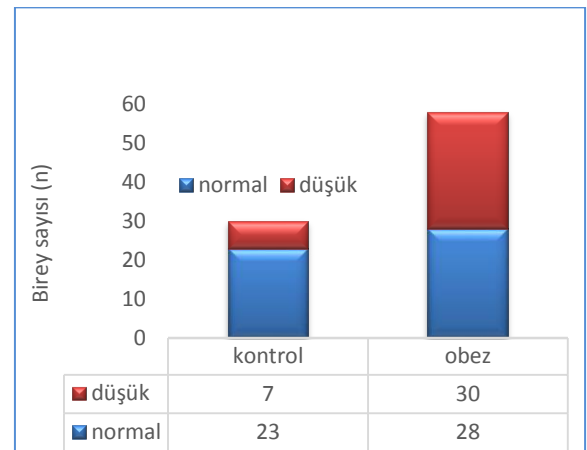
Tablo 16 . Obez ve kontrol grubuna ait Birleşik B12 verileri.

		Obez (n=58)	Kontrol (n=30)	p
Birleşik B12	Ortanca (min-maks)	-0,52 (-3,66-1,36)	-0,28 (-1,42-0,92)	0.011



* p<0.005

Şekil 15 Obez ve kontrol gruplarında Birleşik B12 düzeyi.



Şekil 16 Gruplara göre birleşik B12 düzeyleri

normal ve düşük olan birey sayıları

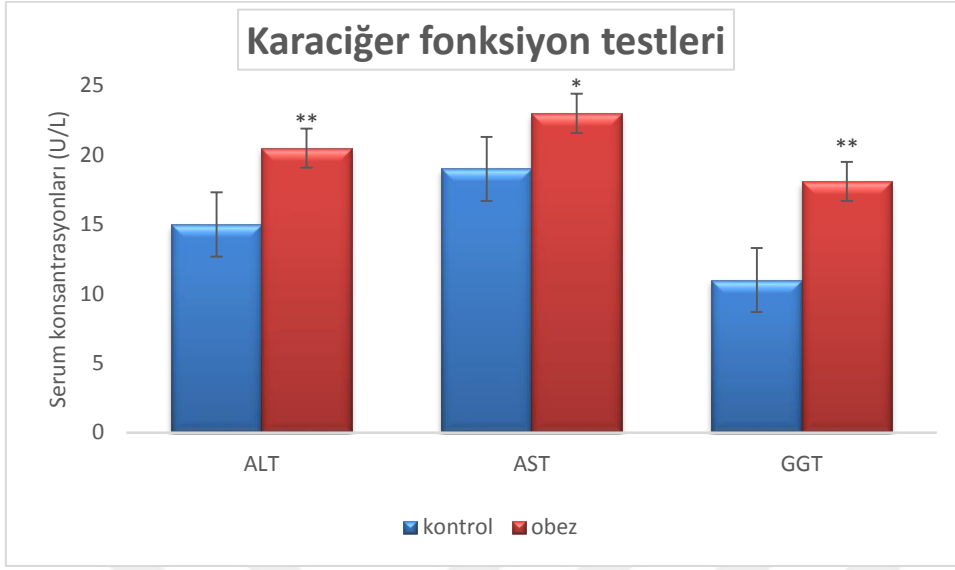
4.5.1.2.3. Diğer biyokimyasal parametreler

Obez ve kontrol gruplar karşılaştırıldığında, obez olgularda karaciğer fonksiyon testleri ve total protein değerleri kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek, glukoz değerleri ise anlamlı olarak düşük tespit edilirken; insülin, HOMA-IR, kan sayımı parametreleri, T. Bilirubin, D. Bilirubin, albumin, trigliserit, total kolesterol, FT3, FT4, TSH, ferritin, folik asit düzeyleri arasında anlamlı fark bulunamadı (**Tablo17, Şekil 17, 18, 19**).



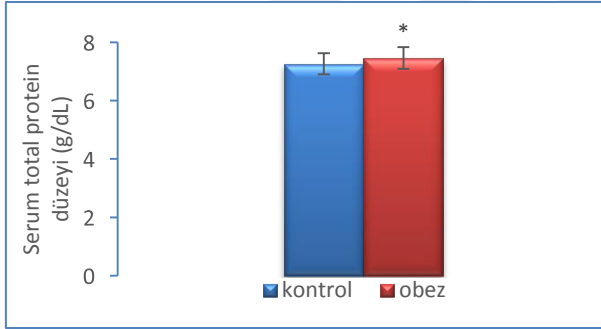
Tablo 17 Obez ve kontrol gruplarına ait biyokimyasal parametreler

		Obez (n=58)	Kontrol (n=30)	p
AST (U/L)	Ortanca	23	19	0.012
	(min-maks)	(13-63)	(13-34)	
ALT (U/L)	Ortanca	20.5	15	0.000
	(min-maks)	(10-133)	(9-27)	
GGT (U/L)	Ortanca	18.5	11	0.000
	(min-maks)	(8-98)	(1-81)	
Total protein (g/dL)	Ortanca	7.46	7.26	0.021
	(min-maks)	(6.5-8.3)	(1.7-8.1)	
Glukoz (mg/dL)	Ortanca	86	90	0.010
	(min-maks)	(71-112)	(79-110)	
İnsülin(µIU/mL)	Ortanca	12.3	10.4	0.111
	(min-maks)	(3.6-73.15)	(2.66-24.6)	
HOMA-IR	Ortanca	2.52	2.40	0.289
	(min-maks)	(0.82-20.23)	(0.58-5.32)	
Hemoglobin (g/dL)	Ortanca	13.3	13.6	0.281
	(min-maks)	(9.0-16.5)	(11.1-16.0)	
Hematokrit(%)	Ortanca	40.2	40	0.546
	(min-maks)	(4.9-48.5)	(16.3-48)	
Lokosit (K/mm ³)	Ortanca	8.4	7.7	0.158
	(min-maks)	(4.7-15.0)	(5.5-16.8)	
MPV (fL)	Ortanca	8.3	8.4	0.324
	(min-maks)	(6.6-18.4)	(7.06-12.5)	
Total bil. (mg/dL)	Ortanca	0.62	0.71	0.174
	(min-maks)	(0-6.1)	(0.3-11)	
D. bilirubin (mg/dL)	Ortanca	0.13	0.11	0.866
	(min-maks)	(0.05-0.87)	(0.7-0.21)	
HDL kolesterol (mg/dL)	Ortanca	43.5	43	0.628
	(min-maks)	(26-243)	(26-78)	
Albümin (g/dL)	Ortanca	4.50	4.55	0.857
	(min-maks)	(0.69-14.43)	(0.40-5.10)	
Trigliserit (mg/dL)	Ortanca	109	84.5	0.089
	(min-maks)	(12-314)	(30-431)	
Total kolesterol (mg/dL)	Ortanca	162.5	158	0.436
	(min-maks)	(14.4-256)	(15-273)	
TSH (mU/L)	Ortanca	2.4	1.99	0.288
	(min-maks)	(0.64-4.87)	(0.09-8.95)	
FT4 (pg/mL)	Ortanca	0.94	1.17	0.150
	(min-maks)	(0.62-7.6)	(0.34-1.55)	
FT3 (pg/mL)	Ortanca	3.51	3.85	0.115
	(min-maks)	(0.78-5.07)	(3-4.97)	
Ferritin (ng/mL)	Ortanca	31.2	22.9	0.185
	(min-maks)	(1.41-118)	(3.7-141)	
Folik asit (ng/mL)	Ortanca	7.4	8.25	0.520
	(min-maks)	(2.4-16)	(3.6-17.4)	

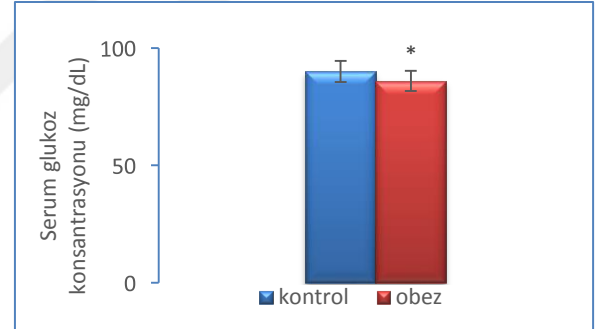


* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Şekil 17 Obez ve kontrol gruplarında serum ALT, AST ve GGT düzeyleri.



Şekil 18 Obez ve kontrol gruplarında



Şekil 19 Obez ve kontrol gruplarında serum

Serum total protein düzeyleri. * $p < 0.05$

glukoz düzeyleri. * $p < 0.05$

4.5.1.3. Korelasyon analizleri

4.5.1.3.1. Obez grup korelasyon analizleri

Obez grupta yer alan 58 bireyin verileri ile yapılan korelasyon analizinde, incelediğimiz temel parametrelerden MMA ile; homosistein arasında orta şiddetli ($p = 0.00$, $r = 0.446$), B12 arasında negatif yönlü orta şiddetli ($p = 0.00$, $r = -0.45$), total

protein arasında ise zayıf ($p = 0.040$, $r = 0.298$) korelasyonlar saptandı (**Tablo 18**). Obez gruba ait diğer korelasyon analiz sonuçları Tablo 18’da gösterilmiştir.

Tablo 18 Obez grupta korelasyon analizleri.

