

**T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**VİTAMİN B12 EKSİKLİĞİNDE  
GİRELİN GEN POLİMORFİZMİ**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. Önder GÜN**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Saadet AKARSU**

**ELAZIĞ  
2012**

## **DEKANLIK ONAYI**

Prof. Dr. İrfan ORHAN

**DEKAN**

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Erdal YILMAZ

**Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı**

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Saadet AKARSU

**Danışman**

**Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri**

.....	_____
.....	_____
.....	_____
.....	_____
.....	_____

## TEŞEKKÜR

Tezimin her aŐamasında desteğini ve yardımını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Saadet AKARSU'ya, uzmanlık eğitimim boyunca her konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Erdal YILMAZ'a ve bÖlüm hocalarıma teşekkür ve saygılarımı sunarım. Tez hastalarımın takiplerinde yardımları olan araştırma görevlisi arkadaşlarıma, örneklerin çalıŐılmasındaki katkılarından dolayı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Ebru Önalın ETEM'e, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Süleyman AYDIN'a ve tüm yaşamım boyunca bana destek olan ve fedakarlıkta bulunan aileme, eŐime ve oğluma teşekkür ediyorum.

## ÖZET

Vitamin B12 insan organizması tarafından sentezlenemez. Esas olarak deoksi ribonükleik asit (DNA) ve myelin sentezinde gereklidir. Vitamin B12 eksikliği insidansı toplumdan topluma, değişik yaş guruplarına, sosyoekonomik düzeye ve beslenme alışkanlıklarına göre farklılık gösterir. Toplumda eksikliğinin %3 ile %40 arasında olduğunun anlaşılmasıyla, vitamin B12'ye olan ilgi artmıştır. Dünyanın yoksul bölgelerinde, özellikle kırsal bölge çocuklarında beslenme yetersizliğine bağlı vitamin B12 eksikliği sıklığının %22-66 gibi yüksek bir orandadır. Türkiye'de 7-17 yaş grubunda çocukta %5.9 oranında saptanmıştır.

Bu çalışmayla vitamin B12 eksikliği olanlarda girelin düzeyi ve girelin gen polimorfizmi değerlendirildi. Aynı ailede aynı beslenenlerden kiminde vitamin B12 eksikliğine bağlı bulgular görülürken bazılarında bu bulgular görülmemektedir. Bu nedenle girelin genindeki bir polimorfizmin bunu başlatabileceği düşünüldü. Eksikliğe yol açmadan önce gerekli vitamin B12 desteğinin yapılması ve gerekli tedbirlerin alınması amaçlandı.

Girelin geninde DNA dizileme kullanılarak pek çok farklı tek nükleotid polimorfizmi tespit edilmiştir. Bunlardan en önemlileri promoter -501 A/C, Arg51Gln, Leu72Met ve Gln90Leu'dır.

Çalışmamızda 27 kız (%47.4) ve 30 erkek (%52.6) olmak üzere toplam 42 vitamin B12 eksikliği tanılı olgu ve 19 kız (%45.2) ve 23 erkek (%54.8) olmak üzere toplam 42 sağlıklı kontrol grubu değerlendirildi. Açıl girelin değerleri; hasta grubunda  $14.5 \pm 10.0$  pg/ml ve kontrol grubunda  $24.2 \pm 14.2$  pg/ml olarak bulundu. Hasta ile kontrol grubunun açıl girelin değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p < 0.05$ ). Deaçil girelin hasta grubunda  $242.3 \pm 206$  pg/ml ve kontrol grubunda  $394.0 \pm 170$  pg/ml olarak bulundu. Hasta grubu ile kontrol grubunun deaçil girelin değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p < 0.05$ ).

Hasta ve kontrol grubunda girelin genindeki -501 promoter, Arg51Gln, Leu72Met ve Gln90Leu polimorfizmleri çalışıldı. Girelin genindeki -501 A/C polimorfizmi açısından CC genotipi hasta grubunda artmış sıklıkta saptandı ( $p < 0.05$ ). Promoter -501 A/C polimorfizmi için aleller sıklıkları kontrolle farklı bulunmadı ( $p > 0.05$ ). Gln90Leu polimorfizmi için hasta grubunda heterozigot Gln/Leu genotipinin artmış sıklıkta olduğu tespi edildi ( $p < 0.05$ ). Gln90Leu polimorfizmi için aleller sıklıkları

kontrolle farklı bulunmadı ( $p>0.05$ ). Arg51Gln ve Leu72Met polimorfizmleri için genotip ve allel sıklıkları kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı ( $p>0.05$ ). Anlamlı istatistik saptanan hastalarda vitamin B12 düzeyi 200 pg/ml'nin altındaydı.

Girelin geninin vitamin B12 eksikliği'nin immünogenetiğinde önemli rolleri olabileceğini düşünmekteyiz. Bu gende yer alan diğer polimorfizmlerin hastalığa katkı sağlayıp sağlamadığının belirlenmesi için gerek Türk populasyonunda gerekse diğer populasyonlarda yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatindeyiz.

Girelin genindeki artmış promoter -501 ve heterozigot Gln/Leu varyant sıklığının vitamin B12 eksikliği etyopatogenezinde rol oynayan mekanizmalardan biri olabileceğini düşünmekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** vitamin B12 eksikliği, girelin, gen polimorfizmi

## ABSTRACT

### **GHRELIN GENE POLYMORPHISM IN VITAMIN B12 DEFICIENCY**

Vitamin B12 is a vitamin which can not be synthesized from the human organism. Mainly it's required for the synthesis of DNA (deoxyribonucleic acid) and myelin. The incidence of vitamin B12 deficiency is variable from society to society in different groups, socioeconomic level and eating habits. When the community realised vitamin B12 deficiency incidence is %3 to %40, B12 interest is increased. The world's poorest regions, particularly in rural regions children's from malnutrition the frequency of vitamin B12 deficiency is known to be as high as 22-66%. 7-17 age group of 960 children in Turkey, it was identified % 5.9.

With this study ghrelin values and ghrelin gene polymorphism are evaluated in vitamin B12 deficient patients. In same dietary equal family some members shows signs of vitamin B12 deficiency some does not. So this may be the cause of ghrelin gene polymorphism. Before vitb12 deficiency occurs, Vitamin B12 supp and getting necessary precautions are aimed.

In different studies using DNA sequencing many different uninnucleotide polymorphism are identified in ghrelin gene. Most important ones are promotor -501 A/C, Arg51Gln, Leu72Met and Gln90Leu.

In our study 27 female and 30 male vitamin B12 deficient 42 patients, 19 female and 23 male 42 healthy controls are evaluated. Achyl ghrelin values are found  $14.5 \pm 10.0$  pg/ml in patient group and  $24.2 \pm 14.2$  pg/ml in control group achyl ghrelin values are found statistically significant between patient and control group ( $p < 0.05$ ). Deachyl ghrelin is found  $242.3 \pm 206$  pg/ml in patient group and  $394.0 \pm 170$  pg/ml in control group. Deachyl ghrelin values are found statistically significant between patient and control group ( $p < 0.05$ ). In patient and control group -501 A/C polymorphism are studied. Statistically -501 A/C polymorphism in ghrelin gene as CC genotype is found increased frequency in patient group ( $p < 0.05$ ). For promotor -501 A/C polymorphism allele frequency is not found significant ( $p > 0.05$ ). For Gln90Leu polymorphism in group heterozygot Gln/Leu genotype is found in increased frequency ( $p < 0.05$ ). For Gln90leu polymorphism allele frequencies are not found significant in control group ( $p > 0.05$ ). For Arg51Gln and Leu72Met polymorphisms when genotype and allele frequencies are compared

no significant difference is found ( $p>0.05$ ). Statistically significant in patients with vitamin B12 levels 200 pg/ml under.

We think ghrelin gene may have an important role in Vitamin B12 deficiency's immunogenetics. We believe new studies should be done in Turkish population or in other populations to determine whether other polymorphisms provide support for the disease or not.

We think increased promoter -501 and heterozygote Gln/Leu variant frequency in ghrelin gene plays an important role in Vitamin B12 deficiency etiopathogenesis.

**Keywords:** vitamin B12 deficiency, ghrelin, gene polymorphism

## İÇİNDEKİLER

<b>BAŞLIK SAYFASI</b>	<b>i</b>
<b>ONAY SAYFASI</b>	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>iii</b>
<b>ÖZET</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>viii</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>xi</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>xii</b>
<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b>	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Genel Bilgiler	2
1.1.1. Vitamin B12	2
1.1.1.1. Vitamin B12 Tanımı ve Tarihçesi	2
1.1.1.2. Vitamin B12 Molekül Yapısı ve Genel Özellikleri	3
1.1.1.3. Besinsel Kaynaklar	4
1.1.1.4. Vitamin B12 Gereksinimi	5
1.1.1.5. Vitamin B12'nin Biyokimyasal Özellikleri	5
1.1.1.6. Vitamin B12'nin Fizyolojik Önemi ve Fonksiyonu	7
1.1.1.7. Vitamin B12 Bağlayıcı Proteinler	9
1.1.1.8. Vitamin B12'nin Emilimi	10
1.1.1.9. Vitamin B12'lerin Dokuya Taşınması	11
1.1.1.10. Çocuklarda Vitamin B12 Eksiklik Nedenleri	11
1.1.1.11. Yenidoğanda ve Süt Çocuklarında Vitamin B12 Eksikliği	11
1.1.1.12. Vitamin B12 Eksikliğinin Bulguları	13
1.1.1.13. Vitamin B12 Eksikliğinin Tanısı	15
1.1.1.14. Vitamin B12 eksikliğinin tedavisi	17
1.1.2. Girelin	18
1.1.2.1. Girelin Gen Ürünlerinin Sentezi ve Yapısı	19
1.1.2.2. Girelin ve Türevlerinin Doku Dağılımı	20

1.1.2.3. Dolaşımdaki Girelin Gen Ürünü Peptidler	20
1.1.2.4. Girelin Gen Ürünlerinin Etki Mekanizması	20
1.1.2.4.1 Girelin Reseptörleri ve Etki Mekanizması	20
1.1.2.4.2. Büyüme Hormonu Salgılatıcılar (GHS)'lar ve Girelinin Sinyal Yolları	21
1.1.2.5. Girelin Gen Ürünlerinin Etkileri	21
1.1.2.5.1. Büyüme Hormonu (GH) Sekresyonu	21
1.1.2.5.2. İştah ve Vücut Ağırlığı	22
1.1.2.5.3. Metabolizma	22
1.1.2.5.4. Isı üzerine etkisi	23
1.1.2.5.5. Girelin ve Hastalıklar	23
1.1.2.6. Girelin Gen Polimorfizmi	24
<b>2. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>27</b>
2.1. Hasta ve Kontrol grubu	27
2.2. Girelin	28
2.2.1. Girelin gen polimorfizmi	28
2.3. Polimorfizm Tayininde Kullanılan Gereçler	28
2.4. Polimorfizm Tayininde Kullanılan Kimyasallar	29
2.5. Polimorfizm Tayininde Kullanılan Çözeltiler	29
2.6. DNA İzolasyon İşlemi	30
2.6.1. Kullanılan Solüsyon ve Gereçler	30
2.6.2. İzolasyon Aşamaları	30
2.6.3. DNA Konsantrasyonu ve Saflık Derecesinin Ölçülmesi	31
2.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Çalışması	31
2.7.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Materyalleri	31
2.7.2. Restriksiyon Enzimleri	32
2.7.3. Polimorfizmlerin PZR ve Restriksiyon Enzim Fragment Uzunluk Polimorfizmi Yöntemiyle Belirlenmesi	32
2.7.3.1. Arg51Gln ve Leu72Met Polimorfizmlerinin Çalışılması	32
2.7.3.2. Gln90Leu Polimorfizminin Çalışılması	32
2.7.3.3. 501 A/C Polimorfizminin Çalışılması	32
2.7.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Kurulması İşlemi	33

2.7.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Koşulları	33
2.8. Agaroz Jel Elektroforezi	33
2.9. Etik Kurul İzni ve Bilgilendirilmiş Onam	34
2.10. İstatistiksel Değerlendirme	34
<b>3. BULGULAR</b>	<b>35</b>
3.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Demografik özellikleri	35
3.2. Hasta ve Kontrol Grubunda Hematolojik Değerler	35
3.3. Vitamin B12 Eksikliği ve Kontrol Grubu Olguların Açıl Girelin, Deaçil Girelin Değerleri	37
3.4. Hasta ve Kontrol Grubunda Girelin Gen Polimorfizm Sıklıkları	39
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>43</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b>	<b>53</b>
<b>6. EKLER</b>	<b>65</b>
<b>7. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>70</b>

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Günlük önerilen vitamin B12 alım miktarı	5
<b>Tablo 2.</b> Çocuklarda Vitamin B12 Eksiklik Nedenleri	12
<b>Tablo 3.</b> Girelin gen ürünlerinin diğer organ ve sistemler üzerine etkisi	25
<b>Tablo 4.</b> Olguların demografik özellikleri	35
<b>Tablo 5.</b> Çalışma ve kontrol gruplarında cinsiyet dağılımı	35
<b>Tablo 6.</b> Hasta ve kontrol grubunda hemotolojik değerler	37
<b>Tablo 7.</b> Hasta ve kontrol grubunda açıl girelin ve deaçil girelin değerleri	38
<b>Tablo 8.</b> Hasta ve kontrol grubunda girelin promoter A/C polimorfizm genotiplerinin dağılımı	39
<b>Tablo 9.</b> Hasta ve kontrol grubunda girelin Arg51Gln polimorfizm genotiplerinin dağılımı	40
<b>Tablo 10.</b> Hasta ve kontrol grubunda girelin Leu72Met polimorfizm genotiplerinin dağılımı	41
<b>Tablo 11.</b> Hasta ve kontrol grubunda girelin Gln90Leu polimorfizm genotiplerinin dağılımı	42

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 1.</b>	Vitamin B12 bağımlı metiyonin sentaz enzimiyle metiyonin ve TH4-folat oluşumu	6
<b>Şekil 2.</b>	Girelinin 28 aminoasitlik moleküler yapısı	19
<b>Şekil 3.</b>	Girelin geninin genom yapısı ve önemli polimorfizmleri	26
<b>Şekil 4.</b>	Hasta ve kontrol grubunda açıl ve deaçıl girelin değerleri	38
<b>Şekil 5.</b>	-501 A/C promoter polimorfizmi için PZR'ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü.	39
<b>Şekil 6.</b>	Hasta ve kontrol grubunda girelin promoter A/C polimorfizm enotiplerinin dağılımı	39
<b>Şekil 7.</b>	Arg51Gln polimorfizmi için PZR'ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü.	40
<b>Şekil 8.</b>	Hasta ve kontrol grubunda girelin Arg51Gln polimorfizm genotiplerinin dağılımı	40
<b>Şekil 9.</b>	Leu72Met polimorfizmi için PZR'ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü.	41
<b>Şekil 10.</b>	Hasta ve kontrol grubunda girelin Leu72Met polimorfizm genotiplerinin dağılımı	41
<b>Şekil 11.</b>	Gln90Leu polimorfizmi için PZR'ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü	42
<b>Şekil 12.</b>	Hasta ve kontrol grubunda girelin Gln90Leu polimorfizm genotiplerinin dağılımı	42

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>AdoCbl</b>	: Adenozilkobalamin
<b>AGRP</b>	: İştah ilişkili protein (=Agouti-related protein)
<b>ARC</b>	: Arkuat nükleus (=Arcuate nucleus)
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>CBC</b>	: Tam kan sayımı
<b>Cbl</b>	: Kobalamin
<b>CN</b>	: Siyanür
<b>CNCbl</b>	: Siyanokobalamin
<b>Co</b>	: Kobalt
<b>DEA</b>	: Demir eksikliği anemisi
<b>dTMP</b>	: Deoksi timidin mono fosfat
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>dUMP</b>	: Deoksi uridin mono fosfat
<b>EDTA</b>	: Etilen diamin tetraasetik asit
<b>ELİSA</b>	: Enzyme-linked immunosorbant assay
<b>EtBr</b>	: Etidium bromüd
<b>Fe</b>	: Demir
<b>F</b>	: Ferritin
<b>fL</b>	: Femtolitre
<b>GH</b>	: Büyüme hormonu (=Growth hormon)
<b>GHRP-6</b>	: Büyüme hormonu salgılatıcı peptit-6 (=Growth hormon releasing peptid-6)
<b>GPCR</b>	: G protein ilişkili reseptör (=G protein-coupled receptors)
<b>GHS</b>	: Büyüme hormon salgılatıcı (=Growth hormone-secreting)
<b>GHS-R</b>	: Büyüme hormon salgılatıcı reseptör (=Growth hormone secretagogue receptor)
<b>Hb</b>	: Hemoglobin
<b>Hct</b>	: Hematokrit
<b>IGF-1</b>	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (=Insulin-like Growth Factor-1)

<b>İF</b>	: İntrensik faktör
<b>İM</b>	: İntramuskuler
<b>LDL</b>	: Düşük dansiteli lipoprotein
<b>MMA</b>	: Metilmalonik asit
<b>MCH</b>	: alama eritrosit hemoglobini
<b>MCV</b>	: alama eritrosit hacmi
<b>MeCbl</b>	: Metilkobalamin
<b>µgr</b>	: Microgram
<b>mRNA</b>	: Mesajcı ribonükleik asit
<b>NPY</b>	: Noropeptid Y
<b>Nd</b>	: Bilinmiyor
<b>OHCbl</b>	: Hidroksikobalamin
<b>PZR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>RDW</b>	: Eritrosit dağılım genişliği
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>SAH</b>	: S-Adenozil homosistein
<b>SAM</b>	: S-Adenozil metiyonin
<b>SC</b>	: Subkutan
<b>SD</b>	: Standart sapma
<b>SPSS</b>	: Statistical package for social sciences
<b>sTfR</b>	: Solubl transferin reseptörü (=Soluble transferrin receptor)
<b>TBE</b>	: Tris-borik asit-EDTA tamponu
<b>TDBK</b>	: Total Demir Bağlama Kapasitesi
<b>TH4</b>	: Tetrahidro
<b>THF</b>	: Tetrahidrofolat
<b>TCI</b>	: Transkobalamin I
<b>TCII</b>	: Transkobalamin II
<b>TCIII</b>	: Transkobalamin III
<b>WBC</b>	: Beyaz küre sayısı

## 1. GİRİŞ

Vitamin B12 suda eriyen, başlıca mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve çeşitli türevleri bulunan bir vitamindir. İnsan vitamin B12'yi sentez edemez. Vitamin B12 besinlerdeki (özellikle hayvansal gıdalarda) kobalaminlerden elde edilir. En fazla hayvan karaciğerinde bulunur. Hayvansal gıdaların çoğunda yeterli miktarda bulunduğundan, normal beslenenlerde diyet kaynaklı eksiklik nadirdir. Diyetle yetersiz alımı eksikliğinin önemli bir sebebidir (1).

En önemli fonksiyonu, hücrelerin bölünmesi ve çoğalması için gerekli olan DNA sentezini sağlamaktır. Eksikliğinde özellikle hızlı büyüyen ve hücre yenilenmesi hızlı olan dokular etkilenir. Büyüme ve gelişmenin en hızlı olduğu çocukluk çağında bu eksikliğe bağlı sorunların daha ciddi olacağı aşikardır (1).

Toplumda eksikliği %3 ile %40 arasındadır (2). Dünyanın yoksul bölgelerinde, özellikle kırsal bölge çocuklarında beslenme yetersizliğine bağlı vitamin B12 eksikliği sıklığının %22-66 gibi yüksek bir oranda olduğu bilinmektedir (3). Sosyoekonomik düzeyi düşük olan ve paraziter enfeksiyonların sık olduğu Şanlıurfa'da vitamin B12 eksikliği sıklığı doğumdan hemen önceki günlerde gebe kadınlarda %72.3 ve yenidoğan bebeklerde %41.2 olarak bulunmuştur, Anne ve bebek serum vitamin B12 düzeyi arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır (4). Türkiye'de 7-17 yaş grubunda vitamin B12 eksikliği %5.9 oranında saptanmıştır (5).

Vitamin B12 eksikliği çocuklarda halsizlik, yorgunluk, stomatit, ishal veya irritabilite gibi spesifik olmayan klinik bulgular verir. Geç tanı konulmuş olgularda ağır anemi ile birlikte gelişme geriliği, mental ve motor gerilik, ataksi, paresteziler, hiporefleksi, klonus, kazanılmış mental ve motor fonksiyonların (yürüme, oturma, konuşma, gülme gibi) kaybı ve ileri dönemde koma görülebilir (1, 6). Hastaların %25'den daha fazlasında hematolojik bulgu olmadan nörolojik bulgular aya çıkabilir (7).

Vitamin B12 eksikliğinin iyi bilinen hematolojik ve nörolojik (demyelinizasyon) etkilerinin yanında, DNA zedelenmesi ve kanser, koroner hastalığı, Alzheimer hastalığı, miyelodisplastik sendrom, nöral tüp defekti, sipina bifida ve hipertansiyon gibi bir çok hastalık ile lipid peroksidasyonu etyolojisinde suçlanmaktadır (8, 9). Vitamin B12'nin oksidan veya antioksidan özelliği

konusunda güçlü deliller bulunmamakla beraber, indirek olarak homosistein düzeyini düşürerek antioksidan etki göstermektedir. Vitamin B12 eksikliğinin, çocuk yaş grubunda oksidan-antioksidan sistem üzerine etkileriyle ilgili çalışmalar sınırlıdır (10).

Vitamin B12 eksikliğinin klinik özelliklerinden birisi iştah kaybıdır ve beslenme vitamin B12 eksikliğinde büyük rol oynar. Girelin iştah ve yiyecek alımını uyarır. İştahın beyin tarafından kontrol edildiği ve yeme davranışının santral sinir sistemi (SSS)'nde hipotalamusta yer alan belli bölgelerde karmaşık bir mekanizma ile düzenlendiği kabul edilir. Hipotalamus arkuat nükleusunda iştah düzenlenmesinde rol alan girelin içeren nöronlar saptanmıştır. Bu lokalizasyon ile girelin yemek alımını kontrol eder. Gıda alımını uyarır (11, 12). Nutrisyonel anemilerden biri olan DEA'de girelin düzeyi düşük saptanmıştır. Girelin düzeyindeki düşme iştah azalması ve pika sebebi olabilir (13). Vitamin B12 eksikliğinde bir nutrisyonel anemi olup iştah azalır (1). Bu azalmanın nedeni girelin düzeyinde bir azalma ile ilgili olabilir. Daha önceden vitamin B12 eksikliğinde girelin düzeyi çalışılmamıştır. Çalışmamızda vitamin B12 eksikliğinde girelin düzeyi çalışıldı. Girelin düzeyi normal olsa dahi gende meydana gelen bir polimorfizm olabilir mi sorusuna cevap verilmesi istendi.

Düşük vitamin B12 düzeyi erken teşhis edilip tedavi edilirse kalıcı bir hasar oluşmadan söz konusu sorunların engellenmesi mümkündür. Bu çalışmayla vitamin B12 eksikliği olanlarda girelin düzeyi ve girelin gen polimorfizmi değerlendirilecektir. Aynı ailede benzer beslenenlerden bazılarında vitamin B12 eksikliğine bağlı bulgular görülürken diğerlerinde bu bulgular görülmemektedir. Bu nedenle girelin genindeki bir polimorfizmin bunu başlatabileceği düşünülmüştür. Çalışmanın amacı vitamin B12 eksikliği ile girelin gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi belirlemektir.