		Htc	Hgb	İns.	AST	ALT	GGT	T. Prot.	Fer.	Fol.	B12	MMA	Hcy
Hgb	p= r =	0.000 0.852											
İns.	p= r =	0.970 0.005	0.444 -0,056										
AST	p= r =	0.403 0.112	0.130 0.201	0.350 0.125									
ALT	p= r =	0.181 0.175	0.041 0.269	0.072 0.238	0.000 0.705								
GGT	p= r =	0.022 0.301	0.001 0.411	0.073 0.238	0.000 0.560	0.000 0.705							
Total Protein	p= r =	0.505 0.089	0.161 0.228	0.343 -0.127	0.009 0.339	0.067 0.242	0.005 0.363						
Fer.	p= r =	0.036 0.276	0.080 0.276	0.082 0.230	0.118 0.207	0.002 0.394	0.000 0.448	0.175 0.184					
Fol.	p= r =	0.040 -0.271	0.430 -0.106	0.645 -0.062	0.430 0.106	0.900 0.017	0.766 -0.040	0.517 0.087	0.936 0.011				
B12	p= r =	0.306 0.137	0.287 0.142	0.755 -0.042	0.547 0.081	0.829 0.029	0.449 -0.101	0.040 -0.271	0.727 0.047	0.663 -0.058			
MMA	p= r =	0.901 -0.017	0.570 -0.076	0.678 0.056	0.366 0.121	0.372 0.119	0.460 0.099	0.023 0.298	0.922 0.013	0.948 -0.009	0.000 -0.451		
Hcy	p= r =	0.329 0.130	0.270 0.147	0.256 -0.152	0.397 -0.113	0.551 -0.080	0.460 0.099	0.601 -0.070	0.138 0.197	0.083 -0.230	0.329 0.130	0.000 0.446	
VKi	p= r =	0.556 -0.079	0.376 -0.119	0.003 0.387	0.363 -0.122	0.791 0.360	0.630 0.665	0.509 -0,088	0.534 0.083	0.355 -0.124	0.444 -0.103	0.610 -0.068	0.874 0.021

4.5.1.3.2. Normal kilolu grupta korelasyon analizleri

Normal kilolu grupta bulunan 30 adölesan ile yapılan korelasyon analizi çalışmalarında, MMA ile B12 vitamini düzeyi arasında negatif yönlü ve zayıf korelasyon ($p = 0.031$ $r = - 0.395$) saptanırken, homosistein ile total protein düzeyleri

arasında orta şiddetli ($p = 0.028$ $r = 0.402$), B12 vitamini arasında ise negatif yönlü ve zayıf ($p = 0.050$ $r = -0.391$) korelasyonlar belirlendi. Kontrol grubuna ait diğer korelasyon analiz sonuçları **Tablo 19'da** gösterilmiştir.

Tablo 19 Normal kilolu grupta korelasyon analizleri.

		Htc	Hgb	İns.	AST	ALT	GGT	T. Prot.	Fer.	Fol.	B12	MMA	Hcy
Hgb	p= r =	0.000 0.797											
İns.	p= r =	0.884 0.028	0.356 0.175										
AST	p= r =	0.279 0.204	0.282 0.203	0.016 -0.437									
ALT	p= r =	0.082 0.324	0.062 0.345	0.530 0.120	0.452 0.153								
GGT	p= r =	0.040 0.377	0.119 0.291	0.242 -0.220	0.026 0.405	0.383 0.165							
Total Protein	p= r =	0.266 0.210	0.378 0.167	0.283 -0.202	0.230 0.226	0.282 0.203	0.254 0.215						
Fer.	p= r =	0.001 0.557	0.002 0.539	0.169 0.258	0.742 0.063	0.093 0.312	0.217 0.232	0.060 0.248					
Fol.	p= r =	0.138 0.287	0.184 0.249	0.774 0.054	0.862 0.033	0.743 -0.062	0.444 -0.145	0.615 0.095	0.925 0.018				
B12	p= r =	0.578 -0.106	0.513 -0.124	0.617 0.095	0.467 -0.138	0.982 0.004	0.943 -0.014	0.900 -0.024	0.717 0.069	0.887 0.027			
MMA	p= r =	0.065 0.341	0.131 0.282	0.410 -0.156	0.421 0.152	0.563 -0.110	0.355 0.175	0.810 -0.046	0.677 -0.079	0.686 0.077	0.031 -0.395		
Hcy	p= r =	0.065 0.341	0.412 0.155	0.556 0.112	0.854 0.035	0.750 0.061	0.088 0.317	0.028 0.402	0.358 0.174	0.100 -0.306	0.050 -0.361	0.072 0.333	
VKi	p= r =	0.224 -0.229	0.166 -0.260	0.067 0.338	0.008 -0.472	0.621 0.094	0.869 0.031	0.924 -0.018	0.223 -0.229	0.189 -0.247	0.704 -0.072	0.708 -0.071	0.128 0.284

4.5.1.4. Fonksiyonel B12 vitamini eksikliğinin tanısında metilmalonik asit ve homosistein düzeylerinin serum B12 vitamini ölçümüne göre değerin karşılaştırılması.

Obez ve normal kilolu adölesanlar serum B12 vitamini, metilmalonik asit ve homosistein düzeyleri açısından düşük, normal seviyede ve yüksek olmak üzere üç ayrı gruba ayrıldı. Serum B12 vitamini değeri için referans aralık olarak ölçümde kullanılan ticari kit sağlayıcı firma tarafından tavsiye edilen aralık olan (126.5-505 pg/mL) kabul edildi. Metilmalonik asit için referans aralığı literatüre dayanarak (0.03-0.26 µmol/L) olarak alındı (62). Homosistein referans aralıkları ise literatüre dayanarak (5-15 µmol/L) olarak kabul edildi (55).

Her iki grupta serum B 12 düzeyi referans aralık altında bulunanlar (Düşük) “B 12 eksikliği olan”, referans aralık (Normal) ve üzerinde olanlar (Yüksek) ise “B 12 eksikliği olmayan” bireyler olarak değerlendirildi. Obez grupta serum B12 vitamini düzeyi düşük 7 (%12) kişi, normal ve yüksek olan 51 (%88) kişi tespit edildi. Kontrol grubunda ise B12 si düşük 2 (%6,6), normal ve yüksek olan 28 (%93,4) kişi tespit edildi (**Tablo 20**).

Tablo 20 Serum B12 vitamini ölçümleri sonucunda gruplarda düşük, normal ve yüksek düzeyde sonuçlara sahip birey sayıları

	Serum B12 Vitamini Düzeyi	
	Düşük (n)	Normal + Yüksek (n)
Obez (n)	7 (%12)	51 (%88)
Normal kilolu (n)	2 (%6,6)	28 (%93,4)

Sonuçlar MMA düzeyleri açısından değerlendirildiğinde, obez ve normal kilolu gruplarda MMA düzeyi yüksek olanlar “B12 eksikliği olan” normal ve düşük olanlar ise “B12 eksikliği olmayan” bireyler olarak değerlendirildi. Buna göre, obez grupta metilmalonik asit düzeyi düşük ve normal olan 21 (%36,2) ve yüksek olan 37 (% 63,8) kişiye rastlanırken, normal kilolu adölesanlarda metilmalonik asit düzeyi düşük ve normal olan 19 (% 63,3), ve yüksek olan 11(% 36,7) kişi saptanmıştır (**Tablo 21**).

Tablo 21 Metilmalonik asit ölçümleri sonucu gruplara göre düşük, normal ve yüksek MMA düzeylerine sahip birey sayıları.

	Metilmalonik asit düzeyi	
	Düşük + Normal (n)	Yüksek (n)
Obez (n)	21 (%36,2)	37 (%63,8)
Normal kilolu (n)	19 (%63,3)	11 (%36,7)

Her iki grupta Hcy düzeyi yüksek olanlar “B12 eksikliği olan”, düşük ve normal olanlar “B12 eksikliği olmayan” bireyler olarak nitelendirildi. Obez grupta homosistein düzeyi düşük ve normal olan 45 (% 77,6) ve yüksek olan 13 (% 22,4) birey saptanmıştır. Kontrol grubunda homosistein düzeyi düşük ve normal olan 29 (%96,7) kişi ve yüksek olan 1 kişiye (%3,3) rastlanmıştır (**Tablo 22**).

Tablo 22 Homosistein ölçümleri sonucu gruplara göre düşük, normal ve yüksek Hcy düzeylerine sahip birey sayıları.

	Homosistein düzeyi	
	Düşük +Normal (n)	Yüksek (n)
Obez (n)	45 (%77,6)	13 (%22,4)
Normal kilolu (n)	29 (%96,7)	1 (%3,3)

4.5.1.4.1. Obez grupta vitamin B12 eksikliği tanısı için ölçüm parametrelerinin karşılaştırmaları.

Obez grupta yer alan 58 birey ile B12 vitamini eksikliğinin tanısında kullanılan parametrelerin karşılaştırılması için çapraz tablolar hazırlanmış, sonuçlar **Tablo 23** ve **Tablo 24** de gösterilmiştir.

Tablo 23 Obez grupta serum B12 vitamini ölçümü ve metilmalonik asit ölçümünün B12 eksikliğini yansıtmaları açısından karşılaştırılması.