## **1.1. Genel Bilgiler**

### **1.1.1. Vitamin B12**

#### **1.1.1.1. Vitamin B12 Tanımı ve Tarihçesi**

Vitamin B12 suda eriyen, 1355.42 dalton moleküller ağırlığı olan, başlıca mikroorganizmalar tarafından, farklı yirmi enzimatik basamak sonunda sentezlenebilen, kırmızı renkli ve çeşitli türevleri bulunan bir vitamindir. Yapısında

karmaşık korrin halkası ve merkezde kobalt iyonu vardır. Tüm vitaminler içerisinde en büyük ve kompleks yapıya sahip olan ve çok ufak miktarları ile etki yapması yönünden en güçlü etkinlik gösteren vitamin olarak kabul edilir (14).

### **1.1.1.2. Vitamin B12 Molekül Yapısı ve Genel Özellikleri**

Vitamin B12 molekülü üç bölümden oluşur.

1. Korrin halka yapısı: Bir adet kobalt (Co) atomu ve onu çevreleyen indirgenmiş dört adet pirol halkasından oluşan çekirdek kısmıdır. Korrin adı verilen bu yapı hemoglobinin porfirin halka yapısına benzemektedir. Korrin halkasının merkezindeki kobalt +1 değerlikli ise koenzim yeşil renkli, kobalt +2 değerlikli ise koenzim pakal renkli ve kobalt +3 değerlikli ise koenzim kırmızı renklidir. Korrin kısmı 5-aminolevulinik asitten hemoglobindeki porfirinin sentezine benzer bir şekilde sentezlenmektedir. Simetrik ve karmaşık yapısı ile hemoglobini andırır. Hemoglobinde merkezde yer alan demir yerine vitamin B12'de kobalt vardır (14).
2. İkinci kısım düzlemin altında kalan hem kobalt atomuna ve hem de fosfatlı bir zincir aracılığı ile pirol halkalarından birine bağlı olan nükleotid grubudur. Bu grup tipik bir nükleotid değildir ve N-glikozidik bağı ile riboza bağlanmış bazik bir madde olarak 5,6- dimetilbenzimidazol içerir (14).
3. Düzlemin üstünde ise koordinasyon tipi bağlarla bağlanmış olan ufak ek (R) grubu bulunmaktadır. Ancak vitamin etkisi için bu son grup şart olmamakla beraber vitamin B12 isimlendirilmesi bu gruba göre yapılmaktadır. Bu gruptan yoksun olan kısma kobalaminler adı verilir. Bu sözcük giderek artan bir şekilde vitamin B12 ile eş anlamlı olarak kullanılmaktadır (14).

Bu son ek kısmına göre B12 vitamini dört gruba ayrılır

- a. Siyanokobalamin (CNCbl): R grubu olarak siyanür (CN) grubu içerir. İlk bulunan vitamin B12 türüdür. Vücut sıvılarında ve hücrelerde çok az bulunur. Stabil bir bileşik olduğundan ilaç olarak kullanılır ve vitamin B12 ticari preparatıdır.
- b. Hidroksikobalamin (OHCbl): R grubu olarak hidroksil (OH) grubu içerir. Gıdalarda ve vücutta en fazla tutulan vitamin B12 türüdür. Fakat ilaç olarak kullanıldığında transkobalamin-hidroksikobalamin (TC-OHCbl) kompleksine karşı antikor geliştiği gösterilmiştir. Aktif koenzim türlerinin prekürsörüdür.

- c. Adenozilkobalamin (AdoCbl): R grubu olarak 5'-deoksiadenozil grubu içerir. Hücrelerde aktif koenzim fonksiyonu görür.
- d. Metilkobalamin (MeCbl): R grubu olarak metil (CH<sub>3</sub>) grubu içerir. İnsan plazmasındaki B12 vitamininin %70'i MeCbl şeklindedir. AdoCbl gibi vücutta aktif koenzim fonksiyonu görür.

CNCbl ve OHCbl hücre sitoplazmasında MeCbl'e ve mitokondrilerde AdoCbl'e kolaylıkla dönüştürülür. Sitoplazmik redüktaz enzimi Cbl-Co<sup>+3</sup>'ün Cbl-Co<sup>+2</sup>'ye ve mitokondrial kobalamin redüktaz enzimi Cbl-Co<sup>+2</sup>'nin, Cbl-Co<sup>+1</sup>'e indirgenmesini sağlar (14, 15).

### 1.1.1.3. Besinsel Kaynaklar

İnsanda kalın bağırsakta bakteriler tarafından vitamin B12 sentez edilir. Fakat absorbe olamaz. İnsan ince bağırsağında da bakteriler tarafından bir miktar vitamin B12 sentez edilir ve emilebilir. Buna rağmen sentez edilen ve emilen miktar değişen intestinal floraya bağlı olarak çok az ve yetersizdir. İnsanlar için vitamin B12 en önemli kaynakları karaciğer, glandüler dokular, kırmızı et, yumurta, peynir ve süt gibi hayvansal gıdalardır. Gıdalarda vitamin B12 konsantrasyonu en fazla karaciğer ve böbrekte bulunur. Her birinin 100 gramı 100 µg vitamin B12 ihtiva eder. Deniz ürünlerinde de vitamin B12 bulunmaktadır. Baklagil türleri hariç, bitkisel besinlerde normal olarak vitamin B12 bulunmaz (16).

Gıdaların çoğunda vitamin B12 peptid bağları aracılığıyla proteinlere bağlı olup, nötral ve asidik amda ısıya dayanıklıdır ve besinin ısıtılması sonucu fazla kaybolmaz. İlaç olarak kullanılan vitamin B12 "Streptomyces griseus" türü mantar kültürlerinden izolasyon yoluyla elde edilir (15).

Anne serumu ile anne sütündeki vitamin B12 düzeyleri arasında güçlü bir korelasyon vardır. Anne sütünde alama 0.2-1.0 µg/L vitamin B12 bulunur. MeCbl anne serumunda olduğu gibi, benzer oranda anne sütünde en fazla bulunan temel kobalamindir. İnek sütünde en çok AdoCbl bulunur. Kurutulduktan sonra geriye sadece OHCbl kalır (17, 18).

İnsan için gerekli olan vitamin B12'nin hepsi hayvansal gıdalardan sağlandığından, diyetle yetersiz alımı eksikliğinin önemli bir sebebidir. Farklı toplumlarda diyetle alınması gereken vitamin B12 miktarı ve diyetle bağlı vitamin

B12 eksikliği sıklığı çok iyi tespit edilmemiştir. Birçok ülkede yetişkinlerde alınan vitamin B12 alımı 1 µg/günden daha azdır (19).

#### 1.1.1.4 Vitamin B12 Gereksinimi

Vitamin B12 için alınması gereken günlük miktarlar yaş gruplarına göre Tablo 1’de verildi. Komplike pernisiyöz anemisi olmayan hastalara, vitamin B12 0.1 µg/gün kadar çok az miktarı bile parenteral verildiğinde minimal hematopoetik cevap oluşacaktır. Bu miktar eksikliğin bütün bulgu ve semptomlarını önler ve normal sınırlar içinde vitamin B12 serum seviyelerinin devamını sağlar. Fakat 0.1 µg’ın emilimini garanti altına almak için ağız yoluyla daha fazla vitamin B12 alımı gereklidir (19).

**Tablo 1.** Günlük önerilen vitamin B12 alım miktarı (19).

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

Bu konsantrasyonlar için önerilen temel alımlara ilaveten 2 µg günlük vitamin B12 alınması gerekir. Plasebo kontrollü doz-cevap şeklindeki çalışmada genç erişkinlerde genomik stabilite için günlük folik asid alımının 700 µg/gün ve vitamin B12 alımının 7 µg/gün olması gerektiği gösterilmiştir (20). Bu da önerilen miktarların çok üzerindedir.

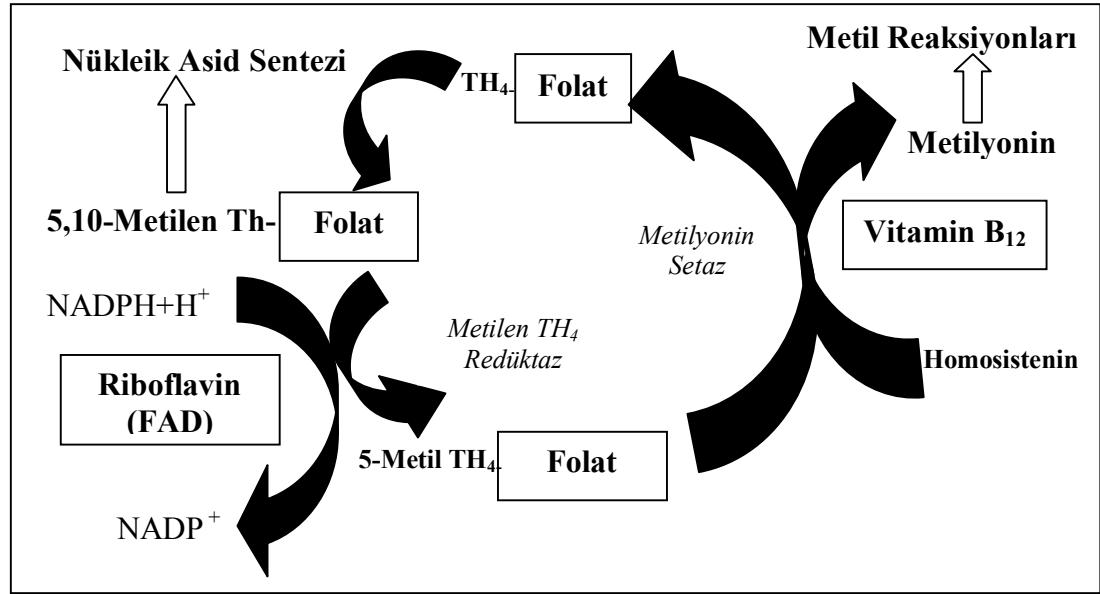
#### 1.1.1.5. Vitamin B12’nin Biyokimyasal Özellikleri

Koenzim olarak fonksiyon gösteren vitamin B12 bileşiklerinin hücre içinde sentezi için birkaç enzimatik reaksiyon gereklidir (21). Plazmadaki vitamin B12 bileşiklerinde kobalt atomu +3 değerlik durumunda ve stabildir. Kobalaminler aktif koenzim haline gelmeden önce labil olan +2 veya +1 değerlik durumuna

indirgenmelidir. Bu intraselüler değişimin konjenital defektleri homosisteinüri ve metilmalonik asidüri ye yol açar (14).

Vitamin B12 insanlarda iki reaksiyonda koenzim görevi görür.

**I. Reaksiyon:** "Metionin sentaz" enzimi aracılığıyla homosisteinden metionin aminoasiti sentez edilir. Sitoplazmada gerçekleşen bu reaksiyon için koenzim olarak MeCbl gereklidir. Bu reaksiyonda aynı zamanda folat koenzimi 5-metiltetrahydrofolat da gereklidir (Şekil 1).



**Şekil 1.** Vitamin B12 bağımlı metionin sentaz enzimiyle metionin ve TH4-folat oluşumu (1).

Bu reaksiyon insanlarda metioninin tekrar sentezi için ana yoldur. Bu reaksiyon bozulduğu zaman metioninin plazma seviyeleri düşer ve buna bağlı olarak gelişme geriliği oluşur. Hem folat hem de vitamin B12 eksikliğinde bu reaksiyon kesintiye uğradığından megaloblastik anemi ile sonuçlanabilecek ciddi bozukluklar aya çıkar (1).

Plazmadaki metionin membran transp sistemi aracılığıyla hücre içine ve serebrospinal sıvıya geçer. Hücresel metionin "Metionin ATP-L-metionin S-adenosiltransferaz" enzimi aracılığıyla adenozenlenir ve S-adenozilmetionin (SAM) meydana gelir. S-adenozilmetionin, Birçok reaksiyonda metil grup vericisidir. Fosfatidilkolin, myelin, melatonin, katekolaminler, DNA ve RNA sentezinde fonksiyon görür. Metil grubu bırakıldıktan sonra S-adenozilhomosistein (SAH) oluşur. S-adenozilhomosistein, "S-adenozilhomosistein hidrolaz" enzimi

tarafından homosistein ve adenosine hidrolize edilir. Daha sonra homosistein; metionin sentaz enzimi tarafından tekrar metionine dönüştürülebilir (remetilasyon). Metionin sentaz enzim aktivitesi için bir koenzim olarak enzime bağlanan MeCbl gereklidir (1)

**II. Reaksiyon:** Propiyonat katabolizmasında bir basamaktır. Burada metilmalonil CoA'nın süksinil CoA'ya dönüşümü gerçekleşir. Bu reaksiyonu "metilmalonil CoA mutaz" enzimi katalize eder ve 5-deoksi AdoCbl koenzim olarak gereklidir. Bu reaksiyon mitokondride gerçekleşir ve sadece AdoCbl koenzim fonksiyonu görür. Vitamin B12 eksikliğine bağlı bu yolun hasarlanması ile plazmada ve idrarda metilmalonik asit (MMA) seviyeleri artar (Şekil 4). MMA artışı vitamin B12 eksikliği için hassas ve özgül bir belirleyicidir (1).

Vitamin B12 bağımlı her iki reaksiyon iki tane toksik materyalin plazma seviyelerini düşürür. Bunlar:

1. Homosistein
2. Metilmalonil CoA'dır (1) .

#### **1.1.1.6. Vitamini B12'nin Fizyolojik Önemi ve Fonksiyonu**

Vitamin B12'nin en önemli fonksiyonu hücrelerin bölünmesi ve çoğalması için gerekli olan DNA yapımını sağlamaktır. DNA yapımı üzerine etkisi TH<sub>4</sub>-folat üzerinden olur. Vitamin B12 eksikliğine en duyarlı olan sistemler hücre çoğalma hızının en yüksek olduğu hematopoetik ve gastrointestinal sistemleridir.

İkinci önemli etkisi, santral sinir sistemi ve periferik sinir sistemindeki bazı nöronların normal yapı ve fonksiyonlarını sürdürmelerini sağlamasıdır.

Hematolojik ve nörolojik etkilerin birbirinden bağımsız olduğu düşünülmektedir. Bunu destekleyen başlıca bulgular;

Pernisöz anemi ve vitamin B12 eksikliğine bağlı megaloblastik anemi olgularında anemi ile birlikte her zaman nörolojik bozukluk bulunmaz. Nörolojik sendrom bazen belirgin hematolojik bozukluk olmadan da meydana gelebilir.

1. İki tür bozukluğun birlikte bulunduğu olgularda bunların şiddeti arasında genellikle bir paralellik yoktur.
2. Folik asit verildiğinde, vitamin B12 eksikliğine bağlı anemilerde hematolojik bozukluk düzeldiği halde nörolojik bozukluk genellikle düzelmez, hatta bazen kötüleşebilir (1).

Folik asidin etkin şekli olan tetrahidrofolattan (THF) hücre içinde sentez edilen THF türevleri, DNA sentezi ve purin ve pirimidin bazlarının sentezi için gerekli tek karbon ekleme reaksiyonlarını gerçekleştirirler. Bu türevlerin sentezi, vitamin B12'nin aktif koenzim şekli olan MeCbl aracılığı ile yapılır. Metiltetrahidrofolat'ın tek karbon donörü olan diğer türevlere, diğer adıyla folat kofaktörlerine (5,10-metilentetrahidrofolat ve benzeri gibi) dönüşebilmesi için önce metil grubunu kaybederek tetrahidrofolat haline getirilmesi gerekir. Bu olay homosistenin'in metionine dönüştürülmesi olayına kenetli olarak gerçekleşir. Bu reaksiyona "metionin sentaz" reaksiyonu adı verilir. Folat kofaktörleri belirli bir düzene göre (folik asit kofaktörleri siklusu) birbirlerine ve sonunda THF'a dönüşürler. Bu siklus, DNA yapımı için gerekli timidilatın sentezi, DNA purin ve pirimidin bazlarının sentezi ve serinden gilsin oluşumu reaksiyonlarına kenetlenmiş bir şekilde sürdürülür (1).

Vitamin B12 eksikliğinde, folatın etkin formu olan THF hücre içinde azalırken, tetrahidrofolatın metilkobalamin tarafından metillenmesiyle oluşan ve yaşamsal önemi olan folat kofaktörlerine dönüşmeyen metiltetrahidrofolat formu ise hücre içinde birikir. Bu olaya "metilfolat tuzağı" adı verilir. Bunun sonucu folat kofaktörleri siklusu ve ona kenetli DNA sentezine yönelik reaksiyonlar yavaşlar veya durur. Bu durum kemik iliğindeki megaloblastik değişikliğin temelini teşkil eder. Eritrosit prekürsörü ana hücrelerde çekirdeklerin bölünmesi yavaşlarsa da sitoplazmanın olgunlaşma hızı bozulmaz. Sonuçta anormal yapılı büyük hücreler oluşur ve normoblastların yerini alır (megaloblastik eritropoez). Bu arada bazı hücreler parçalanır ve ölür (inefektif eritropoez) (22).

Vitamin B12 eksikliği sonucunda metil TH4-metilen TH4 dönüşümü olmaması sonucu dUMP nin dTMP ye dönüşümü gerçekleşmemektedir. Bu da folat eksikliğinde olduğu gibi DNA içinde urasil birikimine ve yanlış yapılanmaya neden olmaktadır (23). Her iki vitamin eksikliğinde ise sinerjik olarak hasar artmaktadır (24). DNA'nın aksine RNA sentezi için timidilat'ın sentezi gerekli değildir (25).

### 1.1.1.7. Vitamin B12 Bağlayıcı Proteinler

1. **İntrinsik Faktör (İF):** İnsan mide fundus mukozasının pariyetal hücrelerinde sentez edilir. Isıya dayanaksız ve alkali amda stabil olan bir glikoproteindir.

Özelikle vitamin B12'ye bağlanmadığı zaman asit PH'da peptik sindirime hassastır. Vitamin B12 varlığında monomer formundan dimer formuna geçer ve hızlı bir şekilde vitamin B12'yi bağlar. Her 1 mg'ı yaklaşık 30 µg vitamin B12 bağlar. Günlük sekrete edilen miktar 40-80 µg vitamin B12 bağlamak için yeterlidir. Cbl-İF kompleksi ince bağırsak lümeninde emilir. Geni 11. kromozom üzerine lokalizedir (1).

2. **Transkobalamin-II (TCII):** İnce bağırsak hücrelerinden veya depolardan vitamin B12'yi alıp, kullanan dokulara taşımada hizmet eder. Fibroblastlar, makrofajlar, enterositler, hepatositler, dalak, kalp, böbrek hücreleri, mide mukozası ve endotelyum gibi farklı hücrelerde sentez edilen ve glikolize olmamış bir proteindir. Plazmada, serebrospinal ve seminal sıvılarda bulunur. Vitamin B12'ye bağlandığı zaman kendi kendine veya diğer proteinler ile polimerize olur. Plazma turnover (dönüşümü) çok hızlıdır. Vitamin B12 aktivitesi olmayan korrin analogları için afinitesi çok düşüktür. Plazmada TCII'ye hem MeCbl hem de AdCbl bağlanırken, TCI'e sadece MeCbl bağlanır (26, 27).

3. **Haptokorrinler:** TCO, TCI, TCIII, R-bağlayıcı protein ve kobalofilin olarak adlandırılırlar. Haptokorrinler, farklı derecelerde glikozile olmuş, benzer yapıli glikoproteinlerdir. Bunlar myeloid hücreler ve olası diğer birçok hücre tarafından sentez edilir. En önemli kaynağı granüositlerdir. Haptokorrinler; plazma, safra, tükürük, gözyaşı, anne sütü, amnion sıvısı, seminal sıvı gibi bir çok sekresyonda ve granüositler, trombositler, tükürük bezleri ve hepatoma hücrelerinde mevcuttur. Plazmada vitamin B12'lerin %70-90'ı haptokorrinlere bağlanır. Haptokorrinler vitamin B12 bağlayıcı proteinlerin tamamı arasında vitamin B12'ye en büyük afiniteyi gösterir. Ek olarak haptokorrinler vitamin B12 aktivitesinden yoksun diğer korrinlere bağlanma için daha yüksek afiniteye sahiptirler.

Transkobalamin I çoğunlukla MeCbl olmak üzere vitamin B12'ler ile %80-90 doygunluk durumundadır. Plazmadaki vitamin B12'nin çoğundan kobalamin bağlayan TCI sorumludur (1, 28).

Besin ile alınan aktif kobalaminler ve kobalamin analogları haptokorrinler tarafından sıkıca bağlanır ve en sonunda karaciğere taşınırlar. Bunların bir kısmı safra ile sekrete edilir. Gerçek kobalaminler İF'e bağlanarak bağırsaktan tekrar emilir, analogları ise atılır. Haptokorrinler aynı zamanda vitamin B12'nin üriner atılımını azaltarak depolama ve koruma fonksiyonuna hizmet eder (28, 29).

#### **1.1.1.8. Vitamin B12'nin Emilimi**

Gıdalardaki vitamin B12'nin emilimi ve sindirimi oldukça kompleks bir süreç sonunda gerçekleşir. Proteine bağlı olmayan vitamin B12 ağızda dilaltında emilebilir. Asıl besin kaynağı olan hayvansal gıdalarla alındığı zaman vitamin B12 proteine bağlıdır ve dilaltında emilemez. Hayvansal gıdadaki vitamin B12'lerin emilimi beş basamakta tamamlanır (27).

1. Gıdalardaki proteine bağlı vitamin B12'ler midede gastrik asit, pepsin ve proteazlar aracılığıyla serbestleşir. Bu süreç vitamin B12 emilimi için esastır. Atrofik gastritte vitamin serbestleşemez.
2. Mide ve tükürük sekresyonunda mevcut R-bağlayıcı protein serbest vitamin B12 ve analoglarını bağlar. Midede kobalamin-R-bağlayıcı protein kompleksi oluşur.
3. Kobalamin-R-bağlayıcı protein kompleksi duodenuma ulaştığında duodenumun alkali ortamında pankreatik enzimler aracılığıyla R-bağlayıcı protein sindirime uğrattılır ve serbestleşen kobalamin (aktif kobalamin) gastrik glikoprotein olan İF'e bağlanır. İnaktif kobalamin analogları İF'e bağlanamaz.
4. Vitamin B12-İF kompleksi terminal ileumda mukozal hücrelerin mikrovillüs membranlarının üzerindeki spesifik İF-B12 reseptörlerine bağlanır. Bu reseptöre bağlanma sürecinde 6,4-8,4 arasında PH ve divalent katyonlar (kalsiyum) gereklidir.
5. Vitamin B12 -İF kompleksi endositoz ile hücre içine alınır, vitamin B12 bazal membrandan kan dolaşımına geçer ve TCII proteinine bağlanır. Kısmen bozulan İF ise salınır.

İleal İF-Cbl reseptörü dağılımı bireylerde değişiklik gösterir. İnce bağırsakta bir seferde reseptöre bağlanabilen İF-Cbl kompleksinin maksimum miktarı yaklaşık 1,5 µg'dır. Kobalaminlerin fizyolojik emilimi için İF'e bağlanmaları gerekir. İF'e bağlandığı zaman diyetle alınan kobalaminlerin %70'i emilir. İF yokluğunda hastalara fazla miktarda vitamin B12 (100-1000 µg ağız yolundan verildiği zaman basit diffüzyon gibi olası spesifik olmayan mekanizma aracılığı ile düşük oranda (% 0.1-% 1) ince bağırsaktan emilir (1).

#### **1.1.1.9. Vitamin B12'lerin Dokuya Taşınması**

Plazmaya geçen vitamin B12 iki farklı proteine bağlanır. Bu taşıyıcı proteinlerden biri TCII dir. TCII ince bağırsak hücrelerinden veya vücuttaki depolardan vitamin B12 gereksinimi olan dokulara vitamin B12 taşınmasını hızlı bir şekilde sağlar. Bu dokuların hücreleri TCII-Cbl kompleksi için reseptör taşır. Böylesi fizyolojik önemine rağmen TCII plazmada total vitamin B12 yalnızca yaklaşık %10-30'unu bağlar. Geriye kalan vitamin B12'ler haptokorrinlere, özellikle TCI'e bağlıdır (27).