Serum B12 vitamini ölçümü		Metilmalonik Asit Ölçümü	
		MMA düzeyi normal ve düşük (n)	MMA düzeyi yüksek (n)
	B12 düzeyi normal (n)	21 (%41,2)	30 (%58,8)
	B12 düzeyi düşük (n)	0 (%0)	7 (%100)

Tablo 24, Obez grupta serum B12 vitamini ölçümü ve homosistein ölçümünün karşılaştırılması

Serum B12 vitamini ölçümü		Homosistein Ölçümü	
		Homosistein düzeyi normal ve düşük (n)	Homosistein düzeyi yüksek (n)
	Eksiklik Yok (n)	43 (%84,3)	8 (%15,7)
	Eksiklik Var (n)	2 (%28,5)	5 (%71,5)

4.5.1.4.1. Normal kilolu grupta vitamin B12 eksikliği tanısı için ölçüm parametrelerinin karşılaştırmaları.

Normal kilolu grupta yer alan 38 birey ile B12 vitamini eksikliğinin tanısında kullanılan parametrelerin karşılaştırılması için çapraz tablolar hazırlanmıştır. Sonuçlar tablo 25 ve 26’da gösterilmiştir.

Tablo 25 Normal kilolu grupta serum B12 vitamini ölçümü ve metilmalonik asit ölçümünün karşılaştırılması.

Serum B12 vitamini ölçümü		Metilmalonik Asit Ölçümü	
		MMA düzeyi normal ve düşük (n)	MMA düzeyi yüksek (n)
	Eksiklik Yok (n)	19 (%67,8)	9 (%32,2)
	Eksiklik Var (n)	0 (%0)	2 (%100)

Tablo 26 Normal kilolu grupta serum B12 vitamini ölçümü ve homosistein ölçümünün karşılaştırılması.

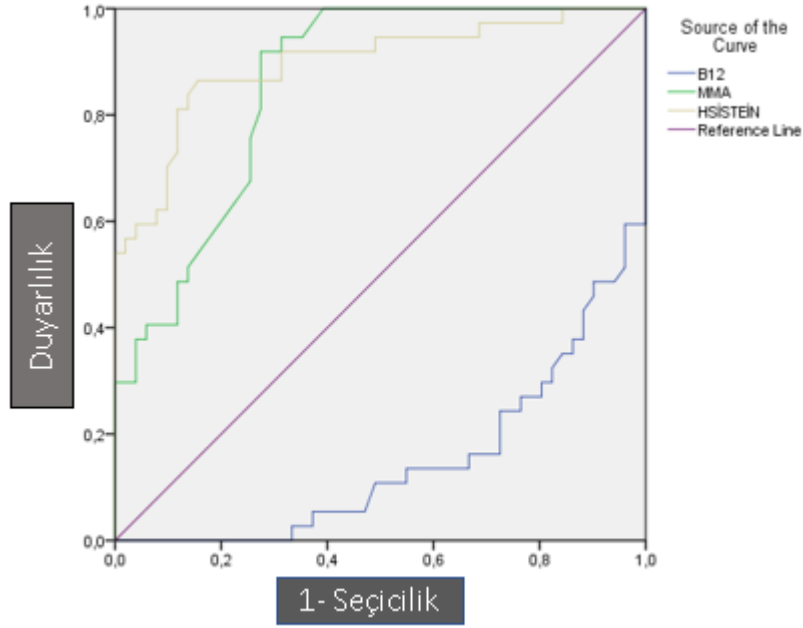
Serum B12 vitamini ölçümü		Homosistein Ölçümü	
		Hcy düzeyi normal ve düşük (n)	Hcy düzeyi yüksek (n)
	Eksiklik Yok (n)	28 (%100)	0 (%0)
	Eksiklik Var (n)	1(%50)	1 (%50)

4.5.1.5 ROC eğrisi

ROC terimi İngilizce 'Receiver Operating Characteristic' sözcüğünün baş harflerinden köken almaktadır. (ROC) eğrisi sağlık araştırmalarında başlıca üç amaç için kullanılır: Tanı testinin ayırt etme gücünün belirlenmesi, çeşitli tanı testlerinin etkinliklerinin kıyaslanması ve uygun kesim noktalarının belirlenmesi. ROC eğrisi dikey eksen üzerinde doğru pozitiflerin (duyarlılık), yatay eksen üzerinde ise yanlış pozitiflerin (1-seçicilik) grafiğe dönüştürülmüş halidir. Eğri üzerinde sol üst köşeye yaklaşıldıkça testin genel doğruluğu artar (149). Bir testin tanı değerinin gücü eğri altında kalan alan ile ifade edilir. Alan değeri 1.0' a yaklaştıkça tanı değeri yükselir.

4.5.1.6. Vitamin B12 eksikliği tanısında ölçüm parametrelerinin ROC analizi ile karşılaştırmaları

Çalışmamızda birleşik B12 değerleri altın standart olarak kabul edilerek, serum B12, MMA ve Hcy karşılaştırıldı (35). Eğri altındaki alan en yüksek Hcy (0,897) olmak üzere, serum B12 için 0,148, MMA için 0,857 olarak belirlendi. (**Şekil 20**).



Şekil.20 ROC eğrisi analizi.

5.TARTIŞMA

Obezite günümüzde prevalansı hızla artan bir hastalıktır. Obez bireylerde düzensiz beslenmeye bağlı olarak sıklıkla birçok vitamin ve mineral eksikliğine rastlanmaktadır. Anemi, nöropsikiyatrik, kardiyovasküler ve gastrointestinal bozukluklara neden olabilen B12 vitamini eksikliği, obez bireylerde daha az protein alımı ve karaciğer yağlanması gibi nedenler ile görülebilmektedir. Çocuklarda obezite prevalansı son kırk yıl içerisinde 10 kat artmıştır (102). Çalışmamızda erken çocukluk yaş grubu yerine ergenlerin seçilmiş olması, bu yaş grubundaki bireylerin çoğunlukla ebeveynlerinin beslenme denetiminden çıkmaları ve mikronütrient eksikliği açısından yüksek risk grubunda olmaları nedeniyle önem arz etmektedir.

B 12 vitamini eksikliği tanısı için klinikte en yaygın kullanılan test serum B12 vitamini düzeyi ölçümüdür. Serum B12 vitamini ölçümü, B12 vitamini eksikliği durumunda önce hücre içi kaynağın kullanılması nedeniyle serum değerlerinin normal sınırlar içinde kalması, "subklinik B12 vitamini eksikliği" olarak adlandırılan gri bölgede tam olarak eksikliği göstermemesi, bağlayıcı proteinler ve intrinsek faktör konsantrasyonlarından etkilenmesi gibi nedenlerle B12 vitamini eksikliği tanısında tek başına yeterli değildir. Son yıllarda vücuttaki B12 durumunu anlamak için "fonksiyonel biyobelirteçler" olan homosistein ve metilmalonik asit düzeyleri aracılığı ile B12 vitamini eksikliği tanısının konulması tercih edilmeye başlanmıştır. Homosistein düzeyi, hem kobalamin hem de folik asit eksikliğinde artış gösterdiği için özgül bir biyobelirteç olarak değerlendirilmemektedir. Ayrıca böbrek fonksiyonlarındaki bozukluklar, tiroid disfonksiyonu ve kardiyovasküler hastalıklarda da yükseldiği gösterilmiştir (53). MMA ise böbrek fonksiyon bozukluklarından etkilenmektedir (129).

MMA ölçümü için kapiller elektroforez, GC-MS, HPLC ve LC-MS/MS gibi farklı analitik yöntemler kullanılmaktadır. Kapiller elektroforez yöntemi düşük analitik verimliliği nedeniyle tercih edilmemektedir (8). GC-MS yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak laboratuvarlar arası çok farklı sonuçların alınması ve düşük verimlilik (saatte 3-6 test) gibi dezavantajlara sahiptir (56). HPLC yönteminde organik bir çözücüde ekstraksiyon ve türevlendirme gerekmesi gibi dezavantajlar bulunmaktadır (7). LC-MS/MS yüksek analiz hızı, düşük test maliyeti, yüksek tekrarlanabilirlik ve doğruluk

oranı ve daha az örnek hacmi gerektirmesi gibi nedenler ile son yıllarda kullanımı giderek artan bir latfordur. Çalışmamızda plazma MMA düzeyi analizleri için yararlandığımız ve internal standart kullanılarak kısa sürede sonuç alınabilen, türevlendirme gerektirmeyen LC-MS/MS-MRM yöntemi (7), literatürdeki türevlendirme basamağına gerek duyulan diğer kütle spektrometrik yöntemlere kıyasla daha avantajlı bulunduğundan tercih edilmiştir.

MMA analizi için yapılan yöntem geçerlilik çalışmalarında, gün içi ve günler arası kesinlik analizleri sonucunda CV değerlerinin % 4'ten küçük bulunması yöntemin tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğu anlamına gelmektedir. Doğruluk analizleri sonucunda bulunan % ± 4 değeri yöntemimizin yüksek doğruluğa sahip olduğunun kanıtıdır. Çalışmamızda belirlenen tespit (0.03 $\mu\text{mol/L}$) ve kantitasyon limitleri (0.06 $\mu\text{mol/L}$) de göz önüne alındığında, sonuç olarak kullandığımız yöntemin uygulanabilir ve güvenilir olduğu ortaya konmuştur.