#### **1.1.1.10. Çocuklarda Vitamin B12 Eksiklik Nedenleri**

Çocuklarda vitamin B12 eksikliğinin sebepleri üç grupta incelenebilir. Bunlar yetersiz alım, emilim defekti ve konjenital transp ve metabolizma bozukluklarıdır.

#### **1.1.1.11. Yenidoğanda ve Süt Çocuklarında Vitamin B12 Eksikliği**

Yetişkinlerde normalde 2-3 mg vitamin B12 deposu vardır. Normal vitamin B12 deposuna sahip annenin yenidoğan bebeği 25 µg vitamin B12 deposuna sahipken, vitamin B12 eksikliği mevcut anneden doğan bebeğin vitamin B12 deposu yaklaşık 3-5 µg'dır. Kolostrum ve/veya yaşamın ilk hafta sütü daha sonraki sütlerden çok daha fazla miktarda vitamin B12 ihtiva eder. Anne sütündeki vitamin B12 miktarı, annedeki serum vitamin B12 ile doğru orantılıdır. Doğumda yenidoğan bebeğin vitamin B12 depoları eksik olsa da, yaşamın en az birkaç haftası için yeterlidir (28).

**Tablo 2. Çocuklarda Vitamin B12 Eksiklik Nedenleri (1, 4, 16)**

---

**A. Vitamin B12'nin Yetersiz Alınması.**

---

1. Diyeter eksiklik: Katı vejeteryanlık, makrobiyotik diyet, yetersiz beslenme.
  2. Annedeki eksiklik: Bebeklik döneminde vitamin B12 eksikliğinin en önemli nedeni annedeki vitamin B12 eksikliğidir. Vitamin B12 eksikliği olan annelerden doğan bebeklerde, hem doğum öncesinde plasenta yoluyla hem de doğum sonrası anne sütü ile vitamin B12 alımı yetersiz olduğundan, bebeklerde erken dönemde vitamin B12 eksikliği görülür.
  3. Kötü diyet uygulamaları: iyi yönlendirilmemiş fenilketonüri diyeti, uygun olmayan kötü diyet, vb.
- 

**B. Vitamin B12'nin Emilim Defekti.**

---

1. İntrinsik faktör yokluğu veya fonksiyon bozukluğu
    - a. Konjenital pernisiyöz anemi (doğumsal İF eksikliği ve/veya fonksiyon bozukluğu)
    - b. Mide rezeksiyonu (parsiyel/total)
    - c. Otoimmün juvenil pernisiyöz anemi
    - d. Kostik madde alımı (koroziv gastrit)
    - e. Atrofik gastrit
  2. Azalmış mide asit salgısı: Mide asit salgısını azaltan ilaçların uzun süreli kullanımı
  3. Pankreas yetmezliği.
  4. İnce bağırsakta vitamin B12 için kullanım yarışması
    - a. Bakterilerin aşırı çoğalması (ince bağırsak divertikülü, kör bağırsak sendromu, anastomozlar, fistüller, aklorhidri )
    - b. Parazit enfeksiyonu ( Diphilobothrium latum, Giardia intestinalis, Hymenolepsis nana )
  5. İleumdan emilimin bozulması
    - a. Tropikal ve nontropikal sprue
    - b. İleumu ilgilendiren cerrahi girişimler veya bypass
    - c. Anormal ileal reseptörler (İmerslund - Grasbeck hastalığı)
    - d. İnfiltratif hastalıklar (Whipple sendromu, Lenfoma, Liposarkom)
    - e. İleum tüberkülozu
    - f. Emilimi azaltan ilaçlar ( Kolsişin, PAS, Neomisin, Metformin)
    - g. Megaloblastik anemiye sekonder gelişim mukoza hasarı
    - h. Zollinger Ellison sendromu
    - i. Helikobakter pylori enfeksiyonu
    - j. Regional enterit.
- 

**C. Vitamin B12 Transp Defektleri ve Metabolizma Bozuklukları.**

---

1. Transp defektleri
    - a. TCII eksikliği
    - b. R-bağlayıcı protein eksikliği
  2. Metabolizma bozuklukları
    - a. Konjenital
      1. AdoCbl eksikliği: cblA ve cblB hastalığı
      2. MeCbl eksikliği: cblE ve cblG hastalığı
      3. Kombine AdoCbl ve MeCbl eksikliği: cblC, cblD ve cblF hastalığı
      4. Metilmalonil CoA mutaz eksikliği
    - b. Edinsel
      1. Nitrik oksitte maruz kalma
      2. Karaciğer hastalıkları
      3. Protein-enerji malnütrasyonu
-

Yeterli vitamin B12 deposu ile doğan sağlıklı süt çocuklarında serum vitamin B12 seviyeleri 6. aya doğru azalır ve ek gıda almaya başladıktan sonra serum vitamin B12 seviyeleri tekrar artar. Fakat ek gıda alımı gecikirse veya başlanmaz ise 6. aydan sonra vitamin B12 eksikliğinin oluşma riski artar (4).

Beyin gelişiminin ve myelinizasyonunun en hızlı olduğu dönem doğumdan önceki son üç ay ve doğumdan sonraki ilk 3-6 aydır. Eğer annede vitamin B12 yetersiz ise bebekte vitamin B12 eksikliği daha erken gelişir. Vitamin B12 eksikliği olan anne bebeğinin son trimesterdeki miyelinizasyonu yavaş olacağından doğumda serebral atrofi veya hipoplazi olabilir. Doğumu takip eden ilk bir yıl miyelinizasyon oldukça hızlıdır. Vitamin B12 deposu eksik olarak doğanlarda bu miyelinizasyon yavaşlamaktadır (4). Vitamin B12 eksikliği erken dönemde teşhis edilip, tedavi edilmez ise süt çocuklarında kalıcı nörolojik hasara neden olabilir (29-31).

Süt çocuklarında bazen anemi ve makrositoz olmayabilir veya değişebilir derecede pansitopeni mevcut olabilir. Kemik iliğinde belirgin megaloblastik değişiklikler görülmeyebilir. Tanı; düşük serum vitamin B12 seviyesi, diğer destekleyici testler, tedaviye cevap, annenin vitamin B12 durumu ve diyetin araştırılması ile konabilir (1).

#### **1.1.1.12. Vitamin B12 Eksikliğinin Bulguları**

Çocuklarda vitamin B12 eksikliği halsizlik, yorgunluk, stomatit, gelişme geriliği veya irritabilite gibi spesifik olmayan klinik bulgular ile aya çıkar. En fazla etkilenen dokular, hızlı proliferasyon olan hematolojik ve intestinal sistemlerdir. Ayrıca nörolojik semptomlar da görülür (1).

**Hematolojik Bulgular:** Genellikle nötropeni ve trombositopeninin eşlik ettiği şiddetli makrositik anemi oluşur. Ortalama eritrosit hacmi ( MCV) ve ortalama eritrosit hemoglobin'i (MCH) artmıştır, periferik yaymada hipersegmente nötrofiller ve oval makrositler mevcut olup, kemik iliği hiperselülerdir. Aneminin başlangıcı gizli ve yavaştır. Çoğunlukla halsizlik, zayıflama ve iştahsızlık dışında asemptomatikdirler. Anemiye bağlı kalp yetmezliği aya çıkabilir. Aynı zamanda pozisyona veya aktiviteye bağlı solunum yetersizliği oluşabilir (25).

**Gastrointestinal Bulgular:** Bazı hastalarda anemi ve nörolojik semptomlar oldukça hafiftir ve ana semptomlar gastrointestinal bulgulardır. Bu semptomlar

iştahsızlık (%14-65), hafif kilo kaybı (%5-10), bulantı, kabızlık, periyodik ishal (%7-50), glossit ve pamukçukdan oluşur. Pernisiyöz anemili hastaların yaklaşık %50'sinde kırmızı, ağırlı anormal dil olduğu ve anemi olmasa da bu semptomların oluşabildiği bildirilmiştir (32).

**Nörolojik Bulgular:** Sinir sistemi tutulumu derecesi ile aneminin şiddeti arasında bir ilişki yoktur. Anemi olmadan vitamin B12 eksikliği tespit edilen hastaların %25'inden daha fazlasında nörolojik bulgular saptanmıştır. Nörolojik semptom ve bulguların ana nedeni sinir hücrelerindeki ilerleyici demiyelinizasyondur.

Vitamin B12 eksikliğine bağlı nörolojik hasar üç ana teoriyle açıklanmıştır.

- a. Vitamin B12 eksikliğinde SAM dönüşecek metioninin sentez edilememesidir. SAM, myelinin bir parçası olan fosfatidilkolinin (birçok sinirden izole edilebilen yağ asidi materyali) üretimi için gereklidir (26, 33).
- b. Metilmalonil CoA'nın (üç karbonlu molekül), süksinil CoA'ya (dört karbonlu molekül) dönüşümünde eksiklik Propiyonil CoA (üç karbonlu molekül) ve metilmalonil CoA'nın (üç karbonlu molekül) birikmesi ile sonuçlanır. Metilmalonil CoA yağ asidi sentezinde malonil CoA'nın kompetitif inhibitörüdür. Yağ asitleri normal olarak numaralanmış karbon molekülüne ikişer karbon eklenerek meydana gelir. Yağ asidi sentezinde malonil CoA yerine metilmalonil CoA geçtiğinde yani üç karbonlu moleküllerin eklenmesiyle olağan olmayan 15 veya 17 karbonlu aşırı miktarda anormal dallı zincirli yağ asitleri sentezlenir ve bu anormal yağ asitleri sinir hücrelerinin zarında yapısal değişikliklere neden olur (34).
- c. Vitamin B12 eksikliğinde dokularda dengesiz bir şekilde oluşan sitokinler, tümör nekrozis faktör ve epidermal büyüme faktörü gibi hormon benzeri moleküller aracılığıyla sinirlerde hasar oluşur (35).

Yetişkinlerde spinal kordun subakut kombine dejenerasyonu görülürken (azalmış vibrasyon ve pozisyon duyusu), süt çocuklarında diffüz serebral atrofi görülür. Beyinde myelinizasyonun en hızlı olduğu dönem son trimester ve yaşamın ilk bir yılıdır. Bu dönem aynı zamanda beyin volüm ve ağırlığının hızlı artma zamanıdır. İnfantil vitamin B12 eksikliği, glial hücrelerin çoğalmasında azalma ve olağan olmayan uzun zincirli yağ asitlerinin artmasına bağlı olarak myelin sentez

ve bütünlüğünün bozulması ile sonuçlanır. Sonuçta süt çocuklarında vitamin B12 eksikliğinin sinir sistemindeki patolojik değişkenleri olan demiyelinizasyon, aksonal dejenerasyon ve nöronal ölüm sırasıyla gerçekleşerek sinir fonksiyonlarının bozulmasına yol açar. Bu durum letarjiye, kooperasyon bozukluğuna, anormal visüel evoket potensiyel (VEP), vibrasyon ve pozisyon duyu bozukluğuna, mental ve motor gelişme geriliğine, baş tutma, gülümseme, konuşma, oturma ve yürüme gibi kazanılmış mental ve motor fonksiyonların kaybına, konvülsiyona ve ileri dönemde komaya neden olur (36).

#### **1.1.1.13. Vitamin B12 Eksikliğinin Tanısı**

Anamnezde bebeğin beslenme şekli, ek gıdaya başlama zamanı ve annenin beslenme şekli öğrenilmeli, ayrıca cerrahi müdahale, hastalık ve parazit olup olmadığı araştırılmalıdır. Tam kan sayımı, kemik iliği incelemesi, serum vitamin B12 düzeyi, total homosistein düzeyi ve metilmalonik asit düzeyi ile vitamin B12 eksikliği tanısı konulduktan sonra etiyojisine yönelik çalışmalar yapılmalıdır.

**Tam Kan Sayımı:** Makrositik anemi görülebilir. Genellikle makrositik anemiye nötropeni ve trombositopeni eşlik eder. MCV ve MCH artmıştır. Vitamin B12 eksikliği ile birlikte demir eksikliği anemisi, kronik inflamatuvar hastalık anemisi veya talasemi hastalığı mevcut ise MCV'deki artma maskelenebilir (27).

**Periferik Yayma:** Anizositoz, poikilositoz ve fragmentasyonlu oval makrositik eritrositler ve hipersegmente nötrofiller görülür. Makrositoz kliniği hafif olan vakalar için çok duyarlı veya spesifik bir bulgu değildir. Howell-jolly cisimcikleri ve normoblastlar görülebilir. Nötrofil hipersegmentasyonu iyi yapılmış periferik yaymada, 100 segmentli nötrofil arasında beş loblu 5 veya daha fazla nötrofil veya altı loblu 1 veya daha fazla nötrofil mevcudiyeti olarak tanımlanır (1)

**Kemik İliği İncelemesi:** Kemik iliği hiperselülerdir ve genellikle her üç seri elemanlarında megaloblastik değişiklikler görülür. Eritroid seride hiperplazi ve geç dönemde nukleuslu megaloblastik eritrositler, dev metamyelositler ve band'lar, artmış hipersegmente ve büyük megakaryositler bulunur (1).

**Biyokimyasal Bulgular:** İnefektif eritropoezin yansıması olarak artmış transferin saturasyonu, artmış laktat dehidrogenaz, bilirubin ve demir seviyeleri tespit edilir. Serum kolesterol, lipit, alkalin fosfat, potasyum ve immünglobülin seviyeleri azalmış olabilir. Bu değişiklikler vitamin B12 eksikliğine spesifik

değildir. Fakat vitamin B12 tedavisinden sonra düzelmeleri vitamin B12 yetersizliğine bağlı olduğunu gösterir (1).

**Vitamin B12 Serum Düzeyi:** Vitamin B12 eksikliğinin direkt delili düşük serum vitamin B12 seviyesidir. Kullanılan metod ve laboratuara bağlı olarak serum ve plazma vitamin B12 düzeyi değişebilir. Genellikle normal serum düzeyi aralığı 200-900 pg/ml'dir ve 200 pg/ml altındaki seviyeler hemen daima vitamin B12 yetersizliğini gösterir (37). Megaloblastik anemisi olan hastada vitamin B12 düzeyi genellikle 100 pg/ml'den daha düşüktür. Serum vitamin B12 seviyesi hepatik vitamin B12 rezervini yansıtmaktadır. Megaloblastik anemili hastalarda serum folat seviyesinin artmış bulunması vitamin B12 yetersizliğinin güçlü bir indirekt kanıtıdır (27).

**Homosistein ve MMA Düzeyleri;** Hastaların bir kısmında (%5) anemi ve serum vitamin B12 seviyesinde düşüklük olmadan fonksiyonel vitamin B12 eksikliği gelişebilir. Vitamin B12 yetersizliğinin tanısı fonksiyonel vitamin B12 yetersizliğinin kanıtı olan artmış serum MMA ve total homosistein seviyeleri ile doğrulanabilir. Vitamin B12 emilimi olmayan hastalarda total serum vitamin B12 düzeyinin azalmasından önce vitamin B12 bağlayan TCII seviyelerinde azalma görülür. Azalmış TCII-Cbl kompleksi B12 vitamininin emilim yetersizliğinin bir işareti olabilir (1).

**Pozitif Tedavi Test Sonuçları:** Pozitif tedavi test sonucu; vitamin B12 tedavisini takiben biyokimyasal, hematolojik ve nörolojik bozuklukların düzelmesidir. CNCbl veya OHCbl'ın 100-1000 µg dozunda bir veya daha fazla dozda subkutan veya intramüsküler verilmesinden sonra aşağıdakilerden en az iki tanesinin olması tanıyı doğrular (1).

1. 24 saatte serum Fe'de %50 azalma olması.
2. Tedaviden 5-10 gün sonra retikülosit sayısında artma olması.
3. İki haftada trombositopeninin düzelmesi.
4. İki haftada nütropenin düzelmesi.
5. İki haftada MCV 'de 5 fl veya daha fazla düşme olması.
6. 2-4 haftada aneminin düzelmesi.
7. Artmış nötrofil lob sayısının 4 haftada normal sayıya düşmesi.

8. Artmış plazma MMA ve total homosistein seviyelerinde 2 haftada azalma olması.

**Schilling Testi:** Vitamin B12 emilim testleri arasında en standardize olanıdır. Vitamin B12'nin emilim defektini tespit etmede kullanılır. Radyoaktif işaretli vitamin B12 24 saatlik idrardaki miktar ölçümüne dayanır. İşaretli vitamin B12 ile intrinsik faktörün beraber verilmesi sonucundaki idrar vitamin B12 değerlendirmesi ile intrinsik faktöre bağlı defektler de gösterilebilir (1, 27).

**Gıda Schilling Testi:** Atrofik gastritili veya gastrik peptik aktivitesi yetersiz hastalarda kullanılmaktadır (1).

**Deoksiüridin Supresyon Testi:** DNA sentezi ile ilgili olarak folat ve/veya vitamin B12 durumunu değerlendirmede kullanılan duyarlı invitro bir testtir. Hücresel folat ve/veya vitamin B12 yetersizliğinde timidilat sentez enzim aktivitesinin azaldığını gösterir. Bu testin her laboratuarda yapılması mümkün olmamaktadır (1).

**Diğer Testler:** Fekal atılım testi, aminoasit ölçümü, transkobalamin II düzeylerinin ölçümü, fibroblastlarda komplemetasyon çalışmaları, intrinsik faktör ve mide pariyetal hücrelerine karşı antikörlerin ölçümü sayılabilir (38).

#### **1.1.1.14. Vitamin B12 eksikliğinin tedavisi**

Şiddetli anemisi olup hastaneye başvuran hastalarda kalp yetmezliği gelişmiş olabilir. Acil tedavide amaç oksijen verilmesi, diüretik kullanımı ve çok yavaş sınırlı eritrosit transfüzyonu ile hastanın stabilize edilmesidir. Hızlı ve fazla miktarda transfüzyon kardiyak yetersizliğe sebep olabilir veya mevcut yetmezliği kötüleştirebilir. Acil şartlarda yüksek dozda vitamin B12 verilmesi gereksizdir. Acil ve hızlı tedavi bazen yaşamı tehdit eden yan etkilere yol açabilir (1, 27).

Transfüzyonu takiben birkaç saat içinde kemik iliğinde, eritroid seride hiperplazi azalacağından ve hücre morfolojisi değişeceğinden megaloblastik aneminin mevcudiyetini göstermek için kemik iliği incelemesi erken dönemde yapılmalıdır. Serum vitamin B12 değerinde transfüzyona bağlı önemli bir değişiklik olmasa da transfüzyon işlemi yapılmadan önce bazal tetkikler için kan alınmalıdır. Vitamin B12 10 µg/gün dozunda iki gün verilmesi artmış serum LDH ve demir seviyelerinin normale dönmesi ve tedavinin başlangıcından 5-7 gün sonra retikülosit sayısını maksimum seviyeye ulaştırmak için yeterlidir (1, 16).

Whiteheat ve arkadaşlarının önerdiği tedavi planı; çocuklar için CNCbl başlangıç dozu iki gün süre ile 0.2 µg/kg/gündür. Bu tedaviyi takiben 1 hafta süre ile CNCbl 1000 µg/gün dozunda enjeksiyon şeklinde verilmeli ve bunu izleyen bir aylık sürede 100 µg/hafta dozunda tedavi verilmelidir. Bu tedavi vücut vitamin B12 depolarını doldurmak için gereklidir (14).

Ağır anemisi olan hastalarda yüksek doz vitamin B12 kullanımı sonucu büyük olasılıkla şiddetli hipokalemi oluşur. Potasyumun ekstraselüler kompartmandan intraselüler kompartmana geçişi ve renal potasyumun korunmasında (tutulmasında) gecikme ile birlikte, intraselüler potasyum birikmesiyle hipokalemi gelişir. Vitamin B12 başlangıçta 10 µg/gün 2-3 gün SC verilirse dahi hipokalemi olasılığına karşı dikkatli olunmalı ve potasyum desteği sağlanmalıdır (1, 27).

Vitamin B12 eksikliği kanıtlanmış ve vitamin B12 emilimi olmayan hastalarda ise, eksikliğin tekrarlanmaması için CNCbl'nin ömür boyu aylık 100-1000 µg'lık enjeksiyon şeklinde uygulanması gereklidir. Benzer şekilde depoların korunması ve dolması OHCbl'nin her üç ayda bir 1000 µg veya her 6-12 ayda bir 1-2 hafta süresince 1000 µg/gün subkutan enjeksiyonu ile de sağlanabilir. OHCbl verilen hastaların az bir kısmında TCII-Cbl kompleksine karşı antikor gelişir bu durum tedaviye toleransın gelişmesine yol açar (1, 27).

Konjenital vitamin B12 metabolizması defekti olan çocuklarda OHCbl haftada 2-3 kez 1000 µg enjeksiyon şeklinde kullanılmalıdır. Bu gibi vakalarda tedavinin etkinliği total homosistein, MMA, metioninin ve belki ilave metabolitlerinin serum seviyelerinin ölçülmesi ile izlenebilir (1).

Vitamin B12 eksikliğinde prognoz eksikliğin şiddetine ve süresine bağlıdır. Bu nedenle olabildiğince erken tanı konulup tedaviye başlanmalıdır (1, 31, 34).

### **1.1.2. Girelin**

Girelin oreksijenik hormon olarak bilinir. Hormon olarak keşfedilmesinden önce, 1996 yılında reseptörü GHS-R (büyüme hormonu salgılatıcı reseptör) tanımlanmış ve G protein ailesine ait olduğu saptanmıştır (12, 38). Daha sonra bu reseptörün endojen ligandı aranmaya başlanmış ve girelin 1999 yılında ilk olarak Kojima ve ark. tarafından farelerin midesinde GHS-R1a bağlanmış endojen bir

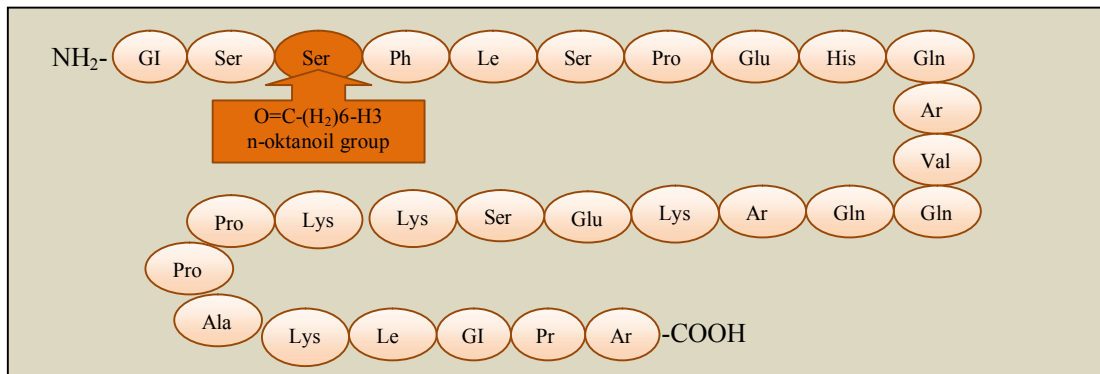
ligand olarak tanımlanmıştır (12). Daha sonra, iştah üzerine etkilerinin tespit edilmesi üzerine iştah hormonu olarakta adlandırılmıştır.

### 1.1.2.1. Girelin Gen Ürünlerinin Sentezi ve Yapısı

Girelin geni, insanlarda 3p-25-26'da bulunur. İnsan girelin geni, alternatif splicing ve/veya post translasyonel modifikasyonla girelinden başka temel olarak deaçil girelin ve obestatin olmak üzere farklı aktif molekülleri de oluşturabilir. Bu moleküller girelin ve analogları, C-girelin ve obestatin olmak üzere gruplandırılabilir (39, 40) .