Obez ve normal kilolu gruplar B12 vitamini düzeyi ile ilgili parametreler açısından karşılaştırıldığında;

Obez ve normal kilolu gruplar arasında serum B12 vitamini ve homosistein düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken, metilmalonik asit düzeyi açısından anlamlı fark tespit edilmesi obez adolesanlarda B12 eksikliği bulunabileceği yönündeki hipotezimizi kısmen doğrular niteliktedir. B12 eksikliği tanısında klasik olarak kullanılan serum B12 vitamini ölçümü açısından obez ve normal kilolu adolesanlar arasında anlamlı fark olmaması serum B12 ölçümü ile ilgili olarak yukarıda belirtilen yöntem kısıtlılıklarından kaynaklanıyor olabilir. Yaptığımız bu çalışmada fonksiyonel biyobelirteçlerden Hcy düzeyi açısından iki grup arasında anlamlı fark olmaması ise, plazma Hcy düzeyinin B12 vitamini eksikliği ile yanı sıra B6 ve B9 vitamini eksikliğinden de etkilenmesi ile açıklanabilir. B12 vitamin eksikliği tanısında bir diğer fonksiyonel biyobelirteç olan MMA ölçümü ile iki grup arasında istatistiksel olarak fark saptanması, obez adolesanlarda B12 vitamini eksikliği bulunabileceğini gösteren önemli bir kanıt olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda fonksiyonel B12 vitamini eksikliğinin tanısında metilmalonik asit ve homosistein düzeylerinin, serum B12 vitamini ölçümüne göre değerinin karşılaştırılması sonucunda her iki grupta da eksikliği en fazla yansıtan parametrenin

MMA olduğu, bunu sırasıyla Hcy ve serum B12 ölçümlerinin izlediği tespit edilmiştir. Çalışmamızda birleşik B12 değeri altın standart olarak kabul edilerek yapılan ROC analizi sonuçları da, MMA ve Hcy analizlerinin serum B12 ölçümüne göre daha yüksek tanı koydurucu değeri olduğunu ortaya koymuştur.

Literatürde obez adölesanlarda B12 vitamini eksikliğini serum B12 düzeyi ölçümü ile ortaya koyan çalışmalar mevcuttur. Ganji ve arkadaşları 1895 obez adölesan üzerinde yaptıkları çalışmada bireylerde birçok mikro-besin maddesinin eksik alındığını göstermişlerdir (151). Yapılan bir diğer çalışmada 228 normal VKİ li adölesandan 5 inde (%2.9) B12 eksikliği saptanırken, 164 obezde 17 (%10.9) B12 si düşük birey saptanmıştır (4). Bizim çalışmamızda da serum B12 ölçümü esas alındığında benzer şekilde obezlerde % 12 oranında düşük bulunmuştur; bu çalışmadan farklı olarak, çalışmamızda ölçülen MMA düzeyleri ile obezlerde %65 e yakın oranda B12 eksikliği varlığını gösterirken Hcy için bu oran % 22.5 dir. Kilo kaybı çalışmasına alınan çocuklarda kilo kaybindan sonra B12 vitaminlerinde yükselme görölmüştür (123). Avusturalya'da 103 obez adölesan ile yapılan bir çalışmada obez adölesanların %7.8 inde B12 eksikliği tespit edilmiş ve normal kilolu adölesanlara göre anlamlı olarak farklı bulunmuştur (122). Hindistan'da 2403 öğrenci ile yapılan bir araştırmada obez adölesanlarda B12 vitamini eksikliği görülenlerin oranı %51.2 iken normal kilolularda bu oran %28 olarak tespit edilmiştir (84).

Bu çalışmaların aksine obez ve normal kilolu adölesanlar arasında B12 vitamini eksikliği açısından anlamlı farkın bulunmadığı çalışmalar da mevcuttur. Brezilya'da 86 obez ve 153 normal kilolu adölesan ile yapılan bir çalışmada, obez ve normal kilolu çocuklar arasında hem B12 hem de homosistein düzeyleri açısından anlamlı bir farkın olmadığı belirlenmiştir (11). Ülkemizde 40 obez ve 20 kontrol ile yapılan bir çalışmada gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır (10). Yunanistan'da 143 obez ve 381 normal kilolu adölesan ile yapılan bir çalışmada anlamlı fark bulunmamıştır (52).

Yapılan literatür incelemesinde obez adölesanlarda B12 durumunun MMA ile değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda obez adölesan grupta serum B12 vitamini düzeyleri fonksiyonel biyobelirteçler olan Hcy ve MMA ile birlikte

ilk kez çalışılmış ve çelişkili sonuçlar alınan bu konuda obez adolesanlarda sağlıklı kontrollere göre MMA düzeylerinin anlamlı olarak yüksek bulunması ile B12 eksikliği gösterilerek literatüre katkı sağlamıştır. Çalışmada olgu ve kontrol gruplarının seçiminde konjenital metil malonik asidüri, böbrek fonksiyon bozukluğu, kronik bir hastalığa bağlı sürekli ilaç kullanımı ve multivitamin desteği alımı gibi MMA yüksekliğine neden olacak durumlara maruz kalan bireyler dışlandığından MMA yüksekliğinin yalnızca B 12 vitamini eksikliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Obez ve normal kilolu gruplar, B12 vitamini düzeyi ile doğrudan ilgili olmayan parametreler açısından karşılaştırıldığında;

Çalışmamızda serum GGT, ALT ve AST düzeylerinin obez grupta normal kilolu gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunması, obezlerin karaciğer fonksiyonlarının da etkilendiğini göstermesi açısından önemli bir bulgudur. Bilindiği gibi karaciğer, kobalaminin depolanması ve biyoyararlanımı sırasında rol alan önemli bir organdır. Obez bireylerde karaciğer yağlanmasına normal bireylere göre daha fazla rastlanmaktadır. Yükselmiş GGT, AST ve ALT değerleri obez bireylerde karaciğer fonksiyonlarında bozulmalar olabileceğine işaret ediyor olabilir. Obez bireylerde nonalkolik karaciğer yağlanması (NAKY) gelişip gelişmediğini anlayabilmek için altın standart olarak karaciğer biyopsisi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Girişimsel olan bu yöntem bu çalışmada uygulanamayacağından hastalarda NAKY olup olmadığı ve yağlanmanın hangi seviyede olduğu ile ilgili bilgi edinilememiştir. Obez adolesanlarda B12 eksikliği göstergesi olarak saptadığımız MMA düzeylerinin yüksekliğinde, bozulmuş karaciğer fonksiyonlarına bağlı kobalamin depolanmasındaki yetersizliliğin de rolü olabilir.

Obez ve kontrol grubunda açlık serum glukozu ve serum total protein düzeyleri açısından saptanan istatistiksel olarak anlamlı farkın, klinik açıdan ihmal edilebilecek kadar küçük bir fark olduğu düşünülmektedir.

B12 vitamini ile ilişkili parametreler ve diğer çalışılan parametreler arasında yapılan korelasyon analizi sonucunda;

Obez grupta MMA ile Hcy arasında orta şiddetli, MMA ile B12 vitamini arasında negatif yönlü ve orta şiddetli korelasyon saptanırken, normal kilolu grupta

B12 vitamini ile MMA ve Hcy arasında negatif yönlü ve zayıf korelasyon saptanmıştır. Bu sonuçlar B12 vitamini eksikliğinde ilgili parametreler arasında beklenen değişiklikleri destekler niteliktedir.

Obez ve normal kilolu gruplar, diğer rutin parametreler ve antropometrik ölçümler açısından değerlendirildiğinde beklenen yönde saptanan korelasyonlar, araştırmamız kapsamında grupların oluşturulması ve biyokimyasal parametrelerin analizinde dikkatli çalışıldığını göstermektedir. Obez grupta, hemoglobin ile hematokrit düzeyleri arasında; AST, ALT ve GGT düzeyleri arasında; ferritin ve hematokrit düzeyleri arasında beklenildiği gibi korelasyonlar saptanmıştır. Total protein düzeyi ile serum GGT ve AST düzeyleri arasında görülen korelasyon karaciğer fonksiyon bozukluklarında total protein düzeylerinin de etkilenmesi ile ilgili olabilir. Beklendiği gibi MMA ile homosistein arasındaki pozitif, B12 vitamini arasında ise negatif yönlü korelasyonlar saptanmıştır. Dikkat çeken bir başka korelasyon ise VKİ ile insülin düzeyleri arasındadır. Gruplar arasında insülin düzeyleri açısından anlamlı fark olmamasına karşın VKİ ile insülin düzeyi arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Normal kilolu grupta da benzer şekilde hematokrit ile hemoglobin, GGT ile AST arasında pozitif korelasyonlar belirlenmiştir. Ek olarak serum AST düzeyleri ile VKİ ve insülin değerleri arasında korelasyon saptanmış ve karaciğer yağlanması bu duruma neden olabileceği düşünülmüştür. Serum B12 vitamini ile homosistein ve metilmalonik asit düzeyleri arasında beklendiği gibi negatif yönlü korelasyon saptanmıştır. Bu durum B12 eksikliğinde fonksiyonel biyobelirteç olarak bu iki parametrenin kullanılabileceği savını destekler nitelikte bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada elde edilen sonuçlar şu şekilde özetlenebilir:

- 1.Obez adölesanlarda normal kilolu olan yaşıtlarına göre B12 vitamini eksikliği görülme olasılığının daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bu durum çalışmanın başlangıcında ortaya attığımız hipotezi doğrular niteliktedir.
2. Serum B12 vitamini ve Hcy düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmazken kütle spektrometrik olarak belirlenen MMA düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmiştir.
3. Obez ve normal kilolu adölesanlarda karaciğer fonksiyon testleri açısından anlamlı fark tespit edilmiştir, bu durumun NAKY ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.
4. Çalışmamız, obez adölesanlarda B12 vitamini eksikliğinin belirlenmesi amacıyla serum B12 vitamini düzeyinin yanı sıra, MMA ve homosistein gibi fonksiyonel biyobelirteçlerin bir arada kullanıldığı ilk çalışmadır.

Çalışmanın bulguları sonucunda sunulan öneriler şu şekilde özetlenmiştir.

1. Subklinik B12 eksikliği düşünülen obez ve sağlıklı adölesanlarda hematolojik ve özellikle geri dönüşümü olmadığı için nörolojik bozukluklar ortaya çıkmadan önce serum B12 vitamini düzeyi yeterli görülmeyip plazma Hcy ve MMA düzeylerine de bakılmalıdır.
2. Kontrol ve obez grupta NAKY olup olmadığı ve derecesi çeşitli nedenlerle saptanamamıştır. Daha sonraki çalışmalarda NAKY açısından katılımcıların değerlendirilmesinin ve MMA yüksekliği ile ilişkisinin ortaya konmasının yararlı olacağı kanaatindeyiz.
3. B12 vitamini eksikliğinde MMA ve Hcy düzeylerinin tanı koydurucu olarak değerinin incelenebilmesi için daha büyük bir evrende çalışılmasının daha güvenilir sonuçlar elde edilebilmesine olanak sağlayacağı düşüncesindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. <http://www.who.int/topics/obesity/en/>
2. Ebbeling CB, Pawlak DB, Ludwig DS. Childhood obesity: public health crisis, common sense cure. *Lancet* 2002;360: 473-82
3. Spiotta RT, Luma GB. Evaluating obesity and cardiovascular risk factors in children and adolescents. *Am Fam Physician* 2008; 78: 1052-8
4. Pinhas O, Doran N, Reichman B. Obese children and adolescents: At risk group for vitamin B12 concentration. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2006;160:933-936
5. Gallistl S, Sudi KM, Erwa W, Aigner R, Borkenstein M. Determinants of homocysteine during weight reduction in obese children and adolescents. *Metabolism* 2001;50: 1220-1223
6. Fedosov SN et al. Combined indicator of vitamin B12 status: modification for missing biomarkers and folate status and recommendations for revised cut-points. *Clin Chem Lab Med.* 2015 Jul;53(8):1215-25.
7. Fu X, Xu YK, Chan P, Pattengale PK. Simple, Fast, and Simultaneous Detection of Plasma Total Homocysteine, Methylmalonic Acid, Methionine, and 2-Methylcitric Acid Using Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (LC/MS/MS). *JIMD Rep.* 2013;10:69-78.
8. Mineva E.M. et al. An LC-MS/MS method for serum methylmalonic acid suitable for monitoring vitamin B12 status in population surveys. *Anal Bioanal Chem.* 2015 ; 407(11): 2955–2964.
9. Mahabir, S. et al. Measures of adiposity and body fat distribution in relation to serum folate levels in postmenopausal women in a feeding study. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2008; 62:644–650.
10. Narin F, Atabek M, Karakukcu M, Narin N et al. The association of plasma homocysteine levels with serum leptin and apolipoprotein B levels in childhood obesity. *Ann. Saudi Med.* 2005;25(3):209-214
11. Brasileiro R.S. et al. Plasma total homocysteine in Brazilian overweight and non-overweight adolescents. *Nutr. Hosp.* 2005; 20: 313-319
12. Scott J.M, Molloy A.M.: The Discovery of Vitamin B12. *Ann Nutr. Metab.* 2012;61:239-245.
13. Kumar S.S., Chouan S.C., Thakur M.S.: Trends in analysis of vitamin B12. *Analytical Biochemistry.* 2010;398:139-146
14. Cheng. Z, Yamamoto H., Bauer C.E.: Cobalamin's surprising function as a photoreceptor. *Trends in biochemical sciences.* 2016;41: 647-650
15. Martens J.H., Barg H., Warren m.j., Jahn D. Microbial production of vitamin B12. *Appl Microbial Biotechnol.* 2002;58:275-285

- 16.** Maheshwari D.G., Chaudhari K.I International Journal of PharmTech Researc. 2014;6; 1180-1188
- 17.** Chen P,Wolf W.R.,Castanheira I.Silva A.S. A LC/UV/Vis method for determination of cyanocobalamin (VB12) in multivitamin dietary supplements with on-line sample clean-up Anal. Methods, 2010; 2, 1171–1175
- 18.** Yoder M.L.,Cole A.G.Walker L.A.Sension R.J. Time-Resolved Spectroscopic Studies of B12 Coenzymes: Influence of Solvent on the Photolysis of AdenosylcobalaminJ. Phys.Chem. B 2001; 105, 12180-12188
- 19.** <http://apjcn.nhri.org.tw/server/info/books-phds/books/foodfacts/html/data/data4e.html>
- 20.** D-A-CH, 2015. Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. 2. Auflage, 1. Ausgabe. Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährung, 215 pp.
- 21.** Nordic Council of Ministers, 2014. Nordic Nutrition Recommendations 2012. Integrating nutrition and physical activity. Copenhagen, Denmark, 627 pp.
- 22.** WHO/FAO (World Health Organization/Food and Agriculture Organization), 2004. Vitamin and mineral requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO expert consultation, Bangkok, Thailand, 21–30 September 1998. 341 pp.
- 23.** WHO/FAO (World Health Organization/Food and Agriculture Organization), 1970. Requirements of ascorbic acid, vitamin D, vitamin B12, folate, and iron. Report of a Joint FAO-WHO Expert Group. World Health Organization Technical Report Series, no 452, 75 pp.
- 24.** Health Council of the Netherlands, 2003. Dietary Reference Intakes: vitamin B6, folic acid, and vitamin B12. Publication no 2003/04, 142 pp.
- 25.** Afssa (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments), 2001. Apports nutritionnels conseillés pour la population française. Editions Tec&Doc, Paris, France, 605 pp.
- 26.** IOM (Institute of Medicine), 1998. Dietary Reference Intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. National Academies Press, Washington DC, USA, 591 pp.
- 27.** SCF (Scientific Committee for Food), 1993. Nutrient and energy intakes for the European Community, 31st series. Food - Science and Technique, Luxembourg, European Commission, 255 pp.
- 28.** DH (Department of Health), 1991. Dietary reference values for food energy and nutrients for the United Kingdom. Report of the Panel on Dietary Reference Values of the Committee on Medical Aspects of Food Policy. HM Stationary Office, London, UK, 212 pp.
- 29.** EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), 2015. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for cobalamin (vitamin B12). EFSA Journal 2015;13(7):4150, 64 pp.

- 30.** Üstdal M ve ark. *Biyokimya*, 1. Baskı, Ankara, Pelikan Yayıncılık, 2005;841-898.
- 31.** Miller SM, Mears M. Nutritional Status Assessment. In: Anderson SC, Cockayne S. *Clinical Chemistry Concept and Applications*. New York: Mc GrawHill, 2003;579-611.
- 32.** C. Robert, L. David Vitamin B12 Deficiency *Am Fam Physician* 2003;67:979-86,993-4.
- 33.** Grasbeck R and Salonen EM. Vitamin B12. *Progress in Food and Nutrition Science*, 1976; 2, 193-231.
- 34.** Hom BL and Olesen HA. Plasma clearance of 57cobalt-labelled vitamin B12 bound in vitro and in vivo to transcobalamin I and II. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 1969;23, 201-211.
- 35.** Vashi P, Edwin P, Popiel B, Lammersfeld C, Gupta D. Methylmalonic Acid and Homocysteine as Indicators of Vitamin B-12 Deficiency in Cancer. *PLoS One*. 2016;25;11(1)
- 36.** Nexø E and Gimsing P. Turnover in humans of iodine- and cobalamin-labeled transcobalamin I and of iodine-labeled albumin. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 1975;35, 391-398.
- 37.** Refsum H, Johnston C, Guttormsen AB and Nexø E. Holotranscobalamin and total transcobalamin in human plasma: determination, determinants, and reference values in healthy adults. *Clinical Chemistry*, 2006; 52, 129-137.
- 38.** Nexø E, Hvas AM, Bleie O, Refsum H, Fedosov SN, Vollset SE, Schneede J, Nordrehaug JE, Ueland PM and Nygard OK,. Holo-transcobalamin is an early marker of changes in cobalamin homeostasis. A randomized placebo-controlled study. *Clinical Chemistry*, 2002;48, 1768-1771.
- 39.** Hardlei TF and Nexø E. A new principle for measurement of cobalamin and corrinoids, used for studies of cobalamin analogs on serum haptocorrin. *Clinical Chemistry*, 2009;55, 1002-1010.
- 40.** Hall CA and Finkler AE. A second vitamin B12-binding substance in human plasma. *Biochimica et Biophysica Acta: Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1963; 78, 234-236.
- 41.** Moestrup SK and Verroust PJ. Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. *Annual Review of Nutrition*, 2001;21, 407-428.
- 42.** Tanpaiboon P. Methylmalonicacidemia. *Mol. Genet Metab* 2005;85:2-6
- 43.** Reizenstein P, Ek G and Matthews CM. Vitamin B-12 kinetics in man. Implications on total-body B12 determinations, human requirements, and normal and pathological cellular B12 uptake. *Physics in Medicine and Biology*, 1966;11, 295-306.
- 44.** Kato N, Narita Y and Kamohara S. Liver vitamin B 12 levels in chronic liver diseases. *Journal of Vitaminology*, 1959; 5, 134-140.