Girelin öncülü olan preprogirelin, 117 amino asit'den oluşur. Preprogirelin, 23 amino asitlik sinyal peptidi ve 94 amino asitlik progirelin (1-94) kısımlarını içerir. Progirelin 28 amino asitlik matür girelin (1-28) ve 66 amino asitlik kuyruk kısmından (29-94) oluşmuştur. Preprogirelinin son ürün olan matür gireline kadar proteolitik olarak yıkımından sorumlu olan enzimler henüz bilinmemektedir (40).

Girelin geninin major aktif ürünü 3. pozisyonundaki serin amino asiti bir oktanoil grup ile açillenmiş, matür girelin olarak adlandırılan ve 28 aminoasitten oluşan açillenmiş girelidir (Şekil 2). Girelin salınmadan önce sitoplazmada, posttranslasyonel olarak N-terminal 3. amino asidi olan serin kalıntısına n-oktanoil asit eklenerek aktif haline dönüştürülür. Girelinde oluşan bu açilasyon, aktivite ve GHS-R'e bağlanma için gereklidir. Ayrıca bu post translasyonel değişimin, girelin molekülüne hidrofobik özellik kazandırması, bu hormonun özellikle hipotalamus ve hipofiz olmak üzere beyin dokusuna geçişine olanak sağlamaktadır (41, 42). 14. pozisyonundaki glutamin'in olmadığı bir analog peptid daha vardır ve deaçil girelin (14) girelin adını alır.



Şekil 2. Girelinin 28 aminoasitlik moleküler yapısı (43, 44).

### **1.1.2.2. Girelin ve Türevlerinin Doku Dağılımı**

Vücutta girelin üretimi ile ilişkili oksintik bez ve santral sinir sistemi olmak üzere iki hücreyel alan bulunmaktadır. Girelin, çoğunlukla mide fundus mukozası oksintik bezleri içerisindeki X/A benzeri hücreler tarafından üretilir (41). Dolaşımda bulunan girelinin büyük miktarı mideden salgılanır ve geriye kalan kısmın çoğu ince barsak kaynaklıdır (45). Hipotalamusta arkuat nukleus (ARC)'da girelin peptidi ekspresyonu olduğu gösterilmiştir ancak girelin pozitif nöronların sayısı düşüktür. Bu dokulara ek olarak girelin; hipofiz, tükürük, tiroid bezi, ince bağırsak, safra kesesi, böbrekler, kalp, pankreasın alfa, beta ve epsilon hücreleri, akciğer, fallop tüpleri, over, testis, plasenta, göbek kordonu, kordon kanında, gonadlar, immün sistem, meme, dişlerde, iskelet kaslarında, ciltte, yağ dokusunda, miyokarda, damar dokularında, nöroendokrin tümörlerden medüller tiroid karsinomaları ve akciğer tümörleri gibi değişik tümör dokularında da saptanmıştır (46).

### **1.1.2.3. Dolaşımdaki Girelin Gen Ürünü Peptidler**

Girelinin yarılanma ömrü 15-20 dakikadır. Vücut sıvılarında açıl ve deaçil olmak üzere iki formda bulunur. Plazma konsantrasyonu 200-600 ng/L'dir. Deaçil girelin dolaşımdaki toplam miktarı yaklaşık %80-90'ını oluşturmaktadır. Dolaşımdaki girelinin 2/3'ü midedeki oksintik mukozadaki P/D<sub>1</sub> hücreleri tarafından üretilir ve kalan girelinin çoğunluğu ince barsaktaki P/D<sub>1</sub> hücrelerinden kaynaklanır. İnsan plazma girelininin %90'nını deaçil girelin oluşturur. Bu durum girelinin sistemik dokularda GHS-R'ye bağlanması ve dolaşımdan hızla temizlenmesinin sonucu olarak yarılanma ömrünün deaçil girelinden daha kısa olmasına bağlı olabilir. Girelinin yarılanma ömrünün kısa olmasından plazmada deaçil gireline hızla deaçilasyonu da sorumludur (47).

### **1.1.2.4. Girelin Gen Ürünlerinin Etki Mekanizması**

#### **1.1.2.4.1 Girelin Reseptörleri ve Etki Mekanizması**

Büyüme hormonu salgılatıcı reseptör, 3q26.2'de kodlanmış gendedir. Bu genin pre-mRNA'nın GHS-R1'i alternatif işleme tabi tutması sonucu GHS-R1a ve GSR-1b olmak üzere iki izoformu oluşur. Girelin GSR-1a'ya bağlanır. GSR-1b, GSR-1a gibi yaygın bir şekilde eksprese edilir; fakat farklı olarak GSR1b' ye girelin veya sentetik büyüme hormonu salgılatıcıları (GHS) bağlanmaz ve GSR-

1b'nin fonksiyonel olup olmadığı bilinmemektedir (48). Girelinin iştah, gıda alımı ve enerji balansı üzerine etki ettiği bölgeler olan hipofiz bezi ve hipotalamusta GSR-1a reseptörleri yaygın olarak izole edilmiştir (49). Biyolojik ritim, mood, kognisyon, hafıza, öğrenme gibi fonksiyonların kontrol edildiği santral sinir sisteminin hipokampus, substantia nigranın pars kompakta bölgesinde, mental tegmental bölge, dorsal ve medial raphe ve Edinger–Westphal çekirdekleri ve piriform kekste de GHS-R1a ekspresyonu gösterilmiştir (50).

Ayrıca, GHS-R1a aktivasyonu girelinin birçok etkisine aracılık eden vagal nod ganglionlarında ve mide, bağırsak, pankreas, adrenal ve tiroid bezi, gonad, over dokusu, tümöral dokular gibi birçok periferel organda da gösterilmiştir (51). GHS-R1a aktivasyonu açılasyon gereklidir (52).

Bütün modifiye açilgirelin analogları, anestezi verilmiş ratlarda GHS-R eksprese eden hücrelerde  $Ca^{2+}$  artışını sağlayarak aynı şiddette GH salgılanmasına neden olmaktadır (39) .

Deaçil girelin GHS-R1a'ya bağlanamadığı için, etkilerinin oluşmasına başka reseptörler aracılık etmelidir. deaçil girelin için spesifik ve açil girelin için ak reseptörlerin bulunması mümkün olmakla beraber; şu ana kadar bunların hiçbiri karakterize edilememiştir. deaçil girelinin hücre proliferasyonu ve metabolizma üzerine biyolojik aktivite gösterdiği ve kardiyomyozit, adiposit, prostatik ve iskelet kası hücre membranlarına bağlandığı gösterilmiştir (52, 53) .

#### **1.1.2.4.2. Büyüme Hormonu Salgılatıcılar (GHS)'lar ve Girelinin Sinyal Yolları**

Büyüme hormonu salgılatıcılar, GH salınmasını stimule eden sentetik bileşiklerdir. Bunlar G protein ailesinden reseptöre (54) .

#### **1.1.2.5. Girelin Gen Ürünlerinin Etkileri**

##### **1.1.2.5.1. Büyüme Hormonu(GH) Sekresyonu**

Girelin, hipofiz bezindeki somatotropik hücrelerdeki GSR1-a reseptörlerine bağlanır ve doza bağımlı olarak GH salgılanmasına neden olur. Hipotalamustaki GHRH-nöronları aktivasyon, somatostatin nöronlarında inhibisyon yapar ve vagal afferent aktivasyonu uyarır (50, 55).

Normal şartlarda deaçil girelin, GHS-R1a'ya bağlanamadığı için GH sekresyonunu etkilemez. Bununla birlikte, transgenik farelerde deaçil girelinin aşırı

ekspresyonu, GH-IGF-I aksını modüle edebilir (girelin verilmesi azalmış GH cevabı) (56).

#### **1.1.2.5.2. İştah ve Vücut Ağırlığı**

İştahın beyin tarafından kontrol edildiği ve yemek yemenin merkezi sinir sistemindeki özellikle hipotalamustaki kompleks mekanizmalar tarafından düzenlendiği kabul edilmektedir (57).

Memelilerde girelin oreksijenik ve adipogenik bir moleküldür. Oreksijenik etki hızlı başlar; ama etkisi kısa sürelidir. Hipotalamus, enerji homeostazisi için kontrol merkezidir. Girelin hipotalamusta iştah üzerine etkisini üç yolla yapar (41). Bunlar;

1. Mideden salgılanan girelin, kan yoluyla hipotalamik ARC hücrelerine ulaşır ve kan beyin bariyerini geçerek aktif transp yolu ile diğer serebral hücrelere ulaşır.

2. Periferde sentezlenen girelin, vagal etkileşimlerle GHS-R ekspresyonunu sağlar ve vagal etkileşimler nukleus traktusa ulaşarak hipotalamusu etkiler.

3. Girelin lokal olarak hipotalamusta sentezlenir. Noropeptid Y (NPY) , iştah etkili protein (AGRP) ve diğer hipotalamik hücrelerle direkt etkileşime girer.

Girelin üreten nöronlar, hipotalamusta ARC bölgesinde bulunur.

Intraserebroventriküler girelin uygulaması ARC'de NPY düzeylerini artırır, periferel girelin uygulaması ise hipotalamik nöronları ve gıda alımını stimüle eder (58). Uzun dönemde girelin vücut ağırlığını da kontrol edebilir, kilo verilmesini takiben girelin düzeyleri artar ve kilo alımını takiben azalır (59) .

Birçok araştırmacı tarafından, deaçil girelin ve gıda alımı arasında negatif ilişki gösterilmiş olup (60, 61) öte yandan gıda alımını stimüle ettiğine dair araştırmalar da mevcuttur (62, 63). Bazı araştırmalarda bazal ve girelin ile stimüle edilmiş durumlarda, girelinin gıda alımını azalttığı ve kilo alınmasını baskılayabileceği belirtilmiştir (63, 64).

#### **1.1.2.5.3. Metabolizma**

##### **1.1.2.5.3.1. Glukoz Metabolizması**

Girelin, beyinde nöronların glukoz duyarlılığını, insulin sekresyon ve aktivitesini ve hepatik glikogenezi düzenleyerek glukoz hemostazına katılır (65).

Akut olarak sistemik girelin uygulaması, insanlarda insülin salınımını inhibe eder ve plazma glukoz seviyesini arttırır (66). Bu etkileri insan ve hayvanların endokrin pankreasında tespit edilen GHS-R1a aracılık etmesi, insülin karşıtı hormonlar olan GH, kizol, epinefrin ve muhtemelen glukagon stimülasyonu yapması, hepatositlere direkt etkisi sonucu hepatik glukoz yapımını arttırması ile meydana gelir (67). Deaçil girelin de glukoz metabolizmasını regüle edebilir. Fare ve ratlardan izole edilen pankreasın adacık hücrelerinde, deaçil girelin konsantrasyonunun plazma konsantrasyonuyla uyumlu bir şekilde açil girelinden 10 kat daha yüksek olduğu ve açil girelinin insülin sekresyonu üzerine olan etkilerini adan kaldırdığı belirtilmektedir (68). Ayrıca, insülinin endojen glukoz üretiminin inhibe etme kapasitesini adan kaldırdığı; fakat glukoz tüketimini etkilemediği belirtilmektedir (69). Deaçil girelin, primer hepatositlerden glukoz çıkışını inhibe eder ve girelinin glukoz serbestleştirici etkisini baskılar (67).

#### **1.1.2.5.3.2. Lipid Metabolizması**

Girelin karaciğer, yağ dokusu ve iskelet kasında lipid metabolizmasının regülasyonunda önemli rol oynar. Karaciğerde, yağ asitlerinin oksidasyonunu azaltırken, lipogenik patern genlerinin ekspresyonu ve trigliserid içeriğini indükler. Girelin gastroknemius kasının trigliserid içeriğini azaltmakta ve mitokondrial oksidatif enzim aktivitesini arttırmaktadır. Aktif halde iken iskelet kaslarındaki yağ oranını azaltan peroksizom proliferatör aktivatörü reseptör  $\gamma$ 'yı iskelet kaslarında selektif olarak arttırmaktadır (70).

#### **1.1.2.5.4. Isı üzerine etkisi**

Santral ya da periferel yolla uygulanan girelin doza bağımlı olarak ısı artışına neden olmaktadır. Uygulama şekline göre ısı artışında farklılık oluşturmaktadır. Girelin intraperitoneal verilirse ısı artışı 5-20 dakika arasında olurken, intraserebroventriküler verilmesi halinde ise 10-60 dakika arasında gerçekleşmektedir. Bu ısı değişiminin altında yatan neden, henüz bilinmemesine rağmen girelinin enerji harcanmasında ve korunmasında rolü olduğu kabul edilmektedir (71).

#### **1.1.2.5.5. Girelin ve Hastalıklar**

Girelin seviyeleri ve hastalıklar arasında ilişkiyi içeren birçok çalışma mevcuttur. Hormon seviyesi hastalıklara bağılı olarak değişmektedir. Boy kısalığında

girelin miktarı artar (72), Tip II diabette veya insülin direnci olan hastalarda da düşük girelin düzeyleri bulunmuştur. Ancak tip I diyabetli hastalarda ise yapılan çalışmalarda girelin seviyelerinde değişiklik gözlenmemiştir (73). Hipotroidik ratlarda serum girelin seviyelerinin arttığı, hipertroidide ise azaldığı bulunmuştur (74). Uyku ve epilepsi ile uyku ve endokrin fonksiyonlar arası bilinen bağlantılardan dolayı epilepsili hastalarda kan girelin seviyelerinde değişiklikler olmaktadır (75).

Yapılan iki farklı çalışmada DEA' de girelin düzeyleri kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gösterilmiştir (13). Vitamin B12 ile girelin arasındaki ilişkiye ait bilgi bulunmamaktadır.

Girelin gen ürünlerinin değişik sistem ve organ üzerine olan birçok etkisi tanımlanmıştır (Tablo 3).

#### **1.1.2.6. Girelin Gen Polimorfizmi**

Polimorfizm, bir toplumda sadece tekrarlayan mutasyonlarla sürdürülemez oranlarda var olan, nadir sıklıktaki, devamlılık göstermeyen iki veya daha fazla genetik özelliğin bir arada olması olarak tanımlanabilmektedir (76). DNA dizisinde doğal olarak meydana gelen varyasyonlar birkaç şekilde oluşabilir;

1. Tek nükleotid substitüsyonu
2. Tek ya da birkaç nükleotidin insersiyonu veya delesyonu,
3. Tekrarlayan dizi sayısındaki değişimler ve kromozom yapısındaki büyük değişimler.

İnsan genomunda tek nükleotid değişimleri oldukça yüksek sıklıkta bulunmaktadır. Bu oran her 1000 bazda 1 olarak tahmin edilmektedir. Bunlar sıklıklarına ve hastalık yapma yeteneklerine bağlı olarak polimorfizm ya da mutasyon olarak adlandırılmaktadırlar (76).

**Tablo 3.** Girelin gen ürünlerinin diğer organ ve sistemler üzerine etkisi (42).

<b>Etki</b>	<b>Girelin</b>	<b>Deaçil girelin</b>
<b>Gastrointestinal</b>		
Ekzokrin sekresyon	↑↓↔(mide)/↑	↔ (mide)
Epitelyal koruma	↑ Nd	Nd
Motilite	↑ (mide ve kolon)	↓(mide)/↔
<b>Kardiyovasküler</b>		
Büyük damarlarda	↑ (sistemik)/↓ (koroner)	↑ (sistemik)
Küçük damarlarda	↑	Nd
Endotel fonksiyonları	↑	Nd
Kalp fonksiyonu	↑	↑
Hücre proliferasyonu	↑↓	↑↓
<b>İmmün fonksiyonlar</b>		
İmmün hücre üretimi	↑	↔
Sitokin üretimi	↓	↔
Nötrofil aktivasyonu	↓	Nd
<b>Kemik</b>		
Osteoblast üretimi	↑	↑
Osteoblast aktivitesi	↑	Nd
<b>Uyku</b>	↑	↔
<b>Hafıza</b>	↑	↔
<b>Anksiyete</b>	↑	↔
<b>İris kas releksasyonu</b>		
Sfinkter	↑	↑
Dilatör	↑	↔

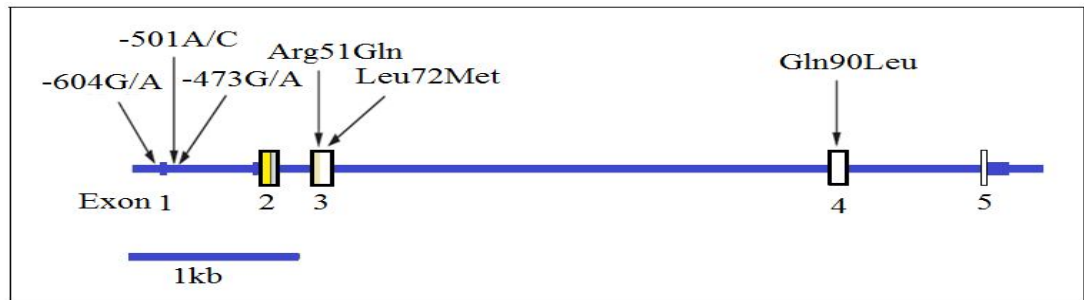
(↑): stimülasyon, (↔): etki yok, (↓): inhibiston, (Nd): bilinmiyor

Normal populasyonda %1'den daha fazla sıklıkta olan değişimler polimorfizm olarak kabul edilmektedir. %1'den daha az sıklıkta olanlar ise genellikle hastalıkla sonuçlanmaktadır. Sadece hastalıklarla sonuçlanan mutasyonlar değil aynı zamanda bazı polimorfizmler de fonksiyonel olarak önemli olup hastalık patogeneğinde rol oynamaktadır. Allel bir genin homolog

kromozomlar üzerinde yer alan alternatif DNA dizilimleri veya formlarıdır. Tek nükleotidi içeren değişimler tek nükleotid polimorfizmi (SNP) olarak adlandırılır. Bir polimorfizmde yaygın olan dizi vahşi tip allel, nadir olan ise varyant alleldir (77).

İnsan girelin geni 3. kromozom 3p25-26 lokusunda yer alır (78). İnsan girelin geni 5 ekzondan oluşmaktadır. İlk ekzon 5' bölgesinde kodlanmıştır ve çok kısadır. Transkript A insan girelin mRNA'sının in vivo asıl formudur. Bu mRNA 117 aa'li girelin prekürsörüne (preprogirelin) dönüşür. Proteaz enzimi ile yarıma ve açıl modifikasyonu sonucu 28 aa'li aktif girelin peptidine dönüşür. 28 aa'li fonksiyonel girelin peptidi ekzon 1 ve ekzon 2'de kodlanmıştır (73).

Yapılan farklı çalışmalarda girelin geninde DNA dizileme kullanılarak pek çok farklı tek nükleotid polimorfizmi tespit edilmiştir. Bunlardan en önemlileri promoter -501 A/C, Arg51Gln, Leu72Met ve Gln90Leu şeklindedir. Transkripsiyon başlama noktasında -604 g/a, -501 a/c, -473 g/a üç adet nükleotid değişimleri yer alır. Arg51Gln olgun girelin proteininin son kodonunda yer almaktadır. Olgun girelin proteinin oluşturulması için son 66 amino asitin kesiminde görevli olan endonükleazların tanıma noktasını bozmaktadır. Arg51Gln ve leu72Met değişimleri ekzon 3'de ve Gln90Leu ise ekzon 4'de yer alan aminoasit değişimleridir (Şekil 4) (79, 80). Girelin genindeki mutasyonlar girelin proteininde kusur ya da aktivasyon kaybı ile BH salgılanmasında ve enerji dengesinde değişikliğe neden olabilirler (81). Preprogirelin geninin 72. kodonunda (Leu72Met) meydana gelen mutasyon matür girelinin kodon bölgesinin dışındadır (82). Leu72Met polimorfizmi sonucu matür girelinde yapısal bozukluk olmamasına rağmen, mRNA kararlılığındaki değişiklikler girelin sekresyonu veya aktivitesinde değişikliklere neden olur (81).



Şekil 3. Girelin geninin genom yapısı ve önemli polimorfizmleri (80).

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Hasta ve Kontrol grubu

Çalışmaya Ocak 2010-Ekim 2011 arasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı polikliniğinde izleme alınan vitamin B12 eksikliği (n: 40) olan ve kontrol grubu herhangi bir nedenle (aşı...vb) sağlam çocuk polikliniğine başvuran ve kan örneği alınması gereken ve sağlık problemi olmayan 0-17 yaş grubu çocuklardan oluşturuldu. Vitamin B12 eksikliği tespit edilen hastalarda serum girelin düzeyi ve girelin gen polimorfizmi kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Kontrol grubundan 1. derece akrabalarında ve kendisinde vitamin B12 eksikliği olmayan olgular kullanıldı. Vitamin B12 eksikliği tanısı alan ve kontrol grubunu oluşturan çocukların ailelerine, çalışma ile ilgili bilgi verilip; yazılı onayları alındı.

Vitamin B12 eksikliği grubunda 22 kız (%52.3) ve 20 erkek (%47.7) olmak üzere toplam 42 hasta çalışmaya alındı. Kontrol grubu olguları 19 kız (%45.2) ve 23 erkek (%54.8) olmak üzere toplam 42 sağlıklı olgudan oluşturuldu. Vitamin B12 serum düzeyi 200 pg/ml altındaki değerler vitamin B12 eksikliği olarak kabul edildi (37).

Anemi tanısı konacak 6 ay-18 yaş arası çocuk hastalarda Hb değerleri; 4 ay-2 yaş arasında 10.5 g/dl düzeyinin altında, 2-6 yaş arasında 11.5 g/dl düzeyinin altında, 6-12 yaş arasında 12 g/dl düzeyinin altında ve 12-18 yaş arasında 12 g/dl altında bulunması anemi olarak kabul edildi. Serum demiri(Fe) azalmış, transferrin saturasyonu %16 altında ve ferritin(F) değerinin 12 ng/dl altında olması DEA olarak değerlendirildi (83).

Vitamin B12 eksikliği tanısı; tam kan sayımı (CBC), periferik yayma, retikülosit, vitamin B12 düzeyi, folik asit düzeyi, Fe, total demir bağlama kapasitesi(TDBK) ve F alınarak saptandı. Bunlar için vitamin B12 eksikliği düşünülen her olguda rutin olarak her bireyden CBC ve retikülosit için etilen diamin tetraasetik asit (EDTA)'li biyokimya tüpüne toplam 3 ml, serum Fe ve TDBK için biyokimya tüpüne 2 ml, vitamin B12, folik asit ve Fe için biyokimya tüpüne 2 ml kan alındı. Çalışmaya katılacak her bir bireyden girelin değerleri hasta tanı anında rutin alınan toplam 7 ml kandan (vitamin B12, folik asit, serum Fe,TDBK, F düzeyleri için alınan kandan) arta kalan 2 ml serumdan Peptide

Enzyme Immunoassay (EIA) yöntemi kullanılarak çalışıldı. Tüm örnekler sabah 08:00-09:00 saatleri arasında aç olarak alındı. Ancak peptidler hücrede proteazlar tarafından kolayca parçalandığından plazma girelin miktarlarının doğru ölçülebilmesi amacıyla her 1 ml kana bir proteaz inhibitörü olan aprotininden 20-30 µl eklendi. Ayrıca santrifüj edildikten sonra elde edilen plazma örnekleri 1/10 hacim kadar 1 N HCl eklendi. Bu örnekler, - 20 ile -80 °C'de saklandıktan sonra tüm değerler aynı anda çalışıldı. Girelin için alınan örnekler aynı anda uygun şartlarda çözündürüldükten sonra çalışma kitlerinin kataloğuna uygun olarak birlikte değerlendirildi.