45. Quadros EV. Advances in the understanding of cobalamin assimilation and metabolism. *British Journal of Haematology*, 2010;148, 195-204.
46. Booth MA and Spray GH. Vitamin B12 activity in serum and liver of rats after total gastrectomy. *British Journal of Haematology*, 1960;6, 288-295.
47. Amin S, Spinks T, Ranicar A, Short MD ve ark. Long-term clearance of cyanocobalamin in vegans and pernicious anaemia. *Clinical Science*, 1980;58, 101-103.
48. Boddy K , Adams JF. Excretion of cobalamins and coenzyme B12 following massive parenteral doses. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1968;21, 657-664.
49. Hempen C, Wanschers H, van der Sluijs Veer G. A fast liquid chromatographic tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of total homocysteine and methylmalonic acid. *Anal Bioanal Chem*. 2008 ;391(1):263-70.
50. Birn H. The kidney in vitamin B12 and folate homeostasis: characterization of receptors for tubular uptake of vitamins and carrier proteins. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 2006; 291, F22-36.
51. Reitman A, Friedrich I, Ben-Amotz A, Levy Y. Low plasma antioxidants and normal plasma B-vitamins and homocysteine in patients with severe obesity. *Isr Med Assoc J* 4, 2002;4 590-593
52. Papandreou D, Rousso I, Makedou A, Arvanitidou M, Mavromichalis I. Association of blood pressure obesity and serum homocysteine levels in healthy children *Acta paediatrica* 2007;96 :1819-1823
53. Bjorke Monsen AL and Ueland PM. Cobalamin status in children. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2011;34, 111-119.
54. "Canadian Nutrient File 2016" www.hc-sc.gc.ca/fn-an/nutrition/fiche-nutri-data/index-eng.php 06.06.2017
55. Persichilli S, Gervasoni J, Iavarone F, Zuppi C, et al. A simplified method for the determination of total homocysteine in plasma by electrospray tandem mass spectrometry. *J Sep Sci* 2010;33:3119-24.
56. Windelberg A, Arseth O, Kvalheim G et al. Automated assay for the determination of methylmalonic acid, total homocysteine and related amino acids in human serum or plasma by means of methylcholofomate derivatization and gas chromatography–mass spectrometry. *Clin Chem* 2005; 51:2103–2109
57. Tomaiuolo M, et al. Stable-isotope dilution LC-ESI-MS/MS techniques for the quantification of total homocysteine in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009;877:3292-9.
58. Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol* 2008;4:222.

59. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures, ICHQ2A, Geneva (1995).
60. R. Vanita, L.Sharon, B. Ronald ve ark. Long-Term Metformin use and Vitamin B12 Deficiency in the diabetes prevention program Outcomes Study. J Clin Endocrinol Metab, April 2016;101(4):1754–1761
- 61.http://www.tphd.org.tr/wpcontent/uploads/2017/11/Vitamin_B12_Eksikligi_Olan_Anne_Bebegi_Birol_Baytan.pdf
62. Erdogan E., Nelson G J., Rockwood A.L. Frank E.L. Letter to editör Clinica Chemica Acta (2010) 1827-1829
63. Vieira C, Cosmo C, Lucena R. The importance of methylmalonic acid dosage on the assesment of patients with neurological manifestations following bariatric surgery Obes Surg 2011;21: 1971-1974
64. Srinivas K.V.,Want M.A., Freigoun O.S. ve ark. Methylmalonic acidemia with renal involvement: A case report and review of Literaure Saudi J. Kidney Dis Transplant 2001;12(1):49-53
65. Dikmen M. Homosistein metabolizması ve hastalıklarla ilişkisi. Turkiye Klinikleri J Med Sci 2004, 24:645-52
66. Temel İ, Özerol E. Homosistein metabolizma bozukluğu ve hastalıklarla ilişkisi İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002;9(2) 149-157
67. Çolak A.A.,Anıl M.,Toprak B. ve ark. Çocuklarda B12 vitamin düzeyi ve periferik tam kan sayımı değerleri ile ilişkisi. İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hast. Dergisi 2012; 2(2):75-79
68. Koç A.ve ark. Şanlıurfa yöresinde 9-12 yaş grubu çocuklarda B12 vitamini ve folik asit eksikliği sıklığı ile bağırsak solucanlarıyla ilişkisi. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2005; 48: 308-315
69. Stabler P.S. Vitamin B12 deficiency N.ENG. J. Med 2013;368:149-60
70. İpçioğlu OM ve ark. Reduced urinary excretion of homocysteine could be the reason of elevated plasma homosistein in patients with psychiatric illnesses. Clinical Biochemistry 2008; 10-11: 831-5.
71. Burtis AC, Ashwood RE. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Second Edition. W.B. Saunders Company. 1994; 2046-2054.
72. Demet D, Telci Ş, Dilbaz N, Okay İT. B12 vitamini eksikliğine bağlı psikotik bozukluk. Klinik Psikofarmakoloji Bülteni 2006; 16: 109-13.
73. Şen S.,Durut G.,Atasoy I.Vitamin B12 ve Follik Asit Eksikliğinin Psikiyatrik ve Nörolojik Bozukluklarla ilişkisi. Türk Klinik Biyokimya Derg 2009; 7(1): 31-36

- 74.** McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969;56:111-28.
- 75.** Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, ve ark. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:6369-73.
- 76.** 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;1;67(5):812-9.
- 77.** Kozyraki R, Fyfe J, Kristiansen M, et al. The Intrinsic Factor- Vitamin B12 Receptor, Cubillin, Is A High-Affinity Apolipoprotein A-1 Receptor Facilitating Endocytosis Of High Density Lipoprotein. *Nature Medicine* 1999; 5: 656-661.
- 78.** Babior BM, Bunn HF. Megaloblastic Anemias. In: Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 12th ed. New York: McGraw Hill, 1991: 1523-1529.
- 79.** Wintrobe MM, Lee GR, Boggs DR, et al. Megaloblastic Anemias Disorders Of Impaired DNA Synthesis. In: *Clinical Hematology*. 8th ed. Philadelphia: Lea and Febiger. 1981:559-604.
- 80.** Lee GR, Foerster J, Lukens J, et al: *Wintrobe's clinical Hematology; Pernicious anemia and other causes of vitamin B12 (cobalamin) deficiency*. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, 2004; 947-78.
- 81.** Herrman W. , Geisel J. Vegetarian lifestyle and monitoring vitamin B12 status. *Clinica Chimica Acta*, 2002; 326 47-59
- 82.** Devalia ve ark. Guidelines for the diagnosis and treatment of cobalamin and folate disorders. 2014; 166 496-513
- 83.** Akış M. Sağlıklı ve fenilketonürlü çocuklarda fonksiyonel B12 vitamini eksikliğinin plazma metilmalonik asit ve homosistein düzeyleri ile araştırılması. DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. 2012. İzmir.
- 84.** Li Z, ve ark. Folate and vitamin B12 status is associated with insulin resistance and metabolic syndrome in morbid obesity. *Clin Nutr.* 2017 ;17 30247-9.
- 85.** H.L.Elke, Nexo E. Holotranscobalamin, a marker of vitamin B-12 status: analytical aspects and clinical utility. *Am. J. Clin Nutr*, 2011;3595-3655
- 86.** Chakraborty S, Chopra M, Mani K. Prevalance of vitamin B12 deficiency in healthy Indian school-going adolescents from rural and urban localities and its relationship with various anthropometric indices: a cross-sectional study *J Hum Nutr Diet.* 2018 ;31(4):513-522.
- 87.** Sobczynska-Malefora, A., Gorska, R., Pelisser, M., ve ark. An audit of holotranscobalamin ("Active" B12) and methylmalonic acid assays for the assessment of vitamin B12 status: application in a mixed patient population. *Clinical Biochemistry*, 2014;47, 82–86.