Tam kan sayımı Coulter Gen-S system, serum Fe düzeyi ve TDBK Olympus AU 2700 cihazı ve Olympus kiti, F düzeyi Immulyte 2000 cihazında Immulyte 2000 ferritin kiti ile bakıldı.

## **2.2. Girelin**

Biotec L800 cihazda, plazma örneklerinde; SPI-bio bertin marka Human Unacylated Girelin ELISA kiti kullanılarak (REF:A05119-96 Wells) ve A-Ghr aynı firma tarafından üretilen Human Acylated Girelin ELISA kiti (REF:A05106-96Wells) kullanılarak üretici firmanın kataloğunda belirttiği şekilde çalışıldı.

### **2.2.1. Girelin gen polimorfizmi**

Girelin gen polimorfizmi rutin kontrol için alınan 3 ml kandan (CBC ve retikülosit düzeyi için alınan EDTA'lı kandan) arta kalan 1.5 ml plazmadan çalışıldı. Tüm örnekler sabah 08:00-09:00 saatleri arasında aç olarak alındı. Örnekler EDTA'lı tüplere alındı. Alınan kan örnekleri DNA ekstraksiyonu yapılmaya kadar -20 °C'de saklandı.

Plazmadan standart DNA izolasyon protokolleri kullanılarak genomik DNA üretici firmanın protokolüne uygun olarak DNA izolasyonu yapıldı.

## **2.3. Polimorfizm Tayininde Kullanılan Gereçler**

Deoksiribonükleik asit izolasyonu otomatik mikropipetler (eppendorf, France), soğutmalı mikrosantrifüj (Ole Dich Instrumentmakers APS, type 157.MP, Germany), etüv (Nüve, NP 400, Türkiye), elektro-mag (Türkiye), Ph metre (Hana Instruments HI8521 pH meter, Italy), otoklav (Nüve, Türkiye), su banyosu

(Kötterman labechnic type 3643, Germany) ve veks (Labinco L46, The Netherlands) ekipmanları kullanılarak gerçekleştirildi.

Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi agaroz jel elektroforez güç kaynağı, agaroz jel tankı ve düzeneği (Cons N.V. Parklaan 36 B-2300 Turnhout, Belgium), eppendorf mastercycler gradient (Netheler Mlnz GmbH, 23331 Hamburg, Germany) ve görüntüleme ünitesi (TCP-20-M, Vilber Lourmat, Cedex, France) cihazları kullanıldı.

Elektronik hassas terazi (Shimadzu Corporation Libror AEG-320, Japan) ve mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye) yardımıyla agaroz jel döküldü.

#### **2.4. Polimorfizm Tayininde Kullanılan Kimyasallar**

Jel elektroforezi için borik asit (Merck, Frankfurt, Germany), EDTA (Sigma, Germany) ve Tris HCL (Sigma, Germany) ile tampon çözelti, agaroz jel(Sigma, Germany) için etidium bromide (Sigma, Germany) çözeltisi, jele PZR örneklerinin yüklenmesinde kullanılan yükleme tamponunun hazırlanması için ficol (Serva, Germany), bromofenol mavisini (Sigma, Germany) ve xylene cyanol (Sigma, Germany) maddeleri kullanıldı.

Deoksiribonükleik asit izolasyonunda mutlak etanol (Kimetsan, Türkiye) ve agaroz jelde örnek PZR büyüklüğünün saptanması için 100 bç'lik DNA boyut belirteci (Fermentas, Litvanya) malzemeleri kullanıldı.

#### **2.5. Polimorfizm Tayininde Kullanılan Çözeltiler**

##### **Agaroz Jel Yükleme Tamponu (6X)**

%15 ficol, %0.05 bromofenol mavi, %0.05 ksilen siyanol

##### **Tris-borik asit-EDTA tamponu (TBE) (10 X) (1L)**

108 g Tris HCl, 55 g borik asit, 20 ml 0.5 M EDTA, 1000 ml ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanır.

##### **Etilen Diamin Tetraasetik Asit Çözeltisi (0.5 M, 50 ml)**

18.6 gr EDTA tartılır. pH=8.0'e EDTA çözülünceye kadar NaOH eklenerek ayarlanır.

##### **Etidium Bromüd (EtBr) Çözeltisi (10 mg/ml)**

10 mg EtBr tartılır, üzerine 1 ml ddH<sub>2</sub>O eklenir. Karanlıkta +4 °C'de saklanır.

## **2.6. DNA İzolasyon İşlemi**

### **2.6.1. Kullanılan Solüsyon ve Gereçler**

Nükleik asit izolasyonunda DNA purifikasyon kiti (Promega Cat.#1125), 1.5 ml'lik tüpler (Axygen scientific MCT-150-A), 100 ve 1000 µl'lik pipet (Eppendorf research series 2100 pipettes, Germany), pipet uçları (Deltalab 327-17), mikrosantrifüj, veks, izopropil alkol ve % 70'lik etil alkol gibi malzeme ve araç gereçlerden yararlanıldı.

### **2.6.2. İzolasyon Aşamaları**

1. 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 900 µl cell lizis solüsyonu eklendi.
2. Kan tüpü kanın tamamen karışması sağlanana kadar hafifçe sallandı. Sonra 300 µl kan cell lysis solüsyonu içeren mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Karışması için tüp 5-6 kez alt-üst edildi.
3. Kırmızı kan hücrelerinin lizisi için 10 dakika oda ısısında bekletildi. Bu esnada tüp 2-3 defa alt-üst edildi. 13.000-16.000 rpm'de de 20 saniye santrifüj edildi.
4. Görünen beyaz pellete dokunmaksızın süpernatant yaklaşık 10-20 µl sıvı bırakacak şekilde atıldı.
5. Beyaz kan hücreleri tamamen çözülene kadar tüp 10-15 saniye kadar hafifçe vekslendi.
6. 300 µl nuclei lysis solüsyonu çözülmüş hücrelerin bulunduğu tüpe eklendi. Beyaz kan hücrelerinin lizisi için solüsyon 5-6 kere pipetlendi. Solüsyonun visköz bir hale geldiği gözlemlendi. Karıştırma sonunda hücre çökeltileri görünürse bunlar çözülene kadar solüsyon 37 °C'de inkübe edildi. Eğer 1 saat sonra hala çökeltiler görülüyorsa ek olarak 100 µl nuclei lysis solüsyonu ilave edilip inkübasyon tekrarlandı.
7. 1.5 µl RNase solüsyonu eklendi ve tüp 25 defa alt-üst edilerek karıştırıldı. Karışım 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi. Devam etmeden önce karışımın oda sıcaklığına gelmesi beklendi.
8. Nükleer pellete 100 µl protein presipitasyon solüsyonu eklendi. 10-20 saniye vekslendi. Vekslemeden sonra küçük protein çökeltileri görüldü.
9. 13.000-16.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Koyu kahverengi protein pelleti görüldü.

10. İçinde DNA bulunan süpernatant, içine 300 µl isopropanol konulmuş temiz bir 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne aktararak karıştırıldı.
11. Solüsyon alt-üst edilerek ağ şeklinde DNA kütlesi görülene kadar karıştırıldı.
12. 13.000-16.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. DNA küçük beyaz bir pellet şeklinde görüldü.
13. Süpernatant atılarak 300 µl %70 lik etanol eklendi ve -20 °C'de saklandı.

### **2.6.3. DNA Konsantrasyonu ve Saflık Derecesinin Ölçülmesi**

Konsantrasyon ve saflık derecesinin belirlenmesi UV spektrofotometresi ile yapılabilmektedir. DNA örneğinin içerisinde bulunduğu solüsyon tarafından absorbe edilen UV miktarı örnekteki DNA miktarı ile doğru orantılıdır. Absorbans genellikle 260 nm dalga boyunda ölçülür. Bu dalga boyundaki ölçümlerde çift iplikli DNA için absorbans değeri 50 µg/ml'lik konsantrasyon değerlerine karşılık gelir. UV absorbansı DNA'nın saflığının belirlenmesinde de kullanılabilir (260 nm'de nükleik asitler, 280 nm'de de proteinler pik verir). Saf bir DNA örneğinin 260 ve 280 nm'deki absorbans oranı ( $A_{260nm}/A_{280nm}$ ) 1.8'dir. Bu değer elimizdeki DNA örneğinin verimini gösterir. Dolayısıyla bulduğumuz değer 1.8'e ne kadar yakınsa verim o kadar yüksektir. 1.8'den düşük değerler örnekte fenol ya da protein kontaminasyonu, 1.8'den büyük değerler ise RNA kontaminasyonu varlığını gösterir. Hasta ve kontrol grubuna ait DNA örnekleri ölçülerek konsantrasyonları ve saflıkları belirlendi. 1.8'e yakın olmayan değerlere sahip örneklerin DNA'ları tekrar izole edildi.

## **2.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Çalışması**

### **2.7.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Materyalleri**

Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	Fermentas EP0402
10XPZR buffer (10 mM)	Fermentas EP0402
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	Fermentas EP0402
100 mM dNTP set	Fermentas R0186
Primerler	atq, Ankara, Türkiye

### 2.7.2. Restriksiyon Enzimleri

SacI (10 u/μl)	Fermentas ER1131
BsrI (10 u/μl)	Fermentas ER0881
ScaI (10 u/μl)	Fermentas ER0431
MwoI (10 u/μl)	Fermentas ER1732

### 2.7.3. Polimorfizmlerin PZR ve Restriksiyon Enzim Fragment Uzunluk Polimorfizmi Yöntemiyle Belirlenmesi

Aktif olan Girelin genin 51. aminoasitte arjininin yerine glutamin, 72. aminoasitte lösün yerine metionin ve 90. aminoasitte glutamin yerine lösün aminoasitlerinde meydana gelen değişimler ve promoter bölgesinde yer alan 501. nükleotiddeki A/C değişimi aşağıdaki yöntemler kullanılarak çalışıldı.

#### 2.7.3.1. Arg51Gln ve Leu72Met Polimorfizmlerinin Çalışılması

Forward 5'-GCTGGGCTCCTA/CCTGAGC-3' ve

Revers 5'-GGA/CCCTGTTCA/CTGCCA/C-3'

Polimeraz zincir reaksiyonu sonrası 618 bç'lik PZR ürünü elde edilecektir.

SacI (Arg51 allel) restriksiyon enzimiyle kesim sonrası 455 bç ve 163 bç'lik ürünler elde edilmektedir.

BsrI (Leu72 allel) restriksiyon enzimiyle kesim sonrası 517 bç ve 101 bç'lik ürünler elde edilmektedir.

#### 2.7.3.2. Gln90Leu Polimorfizminin Çalışılması

Forward 5'-GAGGTGTCA/CTCAGCAGTCC-3' ve

Reverse 5'-TCTTCTTCTTCAGGGCCTGGCTGTGCTGCTAGTA/C-3

Polimeraz zincir reaksiyonu sonrası 228 bç'lik PZR ürünü elde edilecektir.

ScaI restriksiyon enzimiyle kesim sonrası 195 bç ve 33 bç'lik ürünler elde edilmektedir.

#### 2.7.3.3. 501 A/C Polimorfizminin Çalışılması

Forward 5'-AGAA/CAAA/CGCCAGTCATCC-3 ve

Reverse 5'-GTCTTCCAGCCAGA/CAGTCC-3' primerleri kullanılacaktır.

Polimeraz zincir reaksiyonu sonrası 205 bç'lik PZR ürünü elde edilecektir.

MwoI restriksiyon enzimiyle kesim sonrası 104 bç ve 101 bç'lik ürünler elde edilmektedir.

#### 2.7.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Kurulması İşlemi

Polimeraz zincir reaksiyonu 0.5 ml'lik tüplerde toplam hacim 30 µl olacak şekilde gerçekleştirildi. Her bir tüpe 6 µl hasta DNA'sı ve üzerine 3 µl MgCl<sub>2</sub>, 3 µl 10X buffer, 3 µl dNTP (2.5 mM), 1 µl primer 1 (30 pmol), 1 µl primer 2 (30 pmol), 0.1 U Taq DNA polimeraz ve 13 µl ddH<sub>2</sub>O konuldu. Hazırlanan tüpler vekslendi ve PZR cihazına önceden girilmiş olan programda PZR işlemi gerçekleşti. PZR sonrası ürünler agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi.

#### 2.7.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Koşulları

Değerlendirilen tüm polimorfizmler için aynı PZR koşulları kullanıldı.

94 °C'de 5 dakika	
58 °C'de 1 dakika	1 döngü
72 °C'de 1 dakika	
94 °C'de 1 dakika .....	(denatürasyon)
58 °C'de 1 dakika .....	(eşleşme) 35 döngü
72 °C'de 1 dakika .....	(sentez)
94 °C'de 1 dakika	
58 °C'de 1 dakika	1 döngü
72 °C'de 7 dakika	

#### Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleriyle

##### Kesilmesi

Kesim 25 µl üzerinden yapılmıştır. 20 µl PZR ürünü 2, 5 µl 10Xbuffer, 0.5 U restriksiyon enzimiyle toplam hacim dd su ile 25 µl'ye tamamlanmıştı. Kesim işlemi tüm enzimler için 37 °C'de 16 saat bekletilmek suretiyle gerçekleştirilmişti. Tüm enzimler için aynı kesim protokolü uygulandı. Kısaca 25 µl PZR ürünü, 1 µl restriksiyon enzimi ve 2, 5 µl 10X buffer kullanılarak yapıldı.

Oluşan ürünler agaroz jelde yürütülen örnekler UV ışık altında değerlendirilerek genotipleme yapıldı.

#### 2.8. Agaroz Jel Elektroforezi

Yapılan bu çalışmada PZR ile çoğaltılmış ürünlerin tanımlanması için agaroz jel elektroforezi uygulandı. Elde edilen ürünlerin büyüklüklerini tanımlayabilmek için %4'lük jel kullanıldı. Kullanılan elektroforez düzeneğine

uygun hacim, toz halindeki agarozun 0.5XTBE tamponunda manyetik karıştırıcılı bir mikrodalga fırında kaynatılarak çözülmesi ile oluşturuldu. Ardından kaynamış çözelti 55–60 °C'ye soğutulurak 0.25 µg/ml EtBr ilave edildi. Kuyuları oluşturacak olan tarak, tabağına yerleştirildikten sonra hazırlanan jel; hava kabarcığı kalmayacak şekilde buraya döküldü. Jelin polimerizasyonu sonrası tarak dikkatlice çıkarılarak jel platformu 0.5XTBE tamponu ile dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi. Bu tampondan jelin üzerini 1–2 mm geçecek kadar eklendi. Örnekler ve belirteç DNA, 6X yükleme boyası ile 5:1 oranında karıştırılarak kuyulara 15'er µl yüklendi. Güç kaynağı açılarak 90 V'a ayarlandı. Yaklaşık yarım saat sonra güç kaynağı kapatıldı. Jel görüntüleme sisteminde UV ışını altında incelendi

### **2.9. Etik Kurul İzni ve Bilgilendirilmiş Onam**

Araştırmaya katılan tüm bireylere/ebeveynlerine araştırma ile ilgili ayrıntılı bilgi verilmiş ve onam formu çalışma öncesi imzalatılmıştır. Elazığ Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Etik Kurul tarafından 01.04.2011 tarihli toplantıda etik kurul onayı alınmıştır (Karar no: 06).

### **2.10. İstatistiksel Değerlendirme**

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 18.0 programı kullanıldı. Parametreler arası ilişkiler Pearson korelasyon analizi kullanılarak değerlendirildi. Hasta ve kontroller genotip ve allel sıklıklarının dağılımı Ki-kare analizi ile yapıldı. Gruplar arası farkların değerlendirilmesinde parametrik bir test olan Independent Samples T testi kullanıldı.  $p < 0.05$  olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Çalışmanın ekonomik giderleri Fırat Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP, proje no: TF.11.48) desteği ile sağlandı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Demografik özellikleri

Çalışma grubunun yaşları 1 ile 17 yıl arasında değişmekteydi. Yaş alması vitamin B12 eksikliği grubunda 8.3 yıl, kontrol grubunda ise 9.2 yıl olarak bulundu. Vitamin B12 eksikliği tanılı olgular ve kontrol grubunun yaşı istatistiksel olarak farklı bulunmadı ( $p<0.05$ ). Vitamin B12 eksikliği tanılı olgular (a) ve kontrol grubu (b) olmak üzere iki gruba ayrıldı (Tablo 4). Vitamin B12 eksikliği grubunda 22 kız (%52.4) ve 20 erkek (%47.6) çalışmaya alındı. Kontrol grubu (b) 19 kız (%45.2) ve 23 erkek (%54.8) olgudan oluşturuldu (Tablo 5).

**Tablo 4.** Olguların demografik özellikleri

	Hasta <sup>(a)</sup> n=42	Kontrol <sup>(b)</sup> n=42	p<0.05
<b>Yaş (ort±SD, yıl)</b>	8.3±4.7	9.2±5.6	
(alt-üst)	(1-17)	(1-17)	–
<b>Ağırlık (ort±SD, kg)</b>	28.6±17.3	33.5±17.6	
(alt-üst)	(8.9-65.0)	(8.0-67.0)	–
<b>Boy (ort±SD, cm)</b>	124.4±28.4	129.0±30.6	
(alt-üst)	(73.0±172.0)	(77.0-168)	–

n: Hasta sayısı, ort: Aritmetik ortalama, SD: Standart sapma, +=  $p<0.05$

**Tablo 5.** Çalışma ve kontrol gruplarında cinsiyet dağılımı

Grup	Cinsiyet	Olgu sayısı (n)	Yüzde (%)
<b>Çalışma</b>	Kadın	22	52.3
	Erkek	20	47.7
	Toplam	42	100.0
<b>Kontrol</b>	Kadın	19	45.2
	Erkek	23	54.8
	Toplam	42	100.0

#### 3.2. Hasta ve Kontrol Grubunda Hematolojik Değerler

Gruplar vitamin B12 eksikliği tanılı olgular (a) ve kontrol grubu (b) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Vitamin B12 eksikliği ve kontrol grubu olguların Hb değerleri sırasıyla; hasta grubunda  $9.71\pm 1.65$  g/dl ve kontrol grubunda  $13.14\pm 0.99$  g/dl olarak bulundu. Vitamin B12 eksikliği tanılı olguların Hb değeri ile kontrol grubunun Hb değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p<0.05$ ).

alama eritrosit hacmi değerleri vitamin B12 eksikliği grubunda  $76.68 \pm 14.10$  fL kontrol grubunda  $78.69 \pm 5.00$  fL olarak bulundu. Vitamin B12 eksikliği tanılı olguların tedavi öncesi ve sonrası grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p > 0.05$ ).

Serum vitamin B12 düzeyi tedavi öncesi  $161.38 \pm 16.77$  pg/ml, tedavi sonrası  $633.76 \pm 309.29$  µg/dl olarak bulundu. Vitamin B12 eksikliği tanılı olguların tedavi öncesi vitamin B12 değeri ile tedavi sonrası vitamin B12 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p < 0.05$ ).

Eritrosit dağılım genişliği (RDW) tedavi öncesi %  $18.32 \pm 4.55$ , tedavi sonrası %  $15.52 \pm 3.17$  olarak bulundu. Vitamin B12 eksikliği tanılı olguların tedavi öncesi ve sonrası grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p < 0.05$ ).

Serum Fe düzeyi tedavi öncesi  $64.97 \pm 51.91$  µg/dl, tedavi sonrası  $97.57 \pm 67.75$  µg/dl ve kontrol grubunda  $93.11 \pm 70.75$  µg/dl olarak bulundu. Vitamin B12 eksikliği tanılı olgulardaki Fe değerleri tedavi öncesi ve sonrası arasında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ ). Tedavi öncesi ile kontrol grubunun Fe değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p < 0.05$ ).

Serum TDBK'si tedavi öncesi  $332.35 \pm 105.28$  µg/dl, tedavi sonrası  $286.30 \pm 83.86$  µg/dl ve kontrol grubunda  $293.45 \pm 52.90$  µg/dl olarak bulundu. Vitamin B12 eksikliği tanılı olgulardaki TDBK değerleri tedavi öncesi ve sonrası arasında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ ). Tedavi öncesi ile kontrol grubunun TDBK değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p < 0.05$ ). Tedavi sonrası ile kontrol grubu arasında TDBK değerleri açısından istatistiksel fark bulunmadı ( $p > 0.05$ ).

Serum F düzeyi tedavi öncesi  $38.09 \pm 53.79$  ng/ml, tedavi sonrası  $75.94 \pm 71.52$  ng/ml ve kontrol grubunda  $47.47 \pm 75.32$  ng/ml olarak bulundu. Tedavi öncesi ve sonrası gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p < 0.05$ ). Tedavi öncesi ile kontrol grubunun F değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p < 0.05$ ). Tedavi sonrası ile kontrol grubu arasında F değerleri açısından istatistiksel fark bulunmadı ( $p > 0.05$ ).

Çalışmaya alınan vitamin B12 eksikliği olguların %85.7 Elazığ, %4.7 Bingöl, %7.1 Muş, %2.5 diğer iller oluşturuldu, kontrol grubunda ise %80.9 Elazığ, %9.5 Bingöl, %4.8 Muş, % 4.6 diğer illerden oluşturuldu.