- 88.** Greibe, E., Andreasen, B.H., Lildballe, D.L., Morkbak, A.L., ve ark. Uptake of cobalamin and markers of cobalamin status: a longitudinal study of healthy pregnant women. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2011; 49, 1877–1882.
- 89.** Lindgren A, Kilander A, Bagge E, Nexø E. Holotranscobalamin: a sensitive marker of cobalamin malabsorption. *Eur J Clin Invest* 1999;29:321–9.
- 90.** Lindemans J, Schoester M, van Kappel J. Application of a simple immunoassay for the measurement of saturated and unsaturated transcobalamin II and R-binders. *Clin Chim Acta* 1983;132:53–61.
- 91.** Ulleland M, Eilertsen I, Quadros EV, et al. Direct assay for cobalamin bound to transcobalamin (holo-transcobalamin) in serum. *Clin Chem* 2002;48:526–32.
- 92.** Nexø E, Christensen AL, Hvas AM, Petersen TE, Fedosov SN. Quantification of holo-transcobalamin, a marker of vitamin B12 deficiency. *Clin Chem* 2002;48:561–2.
- 93.** Klee G.G. Cobalamin and Folate Evaluation: Measurement of Methylmalonic Acid and Homocysteine vs Vitamin B12 and Folate *Clin Chem*. 2000;46:1277-1283
- 94.** Çelik C., Yalbuzağaç Ş.A. Obezite ve egzersiz. *Journal of clinical and analytical medicine* .2014;5:244-7
- 95.** Bozbora A. Obezitenin cerrahi tedavisi. *Ankem*:2002;16-3:337-339
- 96.** Tezcan B. Obez bireylerde beden algısı, benlik saygısı ve travmatik geçmiş yaşantılar. Bakırköy E.A.H uzmanlık tezi :2009
- 97.** Alikışifoğlu A, Yordam N. Obezitenin tanımı ve prevalansı. *Katkı Pediatri Dergisi* 2000; 21 (4): 475-481.
- 98.** Yusuf O., Bozbora A. Obezite İstanbul tıp yayınevi 2. Baskı İstanbul.2007
- 99.** Serter R. Obezite Atlası. 1. Baskı, Ankara: Karakter Color, 2003.
- 100.** Akbulut GÇ, Özmen MM, Besler TH. Obezite eki. *Bilim ve Teknik Dergisi* 2007; 3:2-15.
- 101.** http://www.tuik.gov.tr/basinOdasi/haberler/2015_58_20151008.pdf 10.09.2017
- 102.** <http://beslenme.gov.tr/index.php?lang=tr&page=40> 11.09.2017
- 103.** Bereket A, Atay Z. Current status of childhood obesity and its associated morbidities in Turkey. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2012;4: 1-7
- 104.** Türkiye Beslenme Ve Sağlık Araştırması (TBSA) 2010 Saha Uygulaması El Kitabı Ankara, Ocak 2010
- 105.** Süzek H, Arı Z. Muğla'da merkez köylerde yaşayan 6-15 yaş okul çocuklarında kilo fazlalığı ve obezite prevalansı. *Türk Biyokimya Dergisi* 2005; 30: 290-5
- 106.** Lake A, Townshend T. Obesogenic environments: exploring the built and food environments. *J R Soc Promot Health*. 2006;126:262–7.

- 107.** Tanamas SK, Lean MEJ, Combet E, Vlassopoulos A. Ve ark. Changing guards: time to move beyond body mass index for population monitoring of excess adiposity. QJM. 2016;109:443-446.
- 108.** Cinaz P, Bideci A. Obezite. Günöz H, Öcal G, Yordam N, Kurtoğlu S. (editörler). Pediatrik Endokrinoloji. Pediatrik Endokrinoloji ve Oksoloji Derneği Yayınları 2003; 487-505.
- 109.** Drohan, S.H. Managing early childhood obesity in the primary care setting: A behavior modification approach. Pediatric Nursing, 2002; 28, 599-610.
- 110.** Deckelbaum RJ, Williams CL. Childhood obesity: the health issue. ObesRes 2001; 9(Suppl 4): 239-43.
- 111.** Must A, Jacques PF, Dallal GE, Bajema CJ, Dietz WH. Long term morbidity and mortality of overweight adolescents: a follow-up of the Harvard Growth Study of 1922 to 1935. N Eng J Med 1992; 327: 1350-5.
- 112.** Klish, WJ. Comorbidities and complications of obesity in children and adolescents. In: UpToDate, Post TW (Ed), UpToDate, Waltham, MA. Accessed on November 4, 2015.
- 113.** Finke RG, Daikh BE, Fleming PE. The coenzyme B12 derivative N1-methyl-5'-deoxyadenosylcobalamin: synthesis, characterization, stability towards dimroth rearrangement, and Co-C thermolysis product and kinetic studies. J Inorg Biochem. 1998 1;69(1-2):45-57.
- 114.** Özdel O., Varma G.S., Fenkçi S. ve ark. Obez kadınlarda psikiyatrik tanı sıklığı. Klinik psikiyatri 2011;14:210-217
- 115.** Deveci A., Demet M., Özmen B ve ark. Obez hastalarda psikopatoloji, aleksitimi ve benlik saygısı. Anatolian Journal of Psychiatry 2005; 6:84-91
- 116.** Crisp A.H., Mc Guinnes B. Jooly fat: relation between obesity and pshyconeurosis in general populations. British medical journal. 1976;1:7-9
- 117.** Onyike CU, Crum RM, Lee HB ve ark. Is obesity associated with major depression? Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. Am J Epidemiol, 2003; 158: 1139-1147.
- 118.** Hamulu F (1999). Obezite komplikasyonları. (Ed. Tüzün M, Kabalak T, Yılmaz C ve ark.), Obezite ve Tedavisi. I. Basım, Mart Matbaacılık, İstanbul, 152- 57
- 119.** Gray L.A., Alava M.H, Kelly M.P., Campbell M.J. Family lifestyle dynamics and childhood obesity: evidence from the millennium cohort study. BMC Public Health. 2018; 18: 500.
- 120.** Van Wijnen et all. Psychological Health, Suicidal Thoughts, and Suicide Attempts li Dutch Adolescents: Results From The 2003 E-MOVO Project. Obesity (Silver Spring) 2010;18(5): 1059-61.
- 121.** Lam L.T., Yang L. Overweight/obesity and attention deficit and hyperactivity disorder tendency among adolescents in China. İnternational Journal of Obesity 2007;31,584–590

- 122.** Ho M, Halim HJ, Gow ML et al Vitamin B12 in obese adolescents with clinical features of insulin resistance *Nutrients* 2014;6,5611-5618
- 123.** Gallistl S, Sudi KM, Erwa W, Aigner R, Borkenstein M. Determinants of homocysteine during weight reduction in obese children and adolescents *Metabolism* 2001;50: 1220-1223
- 124.** Inge TH, Jenkins TM, Xanthakos SA, Dixon JB, ve ark. Long-term outcomes of bariatric surgery in adolescents with severe obesity (FABS-5+): a prospective follow-up analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017;5(3):165-173.
- 125.** Ganji V, Hampl JS, Betts NM. Race-, gender- and age-specific differences in dietary micronutrient intakes of US children. *Int J Food Sci Nutr.* 2003;54:485-490
- 126.** Kimmons JE, Blanck HM, Tohill BC, Zhang J, Khan LK. Associations between body mass index and the prevalence of low micronutrient levels among US adults. *MedGenMed.* 2006;8(4):59, 19
- 127.** Mares-Perlman JA, Millen AE, Ficek TL, Hankinson SE. The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. Overview. *J Nutr.* 2002; 132:518S–24S.
- 128.** Yılmaz O. Sanatın arketipi olarak anne imgesi. *C.Ü.Sosyal bilimler dergisi*, 2010;34: 47-59
- 129.** Hannibal L, Lysne V, Bjørke-Monsen AL, et al Biomarkers and Algorithms for the Diagnosis of Vitamin B12 Deficiency. *Front Mol Biosci.* 2016 ; 27;3:27.
- 130.** Arthur B., David G. Maurice J. et al The stable isotope dilution method for measurement of methylmalonic acid: a highly accurate approach to the prenatal diagnosis methylmalonic acidemia. *Pediatric res.* 1982;16: 740-745
- 131.** Babidge PJ, Babidge WJ. Determination of methylmalonic acid by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 1994; 1;216(2):424-6.
- 132.** Chen H, Xu Y, Van Lente F et al Indirect ultraviolet detection of biologically relevant organic acids by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1996; 26;679(1-2):49-59.
- 133.** Obeld R. Geisel J., Herrmann W. Comparison of two methods for measuring methylmalonic acid as a marker for vitamin B12 deficiency. *Diagnosis* 2015 ;2(1) 67-72
- 134.** Sánchez A, Rojas P, Basfi-Fer K, et al Micronutrient Deficiencies in Morbidly Obese Women Prior to Bariatric Surgery. *Obes Surg.* 2016 ;26(2):361-8.
- 135.** de Luis DA, Pacheco D, Izaola O, Terroba MC, Cuellar L, Cabezas G. Micronutrient status in morbidly obese women before bariatric surgery. *Surg Obes Relat Dis.* 2013 ;9:323-7.

- 136.** Lefebvre P, Letois F, Sultan A, Nocca D, Mura T, Galtier F. Nutrient deficiencies in patients with obesity considering bariatric surgery: a cross-sectional study. *Surg Obes Relat Dis.* 2014 ;10(3):540-6.
- 137.** Aasheim ET, Hofsø D, Hjelmessaeth J, Birkeland KI, Bøhmer T. Vitamin status in morbidly obese patients: a cross-sectional study. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(2):362-9. Erratum in: *Am J Clin Nutr.* 2010 ;91(1):239-40.
- 138.** Nadler JLet all. Magnesium deficiency produces insulin resistance and increased thromboxane synthesis. *Hypertension.* 1993;21(6 Pt 2):1024–9.
- 139.** Kimmons JE, Blanck HM, Tohill BC, et al. Associations between body mass index and the prevalence of low micronutrient levels among US adults.*MedGenMed.* 2006;19;8(4):59.
- 140.** Ford ES, et all. Homocysteine and cardiovascular disease: a systematic review of the evidence with special emphasis on case-control studies and nested case-control studies. *Int J Epidemiol.* 2002;31:59–70
- 141.** Pinhas-Hamiel O, et all . Greater prevalence of iron deficiency in overweight and obese children and adolescents. *Int J Obes Relat Metab Disord.*2003;27(3):416–8.
- 142.** Nead KGet all M. Overweight children and adolescents: a risk group for iron deficiency. *Pediatrics.* 2004;114(1):104–8
- 143.** Ravina A, Slezak L, Mirsky N, Bryden NA, Anderson RA.Reversal of corticosteroid-induced diabetes mellitus with supplemental chromium. *Diabet Med.* 1999;16(2):164–7
- 144.** Chen MD, Lin PY, Lin WH, Cheng V. Zinc in hair and serum of obese individuals in Taiwan. *Am J Clin Nutr.* 1988;48(5):1307–9.
- 145.** Carrodegua L ve ark. Preoperative thiamine deficiency in obese population undergoing laparoscopic bariatric surgery. *Surg Obes Relat Dis.* 2005;1(6):517–22.
- 146.** Madan AK, Orth WS, Tichansky DS, Ternovits CA. Vitamin and trace mineral levels after laparoscopic gastric bypass. *Obes Surg.* 2006;16(5):603–6.
- 147.** Buffington C, Walker B, Cowan GS Jr, Scruggs D. Vitamin D Deficiency in the Morbidly Obese. *Obes Surg.* 1993;3(4):421–4.
- 148.** Neuhouser ML, et all. Serum concentrations of retinol, alphasatocopherol and the carotenoids are influenced by diet, race and obesity in a sample of healthy adolescents. *J Nutr.* 2001;131(8):2184–91
- 149.** Aksakoğlu G. Sağlıkta araştırma ve çözümleme. İkinci yazım. İzmir. D.E.Ü rektörlük basımevi.2006;91-94