**Tablo 6.** Hasta ve kontrol grubunda hemotolojik değerler

	Vitamin B12 eksikliği			P<0.05
	Tedavi öncesi (a) n=42	Tedavi sonrası (b) n=42	Kontrol (c) n=42	
<b>Hb</b> (g/dl, ort±SD)	9.71± 1.65	12.93±1.37	13.14±0.99	a-b,a-c
( alt-üst)	(5.9-11.0)	(10.7-15.9)	( 11.4-15.6)	+
<b>MCV</b> (fl, ort±SD)	76.6±4.5	78.3±9.7	78.5±4.9	a-b,a-c
(alt-üst)	(48-101)	(56.0-97.5)	(66-88)	-
<b>RDW</b> (% , ort±SD)	18.3±4.55	15.5±3.17	13.8±0.9	a-b,a-c
(alt-üst)	(11.8-29.0)	(12-26)	(12.3-16.4)	+
<b>Fe</b> (µg/dl, ort±SD)	64±51.91	97.5±67.7	93.2±72.0	a-b,a-c
(alt-üst)	(4-193)	(10-326)	(16-311)	+
<b>TDBK</b> (µg/dl, ort±SD)	332±105.2	286±83.8	293.4± 52.9	a-b,a-c
(alt-üst)	(44-618)	(14-449)	(152-395)	+
<b>Ferritin</b> (ng/ml, ±SD)	38.09±53.79	75.9±41.5	47.4±25.3	a-b,a-c
(alt-üst)	(1.5-302)	(6.5-336)	(7.5-406)	+

### 3.3. Vitamin B12 Eksikliği ve Kontrol Grubu Olguların Açıl Girelin, Deaçil Girelin Değerleri

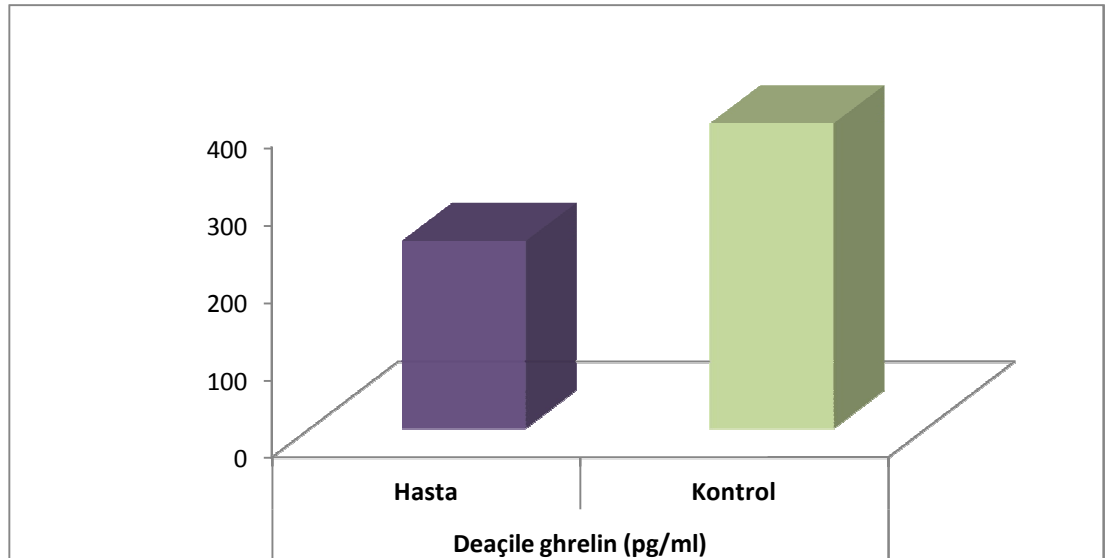
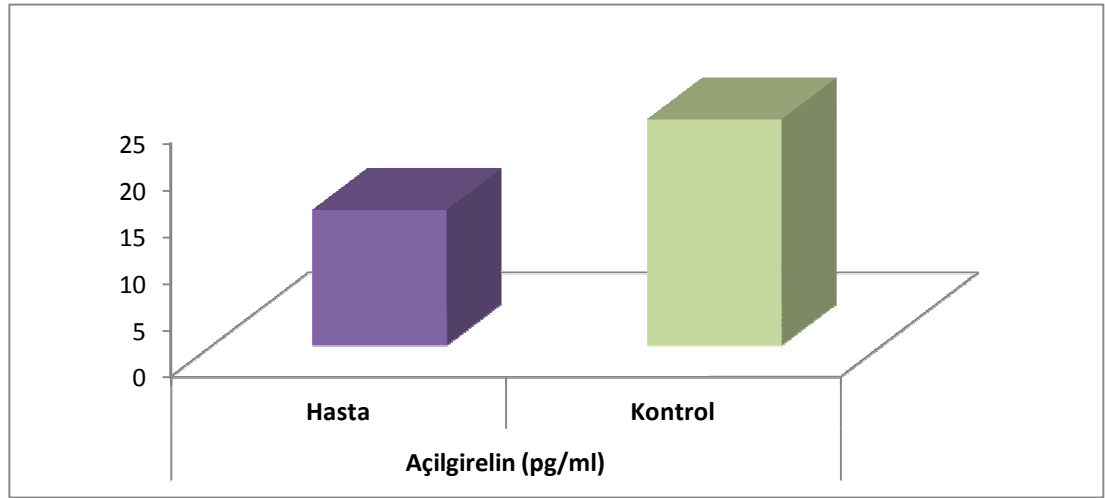
Açıl girelin değerleri; hasta grubunda 14.5±10.0 pg/ml ve kontrol grubunda 24.2±14.2 pg/ml olarak bulundu. Hasta ile kontrol grubunun açıl girelin değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (Şekil 13).

Deaçil girelin hasta grubunda 242.3±206 pg/ml ve kontrol grubunda 394.0±170 pg/ml olarak bulundu. Hasta grubu ile kontrol grubunun deaçil girelin değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (Şekil 14).

**Tablo 7.** Hasta ve kontrol grubunda açıl girelin ve deaçil girelin değerleri

	Hasta <sup>(a)</sup>	Kontrol <sup>(b)</sup>	p<0.05
<b>Açıl girelin</b>	14.5±10.0	24.2±14.2	
<b>(pg/ml, ±SD)</b>	(3.4-47.19)	(4.6-56.4)	a-b
<b>(alt-üst)</b>			+
<b>Deaçil girelin</b>	242.3±206.7	394±170.5	
<b>(pg/ml, ±SD)</b>	(47.5-804)	(88-680)	a-b
<b>( alt-üst)</b>			+

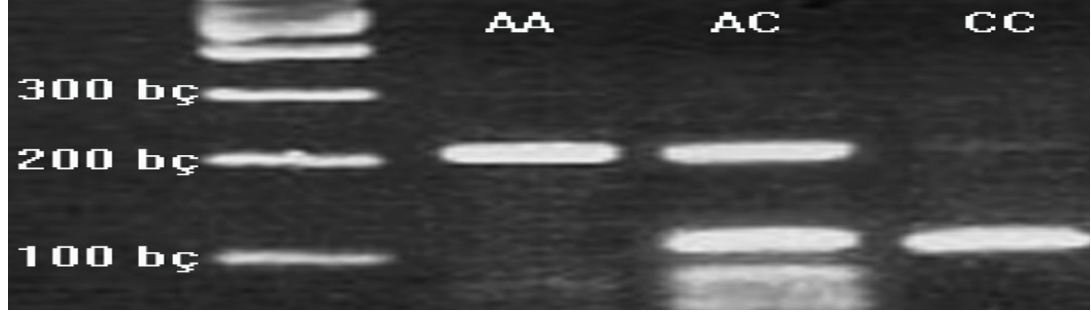
+p<0.05 anlamlı olarak değerlendirildi



**Şekil 4.** Hasta ve kontrol grubunda açıl ve deaçil girelin değerleri

### 3.4. Hasta ve Kontrol Grubunda Girelin Gen Polimorfizm Sıklıkları

Promoter -501 A/C polimorfizmi için genotip sıklıkları kontrolle karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu ( $X^2$ : 7.3, df:2, p=0.02) (Tablo 8). Hasta grubunda CC genotipinin artmış sıklığa sahip olduğu belirlendi. Ancak allel sıklıkları açısından anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $X^2$ : 0.6, df:1, p=0.4).



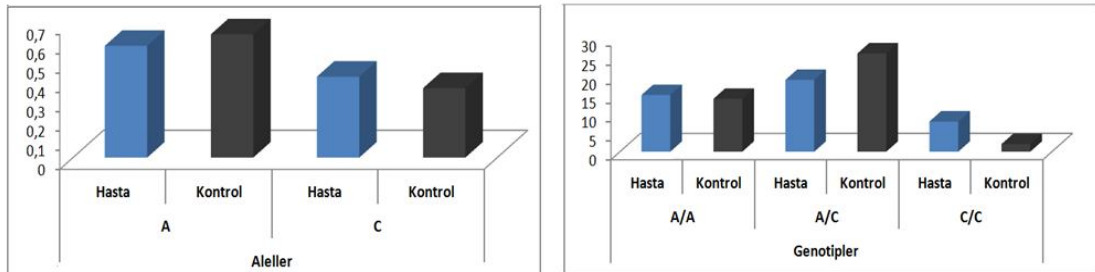
Sütun 1: 100 bç'lik DNA Boyut Belirteci, Sütun 2: vahşi tip allel; 205 bç, Sütun 3: Heterozigot mutasyon; 205 bç + 104 bç + 101 bç, Sütun 4: Homozigot mutasyon; 104 bç + 101 bç

**Şekil 5.** -501 A/C promoter polimorfizmi için PZR'ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü.

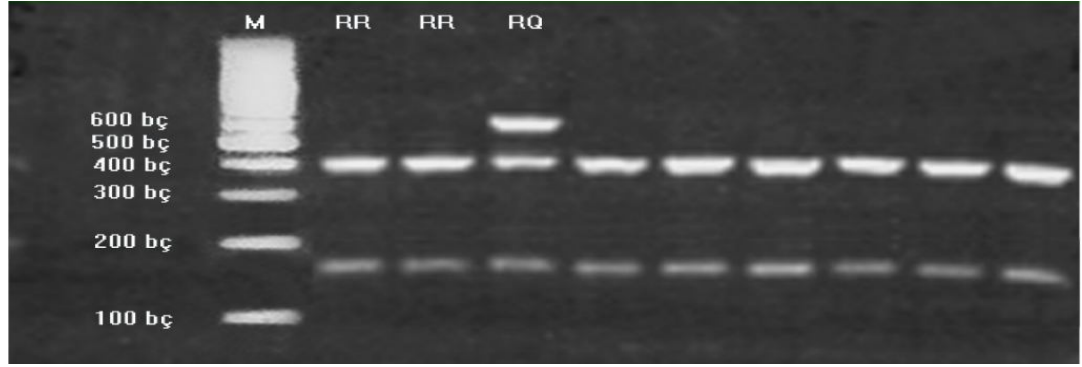
**Tablo 8. Hasta ve kontrol grubunda girelin promoter A/C polimorfizm genotiplerinin dağılımı**

Genotipler	A/A(%) <sup>(a)</sup>	A/C(%) <sup>(b)</sup>	C/C(%) <sup>(c)</sup>
Hasta (n=42) <sup>(1)</sup>	15 (35.7)	19 (45.2)	8 (19)
Kontrol (n=42) <sup>(2)</sup>	14 (33.3)	26 (61.9)	2 (4.7)
p<0.05	1a-2a	1b-2b	1c-2c <sup>+</sup>
<b>Alleller</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	
Kontrol (n=42) <sup>(2)</sup>	0.64	0.36	
Hasta (n=42) <sup>(1)</sup>	0.58	0.42	
p>0.005	1a-2a	1b-2b	

+p<0.05 anlamlı olarak değerlendirildi.



**Şekil 6.** Hasta ve kontrol grubunda girelin promoter A/C polimorfizm genotiplerinin dağılımı



Sütun1: 100 bç'lik DNA Boyut Belirteci, Sütun 2, 3 vahşi tip allel; 618 bç, Sütun 4; Heterozigot mutasyon; 455 bç ve 163 bç.

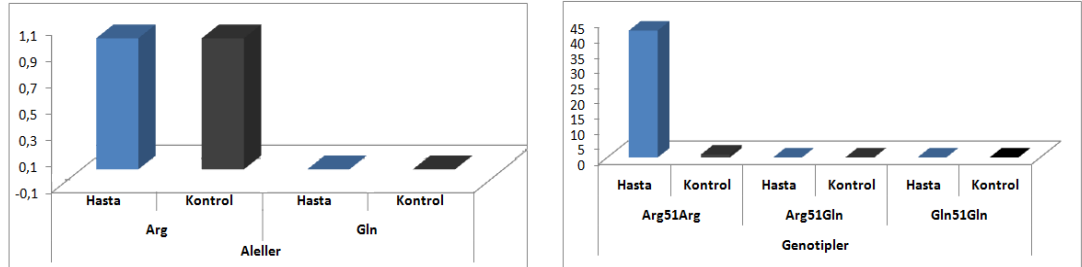
**Şekil 7.** Arg51Gln polimorfizmi için PZR'ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü.

**Tablo 9.** Hasta ve kontrol grubunda girelin Arg51Gln polimorfizm genotiplerinin dağılımı

Genotipler	Arg51Arg(%) <sup>(a)</sup>	Arg51Gln(%) <sup>(b)</sup>	Gln51Gln(%) <sup>(c)</sup>
Hasta (n=42) <sup>(1)</sup>	42	0	0
Kontrol (n=42) <sup>(2)</sup>	42	0	0
p>0.05	1a-2a	1b-2b	1c-2c
<b>Alleller</b>	<b>Arg</b>	<b>Gln</b>	
Hasta (n=42) <sup>(1)</sup>	1	0	
Kontrol (n=42) <sup>(2)</sup>	1	0	
p>0.05	1a-2a	1b-2b	

+p<0.05 anlamlı olarak değerlendirildi.

Girelin Arg51Gln polimorfizm için genotip ve allel sıklıkları kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (Tablo 9).



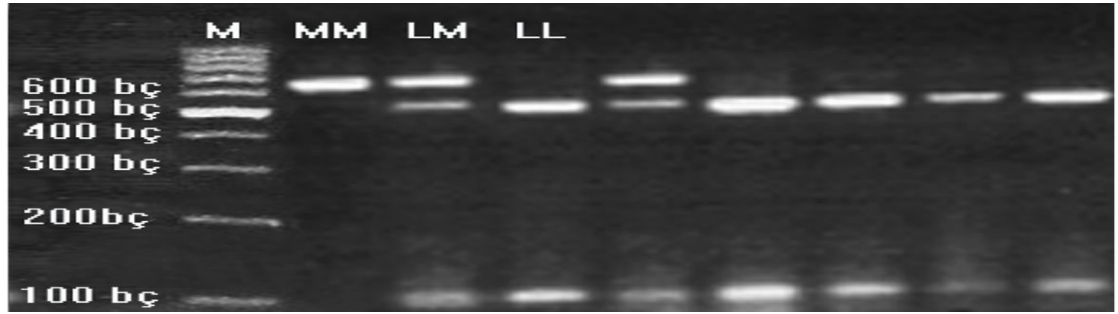
**Şekil 8.** Hasta ve kontrol grubunda girelin Arg51Gln polimorfizm genotiplerinin dağılımı

Girelin Leu72Met polimorfizm için genotip ve allel sıklıkları kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. Yapılan ki kare analizlerinde genotipler için  $X^2$ : 1.3, df:2, p=0.5 ve alleller için  $X^2$ : 0.0, df:1, p=1 değerleri bulundu (Tablo 10).

**Tablo 10.** Hasta ve kontrol grubunda girelin Leu72Met polimorfizm genotiplerinin dağılımı

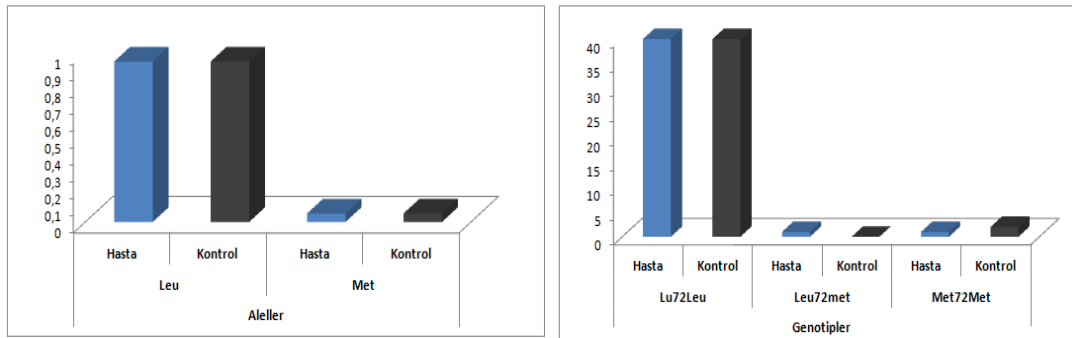
Genotipler	Leu72Leu (%)	Leu72Met (%)	Met 72Met (%)
Hasta (n=42)	40 (95.2)	1 (2.4)	1(2.4)
Kontrol (n=42)	40 (95.2)	0	2 (4.8)
p>0.05	1a-2a	1b-2b	1c-2c
<b>Alleller</b>	<b>Leu</b>	<b>Met</b>	
Hasta (n=42)	0.95	0.05	
Kontrol (n=42)	0.95	0.05	
p>0.05	1a-2a	1b-2b	

+p<0.05 anlamlı olarak değerlendirildi.



Sütun1: 100bç'lik DNA Boyut Belirteci, Sütun 2; Homozigot mutasyon 618 bç, Sütun 3; Heterozigot mutasyon; 618 bç+ 517bp +101bp, Sütun4: Vahşi tip allel; 517bp +101bp

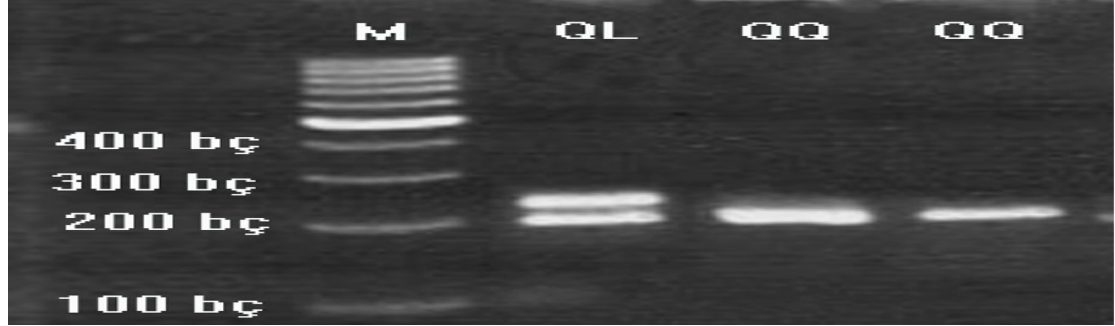
**Şekil 9.** Leu72Met polimorfizmi için PZR'ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü.



**Şekil 10.** Hasta ve kontrol grubunda girelin Leu72Met polimorfizm genotiplerinin dağılımı

Girelin Gln90Leu polimorfizm için genotip sıklıkları kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu (Tablo 11). Ancak allel sıklıkları

açısından konrolle hasta grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Yapılan ki kare analizlerinde genotipler için  $X^2$ : 8.1, df:2,  $p=0.01$  ve alleller için  $X^2$ : 3.5, df:1,  $p=0.058$  değerleri bulundu (Tablo 11).



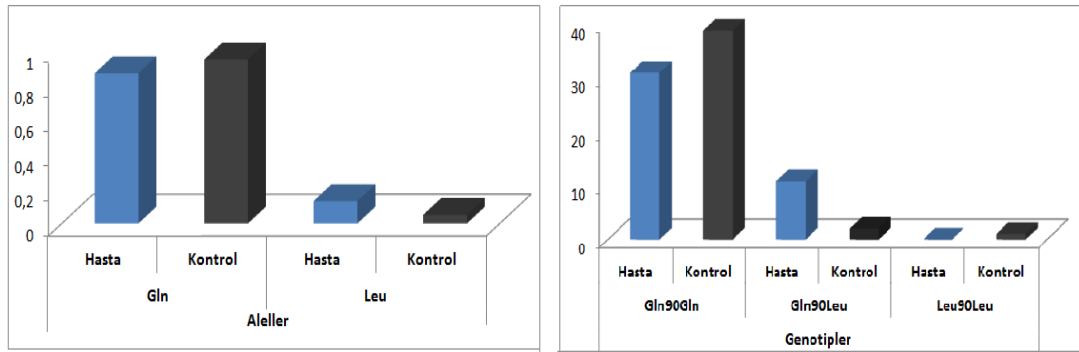
Sütun1: 100 bç'lik DNA Boyut Belirteci, Sütun 2 heterozigot allel; 228 bç, Sütun3-4; Vahşi tip allel: 228 bç + 95bp+33bp.

**Şekil 11.** Gln90Leu polimorfizmi için PZR'ye yönelik agaroz jel elektroforez görüntüsü

**Tablo 11.** Hasta ve kontrol grubunda girelin Gln90Leu polimorfizm genotiplerinin dağılımı

Genotipler	Gln90Gln (%) <sup>(a)</sup>	Gln90Leu (%) <sup>(b)</sup>	Leu90Leu (%) <sup>(c)</sup>
Hasta (n=42) <sup>(1)</sup>	31 (73.8)	11 (26.2)	0
Kontrol (n=42) <sup>(2)</sup>	39 (92.8)	2 (4.7)	1 (2.5)
$p<0.05$	1a-2a	1b-2b	1c-2c <sup>+</sup>
<b>Alleller</b>	<b>Gln</b>	<b>Leu</b>	
Hasta (n=42) <sup>(1)</sup>	0.87	0.13	
Kontrol (n=42) <sup>(2)</sup>	0.95	0.05	
$p>0.05$	1a-1b	1b-2b	

+ =  $p<0.05$  anlamlı olarak değerlendirildi.



**Şekil 12.** Hasta ve kontrol grubunda girelin Gln90Leu polimorfizm genotiplerinin dağılımı

#### 4. TARTIŞMA

Vitamin B12 eksikliği başta gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere, tüm dünyada önemli bir problem olmaya devam etmektedir. İnsidansı toplumdan topluma, farklı yaş gruplarına, sosyoekonomik düzeye, beslenme alışkanlıklarına göre farklılıklar gösterip, % 3 ile % 40 arasında belirtilmiştir (2). Dünyanın yoksul bölgelerinde, özellikle kırsal bölge çocuklarında beslenme yetersizliğine bağlı sıklığı %22-66 gibi yüksek bir orandadır (3). Amerika gibi gelişmiş ülkelerde dahi sıklığı 18/1225'dir (4, 84). Şanlıurfa'da sıklığı doğum öncesi gebe kadınlarda %72.3 ve yenidoğan bebeklerde %41.2 olarak bulunmuştur. Anne ve bebek serum vitamin B12 düzeyi arasında anlamlı korelasyon saptanmıştır (4, 5). Türkiye'de 7-17 yaş grubunda 960 çocukta vitamin B12 eksikliği %5.9 oranında saptanmıştır (5). Vitamin B12 eksikliğinin sık görülmesi ve görülme yaşının erken çocukluk dönemine ve hatta yenidoğan dönemine kadar doğru kayması nedeniyle bu konuya ilgide artış sözkonusudur.

Çalışmada vitamin B12 eksikliği tanılı grupta 22 kız (%52.4), 20 erkek (%47.6) olmak üzere 42 olgu değerlendirildi. Kontrol grubunda ise 19 kız (45.2) ve 23 erkek (%54.8) olmak üzere toplam 42 olgu değerlendirildi.

Vitamin B12 eksikliği ve DEA nutrisyonel anemidir. Vitamin B12 eksikliğinde iştah azalır (1). Demir eksikliği anemisinin prodromal fazında iştahta azalma beklenebilir (85).

Girelin iştah açıcı bir hormondur. İştah ve yiyecek alımını artırır (86, 87). Girelin açlık hormonudur. Yeme davranışı ile kilo dengesini düzenler (41). Gıda alımını uyarır (11, 32, 62, 63).

Nutrisyonel aneminin önemli nedenlerinden biri olan vitamin B12 eksikliğinde beslenme büyük rol oynar. Bizim çalışmamızda vitamin B12 eksikliği tanılı olgularda ve sağlıklı olgularda açlık açıl ve deaçil girelin düzeylerine bakıldı. Açıl girelin değerleri hasta grubunda  $14.5 \pm 10.0$  pg/ml ve kontrol grubunda  $24.2 \pm 14.2$  pg/ml olarak bulundu. Vitamin B12 eksikliği tanılı olgularda açıl girelin değerleri ile kontrol grubunun açıl girelin değerleri kıyaslandı. Belirtilen gruplar arasında açıl girelin değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p < 0.05$ ) (Tablo 11).

Deaçil girelin vitamin B12 eksikliği tanılı olgularda  $242.3 \pm 206.7$  pg/ml ve kontrol grubunda  $394.0 \pm 170.5$  pg/ml olarak bulundu. Vitamin B12 eksikliği tanılı olgularda deaçil girelin değerleri ile kontrol grubunun deaçil girelin değerleri kıyaslandı. Belirtilen gruplar arasında deaçil girelin değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p < 0.05$  (Tablo 7)).

Girelinin normal aralığı henüz tespit edilmemiştir. Ail girelin için  $32.6-65.2$  pg/ml ve deaçil girelin için ise  $300-430$  pg/ml'dir (12, 73). Ölçüm metodları tam belirlenemediği için bu aralık kit üretici firmalara göre değişmektedir (Phoenix ve Linco firmalarının kitlerinin yaptığı ölçümler arasında 10 kat fark bulunmaktadır) (88).

Çalışmamızda vitamin B12 eksikliği tanılı olguların açil ve deaçil girelin seviyesi kontrol grubuna göre düşük bulundu. Bu yüzden çalışmamızda azalmış gıda alımı sonucunda oluşan vitamin B12 eksikliğinde girelin seviyeleri düşük bulundu. Bu etkinin girelinin hipotalamustaki iştah merkezi üzerine olan etkisinden kaynaklandığı düşünöldü (59).

Wren ve ark. (41) sağlıklı normal kilolu erişkin gruba intravenöz girelin vererek plasebo ile karşılaştırdığında, girelin alanlarda yiyecek alımının çok arttığını göstermişlerdir.

Kasar (89)'ın demir eksikliği anemisi ve tedavisinin girelin, obestatin ve ısı șok proteini 70 üzerine yaptığı çalışmada hem açil hem de deaçil girelin düzeyleri DEA tanılı olgularda tedavi öncesinde, tedavi sonrası ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşük bulunmuştur. Gıda alımını uyardığı bilinen girelinin DEA gibi nutrisyonel anemide düşük seviyelerde bulunması, DEA gelişiminin nedenleri arasında olabileceğini düşöndürmüştür.

Akarsu ve ark. (13)'nin yaptığı çalışmada DEA'nin gelişiminin çeşitli dönemlerinde plazma girelin seviyelerinin ölçümünde Fe depolarına paralel olarak girelin düzeylerinde azalma izlenmiştir. Demir eksikliği anemisinde girelin seviyesindeki düşöklük iştah kaybının bir nedeni olabileceği ve bu durumun DEA'nin prodromal döneminde iştahta bir azalmaya neden olabileceği düşünölmüştür.

Isgüven ve ark. (90)'nin yapmış olduğu prepubertal DEA tanılı çocuklarda serum girelin seviyeleri ile ilgili çalışmada, DEA tanılı hastalarda kontrol grubuna

göre serum girelin seviyesi düşük bulunmuştur. Bu çalışmada muhtemel yeni başlangıçlı DEA'de girelin seviyesinin düşük olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda gıda alımını uyardığı bilinen girelinin, ana nedeni nutrisyonel olan vitamin B12 eksikliğinde düşük seviyelerde bulunması, girelinin bulunan bu düşük seviyesinin vitamin B12 eksikliği etyolojisi arasında olabileceğini düşündürmektedir.

Doğal toplumlarda pek çok etken genetik bilginin nesilden nesile geçiş biçimini etkileyerek toplumun genetik yapısını değiştirebilir. Genetik yapıyı değiştiren etkenlerin başlıcaları mutasyon, seleksiyon, göç, rastlantısal olmayan eşleşmedir. Bu etkenlerin hiç birinin bulunmadığı koşullarda ise toplumun genetik yapısı nesiller boyunca değişmeksizin korunur. Bu kavram ilk kez 1908 yılında, birbirlerinden tamamen bağımsız olarak, Hardy ve Weinberg tarafından aya konmuştur. Hardy-Weinberg yasasına mutasyon, seleksiyon ve göç gibi olayların meydana gelmediği yeterli büyüklükteki bir popülasyonda rastgele eşleşme koşullarında, ilk dölden itibaren gen ve genotip frekansları sabit kalır (91, 92).

Demir eksikliği anemisi genellikle kronik kan kaybı ve demirden eksik beslenme sonucu oluşan kazanılmış bir durum olarak kabul edilmektedir. Ancak yapılan bazı çalışmalarda demir metabolizmasıyla doğrudan veya dolaylı yoldan ilişkili olan bazı genlerdeki polimorfizmlerin DEA ile ilişkilerinin saptanması bazı gen polimorfizmlerinin etyolojide önemli rol oynayabileceğini göstermiştir. Bu genlerden bazıları hepsidin antimikrobiyal peptid (HAMP), transmembran proteaz serin 6 (TMPRSS6), insan hemokromatozis (HFE), doğal dirençle ilişkili makrofaj prtein 1 (NRAMP1) genleridir (93-95). Hepsidin (HAMP) geni bağırsaktan demir emiliminin düzenlenmesi ve makrofajlardan salınmasında görevli olan demir homeostasisinde temel rol oynayan bir genidir. Gendeki -582 A polimorfizminin genin azalmış ekspresyonuna neden olabileceği belirtilmiştir.

Bununla beraber yapılan bazı çalışmalarda oral demir verilmesine cevap vermeyen veya parenteral demir verilmesine kısmi olarak cevap veren demir eksikliğiyle karakterize bazı ailesel sendromlar da tanımlanmıştır. Bu sendromlardan biri iron-refractory iron deficiency anaemia (IRIDA) olup ve sendroma TMPRSS6 gen mutasyonlarının neden olduğu bulunmuştur. IRIDA ve TMPRSS6 gen polimorfizmleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (96).

Benzer şekilde vitamin B12 eksikliği daha çok beslenme bozukluğu nedeniyle kazanılmış bir durum olarak kabul edilmektedir. Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda vitamin B12 metabolizmasında direkt yada indirekt olarak yer alan bileşenlerin genlerindeki çeşitli mutasyonların eksikliğin etyolojisinde önemli rol oynayabileceğini göstermiştir. Vitamin B12 eksikliğinin beraber görüldüğü bazı sendromik durumlar vardır. Bu sendromlar Imerslund-Gräsbeck sendromu ve intrinsik faktör eksikliğidir. Imerslund-Gräsbeck sendromunda intrinsik faktör-vitamin B12 reseptörü olan cubilin genindeki ve Amnionless geninde mutasyonlar olduğu belirlenmiştir. İntrinsikfaktör eksikliğinde ise gastrik intrinsik faktör geninde mutasyonlar olduğu tespit edilmiştir (97, 98). Transkobalamin genindeki mutasyonlar benzer şekilde vitamin B12 eksikliğine neden olmaktadır (99). Bu sendromik durumlar dışında vitamin B12 eksikliği ve çeşitli genlerdeki polimorfizimler arasındaki ilişkilerin araştırıldığı çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmalar genellikle homosistein metabolizmasında bozukluklara neden olan genler üzerinde yoğunlaşmıştır. Özellikle MTHFR genindeki polimorfizimlerin homosistein metabolizmasını etkileyerek dolaylı yoldan vitamin B12 eksikliğinde önemli bir role sahip olabileceği belirtilmektedir (100).

Son zamanlarda insan genomundaki doğal genetik varyasyonlar ve bunların klinik ve fonksiyonel önemleriyle ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır. Bu ilerlemeler bize bazı multifaktoriyel hastalıkların oluşumunda ve ilerlemesinde rol oynayan genetik faktörlerin anlaşılmasında yol gösterici olacaktır. İnsan genomunda polimorfizimlerin çoğu fonksiyonel olarak nötraldir. Yani, genin oluşturduğu protein yapısını ya da fonksiyonunu etkilemezler. Bununla birlikte bazı polimorfizimler gen yapısındaki kodlayıcı alanları ya da düzenleyici bazı dizileri etkileyerek gen transkripsiyonu, mRNA stabilitesi, RNA uç birleştirme, protein yapısı ve fonksiyonunu etkileyebilmektedirler. Böyle değişiklikler hastalık yatkınlığını ve ciddiyetini artırma ya da azaltma, tedaviye cevap ve ilacın yan etkilerine karşı hassasiyet gibi farklı klinik etkiler aya çıkarabilirler (76).

İlk keşfedildiği 1999 yılından itibaren girelin ve hastalıklar arasındaki ilişkilerin araştırıldığı pek çok çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda girelin gen polimorfizimleri ve bazı hastalıklar arasında ilişkilerin olduğu bulunmuştur. Obezite, yeme bozuklukları, kardiovasküler hastalıklar,

ateroskleroz ve gastrointestinal hastalıklar gibi pek çok hastalıkta girelinin rolü olduğu gösterilmiştir (101-103).

Girelin genindeki mutasyonlar girelin proteininde defekte ya da inaktivasyonuna ve BH salgılanmasında ve enerji dengesinde değişikliğe neden olabilirler (81, 104). Yapılan farklı çalışmalarda girelin geninde DNA dizileme kullanılarak pek çok farklı tek nükleotid polimorfizmi tespit edilmiştir. Bunlardan en yaygın olanları promoter -501A/C, Arg51Gln, Leu72Met ve Gln90Leu şeklindedir (79, 80, 105)

Girelin gen polimorfizmleri ve farklı hastalıklar arasında ilişkilerin araştırıldığı pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların bir kısmında polimorfizmler ve hastalıklar arasında anlamlı ilişki bulunmasına rağmen diğerlerinde bulunmamıştır.

Literatürde şimdiye kadar çocuk ve erişkinlerde vitamin B12 eksikliğinde girelin gen polimorfizmini araştıran çalışmaya rastlamadık. Bundan dolayı bu çalışma ile vitamin B12 eksikliği tanılı ve sağlıklı olgular karşılaştırılarak girelin genindeki promoter -501A/C, Arg51Gln, Leu72Met ve Gln90Leu polimorfizmlerinin ile vitamin B12 eksikliği arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

Monteleone ve ark.'nın (106) 90 yeme bozukluğu olan ve 119 normal kilolu sağlıklı kadından oluşan çalışmasında, yeme bozukluğu olan grupta Leu72Met polimorfizmi sıklığı anlamlı derecede yüksek saptanmıştır. Miyasaka ve ark (107) yapmış olduğu çalışmada yeme bozukluğu olan 228 Japan hasta girelin reseptör geni 171T/C polimorfizmi açısından incelenmiştir. Bunların 96'sı anoreksiya nevroza, 116'sı bulimia nevroza ve geri kalan 16 hasta ise sınıflandırılmamıştır. Bulimia nevroza tanılı hastalarda kontrol grubuna göre GHSR gen polimorfizmi sıklığı yüksek bulunmuştur. Anoreksiya nevroza tanılı hastalarda kontrol grubuna göre fark bulunmamıştır.

Çalışmamızda promoter -501 A/C polimorfizm sıklığı; vitamin B12 eksikliği tanılı 42 olgunun 15'i (%35.7) A/A genotipine, 19'u (%45.2) A/C genotipine, 8'i (%19) C/C genotipine sahipti. Sağlıklı 42 olgunun 14'ü (%33.3) A/A genotipine, 26'sı (%61.9) A/C genotipine, 2'si C/C (%4.8) genotipine sahipti. Toplam 84 olgunun 29'u (%34.5) A/A genotipine, 45'i (%53.5) A/C genotipine,

10'u C/C (%11.9) genotipine sahipti. Vitamin B12 eksikliği tanımlı olgularda A allel sıklığı 0.58, sağlıklı olgularda 0.64 olarak bulundu. C allel sıklığı vitamin B12 eksikliği tanımlı olgularda 0.42 sağlıklı olgularda 0.36 olarak bulundu (Tablo 7, Şekil 5).

Çalışmamızda girelin genindeki -501 A/C polimorfizmi açısından genotip sıklıkları hasta ve kontrol grubu arasında karşılaştırıldığında CC genotipinin istatistiksel olarak anlamlı oranda hasta grubunda artmış sıklığa sahip olduğu bulundu. Ancak AA genotipi ve allel sıklıkları açısından gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmadı.

Bahadır (108)'ın yapmış olduğu demir eksikliği anemisinde girelin gen polimorfizmi çalışmasında hasta grubunda -501 A/C polimorfizmi için A allelinin artmış olduğu bulunmuş. A allelinin azalmış girelin düzeylerine neden olarak demir eksikliği anemisine neden olabileceği düşünülmüştür.

Monteleone ve (109) yapmış olduğu 173 anoreksiya veya bulimia nervozalı kadınla 119 sağlıklı Kafkas kadın Arg51Gln ve Leu72Met girelin gen polimorfizmi sıklığı açısından araştırılmıştır. Arg51Gln girelin gen polimorfizm sıklığı açısından; anoreksiya nervozalı 59 olgunun 59'u (%100) Arg51Arg genotipine, 114 bulimia nervozalı olgunun 113'ü (%99.2) Arg51Arg genotipine, 1 tanesi (%0.8) Arg51Gln genotipine sahip bulunmuştur. Sağlıklı 119 olgunun 117'si (%98.4) Arg51Arg genotipine, 2'si (%1.6) Arg51Gln genotipine sahip bulunmuştur. Anoreksiya, bulimia nervozalı ve sağlıklı olgularda Gln51Gln genotipi bulunmamıştır. Leu72Met girelin gen polimorfizm sıklığı açısından; anoreksiya nervozalı 59 olgunun 52'si (%91.6) Leu72Leu genotipine, 7'si Leu72Met genotipine, 114 bulimia nervozalı olgunun 103'ü (%90.4) Leu72Leu genotipine, 11'i (%9.6) Leu72Met genotipine sahip bulunmuştur. Sağlıklı 119 olgunun 109'u (%91.6) Leu72Leu genotipine, 10'u (%8.4) Leu72Met genotipine sahip bulunmuştur. Anoreksiya, bulimia nervozalı ve sağlıklı olgularda Met72Met genotipi bulunmamıştır. Bu çalışmada anoreksiya nervozalı ve bulimia nervozalı grupta Arg51Gln ve Leu72Met girelin gen polimorfizmi sıklığı kontrol grubuna göre anlamlı fark bulunmamıştır. Yapılan bu çalışmada Arg51Gln ve Leu72Met girelin gen polimorfizminin iştah ve yeme bozuklukları üzerine etkisi olmadığı bildirilmiştir.

Çalışmamızda Arg 51 Gln polimorfizimi hasta ve kontrol grubunda tespit edilmedi. Bu çalışmamızın sonucu Monteleone ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile benzer bulundu.

Zou ve ark. (110) kısa boylu Çinli çocuklarla yaptıkları çalışmada Leu72Met girelin gen polimorfizm sıklığını kontrol grubunda %34.4, hasta grubunda %39.9 olarak yüksek bulundu. Büyüme hormon eksikliği ve idiyopatik boy kısalığı olan çocuklarda Leu72Met genotipi ve allel sıklığı arasında anlamlı fark bulunmadı. Ancak BH eksikliği olan kısa boylu çocuklarda girelin düzeyleri anlamlı derecede düşük saptandı. Sonuç olarak girelinin BH sekresyonu üzerine etkisi olduğunu saptamışlardır. Ancak girelin genindeki polimorfizimin girelin düzeylerine katkısı olmadığını belirtmişlerdir. Ancak -501 promoter, Arg51Gln, Leu72Met ve Gln90Leu gen polimorfizimleri ile BH sekresyonu arasında ilişki olup olmadığı konusunda herhangi bir literatür verisi bulunmamaktadır.

Vivenza ve ark. (111) yapmış olduğu çalışmada 168 sağlıklı ve 81 obez çocukta girelin gen polimorfizimleri ve girelin, insulin, IGF-I, leptin ve antropometrik verileri araştırmışlar. 168 sağlıklı çocuğun 90'ında ve 81 obez çocuğun 81'inde Arg 51Gln, Leu72Met, Gln90Leu girelin gen polimorfizimleri çalışılmıştır. Gln90Leu girelin gen polimorfizm sıklığı açısından; 81 obez çocuktan 75'i (%92.6) Gln90Gln gentopine, 6'sı (%7.4) Gln90Leu genotipine, sağlıklı 90 olgunun olgunun 84'ü (%93.3) Gln90Gln gentopine 6'sı (%6.7) Gln90Leu genotipine sahip bulunmuştur. Arg51Gln girelin gen polimorfizm sıklığı açısından; 81 obez çocuktan 80'i (%98.8) Arg51Arg gentopine, 1 tanesi (%1.2) Arg51Gln genotipine, sağlıklı 90 olgunun olgunun 89'u (%98.9) Arg51Arg gentopine, 1 tanesi (%1.1) Arg51Gln genotipine sahip bulunmuştur. Leu72Met polimorfizmi sıklığı açısından; 81 obez çocuktan 69'u (%85.2) Leu72Leu gentopine, 12'si (%14.8) Leu72Met genotipine, sağlıklı 90 olgunun olgunun 89'u (%84.4) Leu72Leu gentopine, 14'ü (%15.6) Leu72Met genotipine sahip bulunmuştur. Sağlıklı ve obez çocuklarda Leu90Leu, Gln51Gln ve Met72Met genotipleri bulunmamıştır. Yapılan bu çalışmada obez hastalarda Gln90Leu, Arg51Gln ve Leu72Met girelin gen polimorfizimi sıklığı kontrol grubuna göre anlamlı fark bulunmamıştır. Yapılan bu çalışma sonucu girelin gen polimorfizminin total ve açıl girelin düzeylerine etkisinin olmadığı bildirilmiştir.

Çalışmamızda Leu72Met girelin gen polimorfizm sıklığı; Vitamin B12 eksikliği tanı 42 olgunun 40'ı (%95.2) Leu72Leu genotipine, 1'i (%2.4) Leu72Met genotipine, 1 tanesi (%2.4) Met72Met genotipine sahipti. Sağlıklı 42 olgunun 40'ı (%95.2) Leu72Leu genotipine, 2 tanesi (%4.8) Met72Met genotipine sahipti. Sağlıklı olgularda Leu72Met genotipi bulunmadı. Toplam 84 olgunun 80'i (%95.2) Leu72Leu genotipine, 1'i (%1.1) Leu72Met genotipine, 3'ü (%3.7) Met72Met genotipine sahipti. Leu72 allel sıklığı vitamin B12 eksikliği tanı olgularda 0.95 sağlıklı olgularda 0.95 olarak bulundu. Met72 allel sıklığı vitamin B12 eksikliği tanı olgularda 0.05 sağlıklı olgularda 0.05 olarak bulundu (Tablo 10, Şekil 10).

Çalışmamızda girelin Leu72Met polimorfizm için genotip ve allel sıklıkları kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Çalışmamızda Gln90Leu girelin gen polimorfizm sıklığı; Vitamin B12 eksikliği tanı 42 olgunun 31 (%73.8) Gln90Gln genotipine, 11'i (%26.2) Gln90Leu genotipine sahipti. Leu90Leu genotipine rastlanmadı. Sağlıklı 42 olgunun 39'u (%92.8) Gln90Gln genotipine, 2'ü (%4.7) Gln90Leu genotipine, 1'i (%2.5) Leu90Leu genotipine sahipti. Toplam 84 olgunun 70'i (%83.3) Gln90Gln genotipine, 13'ü (%15.4) Gln90Leu genotipine, 1'i (%1.3) sahipti. Gln90 allel sıklığı vitamin B12 eksikliği tanı olgularda 0.87, sağlıklı olgularda 0.95 olarak bulundu. Leu90 allel sıklığı vitamin B12 eksikliği tanı olgularda 0.13, sağlıklı olgularda 0.05 olarak bulundu (Tablo 11, Şekil 11).

Çalışmamızda girelin genindeki Gln90Leu polimorfizmi açısından genotip sıklıkları hasta ve kontrol grubu arasında karşılaştırıldığında heterozigot Gln/Leu genotipinin istatistiksel olarak anlamlı oranda hasta grubunda artmış sıklığa sahip olduğu bulundu.

Garcia ve ark (112)'nin yapmış olduğu çocuk ve erişkinlerde girelin gen polimorfizmi ve vücut ölçüleri ile ilgili çalışmada boy, kilo ve vücut kitle indeksi ile genotip veya fenotip olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Larsen ve ark. (113) Danimarka'lı olgular arasında yaptıkları çalışmada vücut kitle indeksi ve erken gelişen obezite ile Leu72Met polimorfizmi arasında ilişki olmadığını saptamışlardır.

Çalışmamızda DEA tanılı ve kontrol grubunda promoter -501A/C, Arg51Gln, Leu72Met ve Gln90Leu gen polimorfizimleri ile vücut ağırlığı, boy arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Bu sonuçlar Garcia ve ark. (112)'ı ile Larsen ve ark. (113)'nin sonuçlarına benzer bulundu.

Diğer bazı çalışmalarda ise obezite ve bazı girelin gen polimorfizimleri arasında anlamlı ilişkiler tespit edilmiştir. Ukkola ve ark. (114) yapmış olduğu obezitede Arg51Gln ve Leu72Met girelin gen polimorfizimleri ile ilgili 3 farklı araştırmada 3004 olgu retrospektif olarak incelenmiştir. Arg51Gln polimorfizimi ile obezite arasında ilişki bulunmamıştır. Leu72Met polimorfizimi obezite ile ilişkili bulunmuştur. Miraglia ve ark. (115) 300 obez ve 200 normal kilolu İtalyan çocuk ile yaptıkları çalışmada Met72 alleli olan çocukların homozigot Leu72 alleli olanlara göre daha erken yaşta obez olduklarını saptayarak Leu72Met polimorfizimi ile erken gelişen obezite arasında ilişki olduğunu göstermişlerdir.

Polimorfizimlerin değerlendirilmesinde kullanılan restriksiyon enzim uzunluk polimorfizm (RFLP) yöntemi gerçek zamanlı PZR gibi yöntemlerin gelişmesine rağmen halen spesifik, hızlı ve diğer yöntemlerle kıyaslandığında daha ekonomik bir şekilde polimorfizm ve mutasyonların tespitini sağlamaktadır. Çalışmamızda seçilen tüm polimorfizimlerin değerlendirilmesinde RFLP yöntemi kullanılmış ve tüm değerlendirilen polimorfizimler başarıyla genotiplendirilmiştir.

Vitamin B12 eksikliği tanılı hastalarda daha önce girelin gen polimorfizimleri çalışılmamıştır. Literatür değerlendirmemize göre bu tez, ilgili genlerdeki polimorfizimlerin vitamin B12 eksikliğinde çalışıldığı ilk çalışmadır.

Sağlıklı kontrolle karşılaştırıldığında vitamin B12 eksikliği hastalarında promoter -501 CC genotipinin ve Gln90 Leu polimorfizimi için heterozigot Gln/Leu genotipinin artmış sıklıkta olduğu tespi edildi. Girelin genindeki Arg51Gln, Leu72Met polimorfizimleri hasta ve kontrol grubunda benzer sıklıklarda bulunmuş ve istatistiksel olarak hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında her iki polimorfizm için anlamlı bir farklılık elde edilmemiştir. Gözlenen bu bulguların daha anlamlı olması için daha fazla olgudan oluşan ve daha homojen grupların oluşturulduğu yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu nedenle sağlıklı ve sayıca fazla olan Türk olgu grubunda önce normal değerler belirlenmelidir. Daha sonra diğer

toplumların verileri ile karşılaştırılmalıdır. Elde edilen normal veriler ile vitamin B12 eksikliği verileri kıyaslanmalıdır.

-501 A/C promoter bölgesiyle ilgili olarak AA, A/C yada CC genotiplerinin ve Gln90 Leu polimorfizimi ile ilgili genotiplerin girelin genin ekspresyon düzeylerine etkisinin araştırılacağı çalışmaların yapılması bu gen polimorfizmlerinin önemini anlaşılmasına yardımcı olacaktır.

Vitamin B12 eksikliği tanısı alan çocuklarda ve sağlıklı kontrol grubunda girelin promoter -501 A/C, Arg51Gln, Leu72Met ve Gln90Leu gen polimorfizminin sıklığı araştırıldı. Bu şekilde, toplumumuzda sağlıklı çocuklarda; girelin gen polimorfizmi oranı belirlenmek istendi.

Girelin geninin vitamin B12 eksikliği immünojenetiğinde önemli rolleri olabileceğini düşünmekteyiz. Bu gende yer alan diğer polimorfizmlerin hastalığa katkı sağlayıp sağlamadığının belirlenmesi için gerek Türk populasyonunda gerekse diğer populasyonlarda yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu kanatındeyiz. Çalışmada elde edilen verilerin doğrulanabilmesi için aynı polimorfizmlerin farklı toplumlarda vitamin B12 eksikliği hastalarında çalışılarak verilerimizin daha fazla araştırılmayla desteklenmesi gerekmektedir.