8.EKLER

EK1. ETİK KURUL ONAYI

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2013/40-19	Tarih: 07.11.2013			
Prof.Dr.Hüseyin İŞLEKEL'in sorumlusu olduğu "Obez Adölesanlarda B12 Vitamini Eksikliğinin Serum Metilmalonik Asit ve Homosistein Düzeyleri ile İncelenmesi ve Normal Kilolu Adölesanlarla Karşılaştırılması" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu				
ETİK KURUL ÜYELERİ					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Banu</i>
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Katılacaktır</i>
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Katılacaktır</i>
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Ece Böber</i>
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Hüseyin Baskin</i>
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Vesile Öztürk</i>
Prof.Dr.Bilgin CÖMERT	İç Hastalıkları (Yoğun Bakım B.D)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Bilgin Cömert</i>
Prof.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Katılacaktır</i>
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Ayşe Aydan Özkütük</i>
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Katılacaktır</i>
Doç.Dr.İşıl TEKME	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Doç.Dr.İşıl Tekme</i>
Doç.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Müge Kıray</i>
Doç.Dr.Şeyda Seren İNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E ☐ H ☒	<i>Şeyda Seren İntepeler</i>
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐ H ☒	<i>Ahmet Can Bilgin</i>
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐ H ☒	<i>İhsan Çelikdemir</i>

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

EK 2. OBEZ GRUP İÇİN ONAM FORMU

Obezite (şişmanlık) vücuttaki yağ oranının artması olarak tanımlanabilir. Çocuk ve ergenlerin %25-30'unu etkilemektedir. Obezitenin oluşturduğu sağlık riskleri, onu önemli bir halk sağlığı sorunu olarak ele almamızı gerektirmektedir. Bu risklerin en önemlilerinden biri karaciğer yağlanmasıdır (hepatosteatoz). Karaciğerin ağırlığının %5'inden fazla yağ birikimi olarak tanımlanan bu durum siroza kadar ilerleyen ciddi problemlere yol açabilmektedir.

Bu çalışmaya Çocuk Gastroenteroloji-Hepatoloji ve Metabolizma ünitesinde izlenen ve obezite tanısı almış olan çocuğunuzun katılımı birkaç açıdan önem taşımaktadır: İlk olarak çocuğunuzda obezite ve karaciğer yağlanması bir nedeni olabilecek kitotriosidaz enzim aktivitesi, TNF- α , IL-1 β , interlökin 6, 8, 16, 18 ve hsCRP ve IFN-gama düzeylerini öğrenmiş olacaksınız. İkincisi, uzun vadede hastalığın tedavisinde yeni ilaçların geliştirilmesi yolunu açabilecek bir çalışmanın içinde yer almış olacaksınız. Ancak bu çalışmanın hastanızın tedavisine kısa dönemde etkisinin olmayacağı bilinmelidir.

Bu çalışmada, çocuğunuzdan ilk başvuru sırasında tam kan sayımı ve serum biyokimyası (açlık kan şekeri, karaciğer fonksiyon testleri, kan yağları) için kan örneği istenecektir. Kan sayımı ve serum biyokimyası her obez çocukta ilk başvuru sırasında rutin olarak alınmaktadır. Bu rutin tetkikler ve yukarıda belirtilen hormon ve genetik çalışmalar için toplam 10 mL kan örneği alınacaktır. Kan alınması sabah aç karnına yapılacaktır. Çalışmaya katılım tek kontrolle sınırlıdır ve hastanız hastalığı ve tedavisinin gerektirdiği sıklıkta poliklinik kontrollerine gelmeye devam edecektir, bu çalışma için tekrar çağırılmayacaktır. Kan alınma işlemi sonrasında hastanıza uygulanacak herhangi bir ek işlem bulunmamaktadır.

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

Sizinle birlikte yaklaşık 100 hastanın çalışmaya dâhil edilmesi planlanmaktadır. Hasta bu çalışmaya katılmayı reddetme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Bu çalışmaya katılmanız veya başladıktan sonra herhangi bir safhasında ayrılmanız daha sonraki tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir. Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Bu çalışma sırasında

bakılacak ek parametreler için gerekli olan işlemin masrafı size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.

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

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

Gönüllünün (veli/vasi)

Adı- soyadı:

Telefon:

Adres:

İmzası:

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı- soyadı: Dr. Nur Arslan

Telefon: 0505 525 21 51

İmzası:

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı-soyadı:

Görevi:

İmzası:

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

EK.3 KONTROL GRUBU İÇİN GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Obezite (şişmanlık) vücuttaki yağ oranının artması olarak tanımlanabilir. Çocuk ve ergenlerin %25-30'unu etkilemektedir. Obezitenin oluşturduğu sağlık riskleri, onu önemli bir halk sağlığı sorunu olarak ele almamızı gerektirmektedir. Bu risklerin en önemlilerinden biri karaciğer yağlanmasıdır (hepatosteatoz). Karaciğerin ağırlığının %5'inden fazla yağ birikimi olarak tanımlanan bu durum siroza kadar ilerleyen ciddi problemlere yol açabilmektedir.

Bu çalışmaya sağlıklı çocuk olarak katılmanız birkaç açıdan önem taşımaktadır: İlk olarak çocuğunuzdaki bu yangı maddelerinin düzeylerini öğrenmiş olacaksınız. İkincisi, hasta çocukların kan düzeylerinin düşük ya da yüksek olup olmadığını anlamamız için sizinki gibi sağlıklı çocukların kan düzeyleri ile karşılaştırılması gereklidir.

Bu çalışmada, hastanemiz polikliniklerinde muayene edilen ve herhangi bir tarama için (kan sayımı, tiroid testleri, kan şekeri, hepatit taraması vb.) kan alınması planlanan sağlıklı çocuğunuzdan bu kanlara ek olarak 4 mL kan alınacaktır. Kan alınması sabah aç karnına yapılacak, diğer istenen tetkikler için kan alınırken bu kanlar da alınacaktır. Çalışmaya katılım tek seferle sınırlıdır ve çocuğunuz çalışma için tekrar çağırılmayacaktır. Kan alınma işlemi sonrasında çocuğunuza uygulanacak herhangi bir ek işlem bulunmamaktadır. Kan alma işlemi sırasında kanın damar dışına sızmasına bağlı ciltte morarma ve ağrı olabilir, bu durum çocuğunuz için ciddi bir risk oluşturmayacak; kendiliğinden gerileyecektir. Ayrıca çocuklarda damarların her zaman çok belirgin olmamasından dolayı kan alma işleminin başarısız olma ihtimali mevcuttur, bu durumda işlemin tekrar denemesi gerekebilir. Bunun dışında hastanızın araştırmaya bağlı herhangi bir zarar görmesi söz konusu değildir. Herhangi bir sorunuzun olması halinde bilgi almak için Dr. Nur Arslan ile iletişim kurabilirsiniz. Çocuğunuzun kanları çalışma sonunda imha edilecektir. Sizinle birlikte yaklaşık 50 sağlıklı çocuğun çalışmaya dahil edilmesi planlanmaktadır.

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

Bu çalışmada yer aldığınız süre içerisinde kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul

komitesine ve Sağlık Bakanlığı'na açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır.

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

Gönüllünün (veli/vasi)

Adı- soyadı:

Telefon:

Adres:

İmzası:

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı- soyadı: Dr. Nur Arslan

Telefon: 0505 525 21 51

İmzası:

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı-soyadı:

Görevi:

İmzası:

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

EK 4. ÖZGEÇMİŞ



RECEP TURAN

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası

63043154826

Doğum Tarihi

28/12/1981

İletişim Adresi

BUCA SEYFİ DEMİRİSOY DEVLET HASTANESİ BİYOKİMYA LABORATUVARI ÖZMEN

Telefon

(232) 452 52 52

(232) 452 52 52

(505) 705 31 25

E-posta

recepturan@windowslive.com

Web Adresi

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Ocak 2001 - Şu Anda (18 yıl 3 ay) (Tam Zamanlı)
TEKNİK PERSONEL, DİĞER (Sağlık Bakanlığı)

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

TÜRKÇE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)