Bulgularımız vitamin B12 eksikliğinde düşük girelinin vitamin B12 eksikliği gelişimine katkıda bulunabileceğini düşündürdü. Yinede altta yatan mekanizmaya ait sebep-sonuç ilişkisini açıklamak zordur. Gözlenen bu bulguların daha anlamlı olması için daha fazla olgudan oluşan ve daha homojen grupların oluşturulduğu yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 5. KAYNAKLAR

1. Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D, Look AT. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. 6 th ed. Philadelphia: W&B Saunders Comp, 2003: 385-415.
2. Dharmarajan TS, Norkus EP. Approaches to vitamin B12 deficiency; early treatment ay prevent devastating complications. Postgraduate Med 2001; 10: 99-105.
3. Siekman JH, Allen LH, Bwibo NO, Demment MW, Murpy SP, Neumann CG. Kenyan school children have multiple micronutrient deficiencies but increased plasma vitamin B12 is the only detectable micronutrient esponse to meat or milk supplementation. J Nutr 2003; 123: 3972-3980.
4. Koc A, Kocyigit A, Soran M, Demir N, Sevinc E, Erel O, Mil Z. High frequency of maternal vitamin B12 deficiency as an impant cause of infantile vitamin B12 deficiency in Sanliurfa province of Turkey. Eur J Nutr 2006; 12: 291-297.
5. Wetherilt H, Ackurt F, Brubacher G, Okan B, Aktas S, Turdu S. Blood vitamin and mineral levels in 7-17 years old Turkish children. Int J Vitam Nutr Res 1992; 62: 21-29.
6. Hall CA. Function of vitamin B12 in the central nervous system as revealed by congenital defects. Am J Hematol 1990; 34: 121-127.
7. Healton EB, Savage DG, Brust JCM. Neurologic aspects of cobalamin deficiency. Medicine 1991; 70: 229-245.
8. Malaguarnera M, Ferri R, Bella R, Alagona G, Carnemolla A, Pennisi G. Homocysteine, vitamin B12 and folate in vascular dementia and in Alzheimer disease. Clin Chem Lab Med 2004; 42: 1032-1035.
9. Austin RC, Lentz SR, Werstuck GH. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. Cell Death Differ 2004; 11: 56-64.

10. Herrmann W, Schoor H, Purschwitz K, Rassoul F, Richter V. Total homocysteine, vitamin B12, and total antioxidant status in vegetarians. *Clin Chem* 2001; 47: 1094-1101.
11. Druce M, Bloom SR. The regulation of appetite. *Arch Dis Child* 2006; 91: 183-187.
12. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660.
13. Akarsu S, Ustundag B, Gurgoze MK, Sen Y, Aygun AD. Plasma ghrelin levels in various stages of development of iron deficiency anemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007; 29: 384-387.
14. Whitehead VM, Rosenblatt DS, Cooper BA. Megaloblastic Anemia. *Çn. Nathan DG, Orkin SH. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. 6 th ed, W.B. Saunders Co, 2003: 419-455.*
15. Herbert V. Vitamin B12; plant sources, requirements, and assay. *Am J Clin Nutr* 1988; 48: 852-858.
16. Koç A. Çocukluk çağında vitamin B12 eksikliği. *Türkiye Klinikleri J Pediatri* 2005; 1: 16-27.
17. Sandberg DP, Begely J, Hall CA. The content, binding, and forms of vitamin B12 in milk. *Am J Clin Nutr* 1981; 34: 1717.
18. Trugo N, Sardinha F. Cobalamin and cobalamin-binding capacity in human milk. *Nutr Res* 1994; 14: 22-33.
19. Food and Nutrition Board, I.O.M. Vitamin B12. Dietary Reference Intakes: Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington D.C.: National Academy Press, 1998: 306-356.
20. Fenech M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutat Res* 2001; 475: 57-67.

21. Matsui SM, Mahoney MJ, Rosenberg LE. The natural history of the inherited methylmalonic acidemias. *N Engl J Med* 1983; 308: 857-861.
22. Wickramasinghe SN, Fida S. Bone marrow cells from vitamin B12 and folate deficient patients misincorporate uracil into DNA. *Blood* 1994; 83: 1656-1666.
23. Fenech M, Perepetskaya G, and Mikhalevich L. A more comprehensive application of the micronucleus technique for biomonitoring of genetic damage rates in human populations-experiences from the Chernobyl catastrophe. *Environ Mol Mutagen* 1997; 30: 112-118.
24. Groff J, Gropper S. *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. Wadsworth 2000; 231-238.
25. Quadros EV, Rothenberg SP, Pan YC, Stein S. Purification and molecular characterization of human transcobalamin II. *J Biol Chem* 1986; 26: 154-155.
26. Sonja AR, Paul MF, Kelley SS, Vitamin B12 deficiency in children and adolescents. *J Pediatr* 2001; 138: 10-17.
27. Adkins Y, Lönnerdal B. Mechanisms of vitamin B12 absorption in breast-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 35: 192-198.
28. Rosenblatt DS, Whitehead VM. Cobalamin and folate deficiency; Acquired and hereditary disorders in children. *Semin Hematol* 1999; 36: 19-34.
29. Stabler SP, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J. Clinical spectrum, diagnosis of cobalamin deficiency. *Blood* 1990; 76: 871-881.
30. Kuzminski AM, Del Giacco EJ, Allen RH, Stabler SP, Lindenbaum J. Effective treatment of cobalamin deficiency with oral cobalamin. *Blood* 1998; 92: 1191-1198.
31. Grattan-Smith PJ, Wileken B, Procopis PG, Wise GA. The neurological syndrome of infantile cobalamin deficiency: developmental regression and involuntary movements. *Mov Disord* 1997; 12: 39-41.
32. Crane MG, Sample C, Pathcett S. Nutritional vitamin B12 deficiency in infants. *Am J Dis Child* 1981; 135-137.

33. Schenck UV, Bender-Götze C, Koletzko B. Persistence of neurological damage induced by dietary vitamin B12 deficiency in infancy. *Arch Dis Child* 1997; 77: 137- 139.
34. Scalabrino G. Subacute combined degeneration one century later. The neurotrophic action of cobalamin (vitamin B12) revisited. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60: 109-120.
35. Stollhoff K, Schulte FJ. Vitamin B12 and brain development. *Eur J Pediatr* 1987; 146: 201-205.
36. Hvas AM, Nexø E. Diagnosis and treatment of vitamin B12 deficiency, An update. *Haematologica* 2006; 91: 1506-1512.
37. Mason JB, Goldman L, Ausiello D. Vitamins, trace minerals, and other micronutrients. *Cecil Medicine*. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier 2007; 23: 237-239.
38. Mc Kee K, Tan C, Palyha O, Liu J, Feighner S, Hreniuk D. Cloning and characterization of two human G protein-coupled receptor genes (GPR38 and GPR39) related to the growth hormone secretagogue and neurotensin receptors. *Genomics* 1997; 46: 426-434.
39. Jeffery PL, Duncan RP, Yeh AH, Jaskolski RA, Hammond DS, Herington AC, et al. Expression of the ghrelin axis in the mouse: an exon 4-deleted mouse proghrelin variant encodes a novel C terminal peptide. *Endocrinology* 2005; 146: 432-440.
40. Casanueva FF, Dieguez C. Ghrelin: the link connecting growth with metabolism and energy homeostasis. *Rev Endocr Metab Disord* 2002; 3: 325-338.
41. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5992-5994.
42. Soares JB, Leite-Moreira AF. Ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin: three pieces of the same puzzle. *Peptides* 2008; 29: 1255-1270.

43. Tang SQ, Jiang QY, Zhang YL, Zhu XT, Shu G, Gao P, et al. Obestatin: its physicochemical characteristics and physiological functions. *Peptides* 2008; 29: 639-645.
44. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, et al. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4753-4758.
45. Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept* 2002; 107: 63-69.
46. Akamizu T, Shinomiya T, Irako T, Fukunaga M, Nakai Y, Nakai Y, et al. Separate measurement of plasma levels of acylated and desacyl ghrelin in healthy subjects using a new direct ELISA assay. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6-9.
47. Hosoda H, Doi K, Nagaya N, Okumura H, Nakagawa E, Enomoto M, et al. Optimum collection and storage conditions for ghrelin measurements: octanoyl modification of ghrelin is rapidly hydrolyzed to desacyl ghrelin in blood samples. *Clin Chem* 2004; 50: 1077-1080.
48. Iglesias MJ, Salgado A, Pineiro R, Rodino BK, Otero MF, Grigorian L, et al. Lack of effect of the ghrelin gene-derived peptide obestatin on cardiomyocyte viability and metabolism. *J Endocrinol Invest* 2007; 30: 470-476.
49. Burdyga G, Varro A, Dimaline R, Thompson DG, Dockray GJ. Ghrelin receptors in rat and human nodose ganglia: putative role in regulating CB-1 and MCH receptor abundance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: 1289-1297.
50. Leite-Moreira AF, Soares JB. Physiological, pathological and potential therapeutic roles of ghrelin. *Drug Discov Today* 2007; 12: 276-288.
51. Matsumoto M, Hosoda H, Kitajima Y, Morozumi N, Minamitake Y, Tanaka S, et al. Structure-activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287: 142-146.

52. Chanoine JP, Wong AC, Barrios V. Obestatin, acylated and total ghrelin concentrations in the perinatal rat pancreas. *Horm Res* 2006; 66: 81-88.
53. Korbonits M, Ciccarelli E, Ghigo E, Grossman A. The growth hormone secretagogue receptor. *Growth Horm* 1979; 9: 93-99.
54. Poykko S, Ukkola O, Kauma H, Savolainen MJ, Kesaniemi YA. Ghrelin Arg51Gln mutation is a risk factor for Type 2 diabetes and hypertension in a random sample of middle-aged subjects. *Diabetologia* 2003; 46: 455-458.
55. Popovic V, Miljic D, Micic D, Damjanovic S, Arvat E, Ghigo E, et al. Ghrelin main action on the regulation of growth hormone release is exerted at hypothalamic level. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3450-3453.
56. Samson WK, White MM, Price C, Ferguson AV. Obestatin acts in brain to inhibit thirst. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292: 637-643.
57. Yamamoto D, Ikeshita N, Daito R, Herningtyas EH, Toda K, Takahashi K, et al. Neither intravenous nor intracerebroventricular administration of obestatin affects the secretion of GH, PRL, TSH and ACTH in rats. *Regul Pept* 2007; 138: 141-144.
58. Ruter J, Kobelt P, Tebbe JJ, Avsar Y, Veh R, Wang L, et al. Intraperitoneal injection of ghrelin induces Fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. *Brain Res* 2003; 991: 26-33.
59. Cummings DE, Frayo RS, Marmonier C, Aubert R, Chapelot D. Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: 297-304.
60. Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, Sakamaki R, Shinfuku N, Ueta Y, et al. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut* 2005; 54: 18-24.
61. Chen CY, Chao Y, Chang FY, Chien EJ, Lee SD, Doong ML. Intracisternal desacyl ghrelin inhibits food intake and non-nutrient gastric emptying in conscious rats. *Int J Mol Med* 2005; 16: 695-699.

62. Matsuda K, Miura T, Kaiya H, Maruyama K, Shimakura S, Uchiyama M, et al. Regulation of food intake by acyl and des-acyl ghrelins in the goldfish. *Peptides* 2006; 27: 2321-2325.
63. Green BD, Irwin N, Flatt PR. Direct and indirect effects of obestatin peptides on food intake and the regulation of glucose homeostasis and insulin secretion in mice. *Peptides* 2007; 28: 981-987.
64. Lagaud GJ, Young A, Acena A, Mon MF, Barrett TD, Shankley NP. Obestatin reduces food intake and suppresses body weight gain in rodents. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357: 264-269.
65. Penicaud L, Leloup C, Fioramonti X, Lorsignol A, Benani A. Brain glucose sensing: a subtle mechanism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006; 9: 458-462.
66. Salehi A, Dornonville de la Cour C, Hakanson R, Lundquist I. Effects of ghrelin on insulin and glucagon secretion: a study of isolated pancreatic islets and intact mice. *Regul Pept* 2004; 118: 143-150.
67. Gauna C, Delhanty PJ, Hofland LJ, Janssen JA, Broglio F, Ross RJ, et al. Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 1055-1060.
68. Qader SS, Hakanson R, Rehfeld JF, Lundquist I, Salehi A. Proghrelin-derived peptides influence the secretion of insulin, glucagon, pancreatic polypeptide and somatostatin: a study on isolated islets from mouse and rat pancreas. *Regul Pept* 2008; 146: 230-237.
69. Heijboer AC, Van Den Hoek AM, Parlevliet ET, Havekes LM, Romijn JA, et al. Ghrelin differentially affects hepatic and peripheral insulin sensitivity in mice. *Diabetologia* 2006; 49: 732-738.
70. Date Y, Murakami N, Kojima M, Kuroiwa T, Matsukura S, Kangawa K, et al. Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275: 477-480.
71. Kaiya H, Darras V, Kangawa K. Ghrelin in Birds: Its structure, distribution and function. *J Poultry Sci* 2007; 44: 18-22.

72. Beck B, Richy S, Stricker-Krongrad A. Feeding response to ghrelin agonist and antagonist in lean and obese Zucker rats. *Life Sci* 2004; 76: 473-478.
73. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 2005; 85: 495-522.
74. Peino R, Baldelli R, Toshinai K, Matsukura S, Nijima A, Matsua H, et al. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastro* 2002; 123: 1120-1128.
75. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409: 194-198.
76. Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Smith JD, Kruglyak L, Nickerson DA. Additional SNPs and linkage-disequilibrium analyses are necessary for whole-genome association studies in humans. *Nat Genet* 2003; 33: 518-521.
77. Bottema CD, Sommer SS. PCR amplification of specific alleles: rapid detection of known mutations and polymorphisms. *Mutat Res* 1993; 288: 93-102.
78. Wajnrajch MP, Ten IS, Gertner JM, Leibel RL. Genomic organization of human ghrelin gene. *J Endocr Genet* 2000; 1:231–233.
79. Dossus L, McKay JD, Canzian F, Wilkening S, Rinaldi S, Biessy C, et al. Polymorphisms of genes coding for ghrelin and its receptor in relation to anthropometry, circulating levels of IGF-I and IGFBP-3, and breast cancer risk: a case-control study nested within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Carcinogenesis* 2008; 29: 1360-1366.
80. Mager U, Kolehmainen M, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, et al. Association between ghrelin gene variations and blood pressure in subjects with impaired glucose tolerance. *Am J Hypertens* 2006; 19: 920-926.
81. Lee DY, Kim SY, Jo DS, Hwang PH, Kang KP, Lee S, et al. Proghrelin Leu72Met polymorphism predicts a lower rate of developing renal dysfunction in type 2 diabetic nephropathy. *Eur J Endocrinol* 2006; 155: 187-190.

82. Steinle NI, Pollin TI, O'Connell JR, Mitchell BD, Shuldiner AR. Variants in the ghrelin gene are associated with metabolic syndrome in the Old Order Amish, *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6672-6677.
83. Booth IW, Aukett MA. Iron deficiency anaemia in infancy and early childhood. *Arch Dis Child* 1997; 76: 549-553.
84. Ramussen SA, Fernhoff PM, Scanlon KS. Vitamin B12 Deficiency in Children and Adolescents. *J Pediatr* 2001; 138: 7-10.
85. Jarkovska Z, Krsek M, Rosicka M, Marek J. Endocrine and metabolic activities of a recently isolated peptide hormone ghrelin, an endogenous ligand of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrine Regulations* 2004; 38: 80-86.
86. Date Y, Nakazato M, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280: 904-907.
87. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001; 50: 1714-1719.
88. Groschl M, Uhr M, Kraus T. Evaluation of the comparability of commercial ghrelin assays. *Clin Chem* 2004; 50: 457-458.
89. Kasar T. Demir eksikliği anemisi ve tedavisinin ghrelin, obestatin ve ısı şok proteini 70 üzerine etkisi. *Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, 2010.*
90. Isguven P, Arslanoglu I, Erol M, Yildiz M, Adal E, Erguven M. Serum levels of ghrelin, leptin, IGF-I, IGFBP-3, insulin, thyroid hormones and cortisol in prepubertal children with iron deficiency. *Endocr J* 2007; 54: 985-990.
91. Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, and Piazza A. *The History and Geography of Human Genes*, Princeton University Press 1994; 11-125.
92. Oraler GI. *Temel Genetik*. 8. Basım, İ.Ü. Fen Fakültesi, İstanbul, 1990; 215: 51-249.

93. Beutler E, Van Geet C, Loo DM, Gelbart T, Crain K, Truksa J, Lee PL. Polymorphisms and mutations of human TMPRSS6 in iron deficiency anemia. *Blood Cells Mol Dis* 2010; 44: 16-21.
94. Parajes S, Gonzalez-Quintela A, Campos J, Quinteiro C, Dominguez F, Loidi L. Genetic study of the hepcidin gene (HAMP) promoter and functional analysis of the c.-582A > G variant. *BMC Genet* 2010; 11: 110-111.
95. Terada CT, Santos PC, Cancado RD, Rostelato S, Lopreato FR, Chiattoni CS, and Guerra-Shinohara EM. Iron deficiency and frequency of HFE C282Y gene mutation in Brazilian blood donors. *Transfus Med* 2009; 19: 245-251.
96. Delbini P, Vaja V, Graziadei G, Duca L, Nava I, Refaldi C, Cappellini MD. Genetic variability of TMPRSS6 and its association with iron deficiency anaemia, *Br J Haematol* 2010; 151: 281–284.
97. Ament AE, Li Z, Sturm AC, Perko JD, Lawson S, Masterson M, et al. Juvenile cobalamin deficiency in individuals of African ancestry is caused by a founder mutation in the intrinsic factor gene GIF. *Br J Haematol* 2009; 144: 622-624.
98. Leunbach TL, Johansen P, Tanner SM, Gräsbeck R, Helgestad J. Homozygous mutation in the intrinsic factor gene in a child with severe vitamin B12 deficiency. *Ugeskr Laeger* 2011; 173: 2047-2048
99. Carmel R, Parker J, Kelman Z. Genomic mutations associated with mild and severe deficiencies of transcobalamin I (haptocorrin) that cause mildly and severely low serum cobalamin levels. *Br J Haematol* 2009; 147: 386-391.
100. Kanth VV, Golla JP, Sastry BK, Naik S, Kabra N, Sujatha M. Genetic interactions between MTHFR (C677T), methionine synthase (A2756G, C2758G) variants with vitamin B12 and folic acid determine susceptibility to premature coronary artery disease in Indian population. *J Cardiovasc Dis Res* 2011; 3: 156-163.
101. Yi CX, Heppner K, Tschop MH. Ghrelin in Eating Disorders. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 36: 2-7.
102. Isgaard J, Granata R. Ghrelin in cardiovascular disease and atherogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 340: 59-64.

103. Jeffery P, McDonald V, Tippett E, McGuckin M. Ghrelin in Gastrointestinal Disease. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 340: 35-43.
104. Adachi H, Hirai Y, Fujiura Y, Matsuoka H, Satoh A, Imaizumi T. Plasma homocysteine levels and atherosclerosis in Japan. *Stroke* 2002; 33: 2177-2181.
105. Korbonits M, Gueorguiev M, O'Grady E, Lecoer C, Swan DC, Mein CA, et al. A variation in the ghrelin gene increases weight and decreases insulin secretion in tall, obese children. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4005-4008.
106. Monteleone P, Torella A, Castaldo E, Di Filippo C, Maj M. The Leu72Met polymorphism of the ghrelin gene is significantly associated with binge eating disorder. *Psychiatr Genet* 2007; 17: 13-16.
107. Miyasaka K, Hosoya H, Sekime A, Ohta M, Amono H, Matsushita S, et al. Association of ghrelin receptor gene polymorphism with bulimia nervosa in a Japanese population. *J Neural Transm* 2006; 113: 1279-1285.
108. Bahadır E. Demir eksikliği anemisinde ghrelin gen polimorfizmi. Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, 2011.
109. Monteleone P, Torella A, Castaldo E, Di Filippo C, Maj M. No association of the Arg51Gln and Leu72Met polymorphisms of the ghrelin gene with anorexia nervosa or bulimia nervosa. *Neurosci Lett* 2006; 398: 325-327.
110. Zou CC, Huang K, Liang L, Zhao ZY. Polymorphisms of the ghrelin/obestatin gene and ghrelin levels in Chinese children with sh stature. *Clin Endocrinol* 2008; 69: 99-104.
111. Vivenza D, Rapa A, Castellino N, Bellone S, Petri A, Vacca G, et al. Ghrelin gene polymorphisms and ghrelin, insulin, IGF-I, leptin and anthropometric data in children and adolescents. *Eur J Endocrinol* 2004; 151: 127-133.
112. Garcia EA, Heude B, Petry CJ, Gueorguiev M, Hassan-Smith ZK, Spanou A, et al. Ghrelin receptor gene polymorphisms and body size in children and adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 4158-4161.

113. Larsen LH, Gjesing AP, Sorensen TI, Hamid YH, Echwald SM, Toubro S, et al. Mutation analysis of the preproghrelin gene: no association with obesity and type 2 diabetes. *Clin Biochem* 2005; 38: 420-424.
114. Ukkola O, Ravussin E, Jacobson P, Perusse L, Rankinen T, Tschop M, et al. Role of ghrelin polymorphisms in obesity based on three different studies. *Obes Res* 2002; 10: 782-791.
115. Miraglia GE, Santoro N, Cirillo G, Raimondo P, Grandone A, D'Aniello A, et al. Molecular screening of the ghrelin gene in Italian obese children: the Leu72Met variant is associated with an earlier onset of obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28: 447-450.

## 6. EKLER

### (Hekimin Açıklaması)

Vitamin B12 eksikliği tanılı çocuklarda girelin gen polimorfizmi varlığı araştırılacaktır. Polimorfizm bir gen veya DNA dizisinin (genetik kodlamaların) alternatif formlarından (allel) birinin toplumda %1'den fazla bulunduğu durumdur. Araştırma sonucu vitamin B12 eksikliği olan hastalarda hastalığın nedeni ile ilgili bir bilgi elde edilmiş olacak.

Araştırmanın ismi: Vitamin B12 eksikliğinde girelin gen polimorfizmi.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak hemen söyleyelim ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Araştırmaya davet edilmenizin nedeni çocuğunuzda vitamin B12 eksikliği tanısının bulunmasıdır. F.Ü. Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji BD, Tıbbi Biyoloji AD ve Biyokimya AD'nın ortak katılımı ile hastalığın tanı ve tedavisi çalışmaya katılmayan her bir hastada alınanlar gibi rutin kan tahlilleri ile yapılacaktır. Anemi (Kansızlık) hemoglobin miktarının yaş ve cinsiyete göre dünya sağlık örgütü tarafından kabul edilen değerlerin altında kalmasıdır. 3-6 ay 9.5 g/dL, 6 ay-6 yaş arası çocuklarda 11 g/dL'nin altı, 6-14 yaşlarda 12 g/dL'nin altı anemidir. 14 yaş üstü kızlarda alama hemoglobin 14 g/dL ve erkeklerde ise 16 g/dL olmalıdır. Normal vitamin B12 serum düzeyi 200-900 pg/ml'dir. 200 pg/ml altı vitamin B12 eksikliğini gösterir.

Sizin çocuğunuz için etkin olacak tedavi şekli doktorunuz tarafından belirlenecektir. Çocuğunuzla birlikte çalışmaya katılmanızda tanıyı koymak için tüm hastalarda yapılan kan tetkikleri yapıp, tedavileri diğer hastalar gibi yapılacaktır. Rutin tanı için alınan 4 ml kandaki serumdan girelin düzeyi ve 3 ml kandaki plazmadan girelin gen polimorfizmi çalışılacaktır. Bu çalışmalar sırasında çocuğunuzdan fazladan kan alınmayacak kendi sağlığı açısından gerekli rutin kontrolü sırasında alınan kanlardan hormon düzeyi ve gen polimorfizmi çalışılacaktır. Biyokimyasal parametreler hastanın rutin kontrol dosyasından elde edilecektir. Çocuğunuzla birlikte tam 40 çocuğun tedavisi benzer testler yapılarak tarafımızdan gerçekleştirilecektir.

**Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler:**

1-) İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirsiniz.

2-) Az bir ihtimal de olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması veya enfeksiyon riski vardır.

**Tedavi sırasında oluşabilecek riskler:** Kas içi kullanımda ise zerk yerinde ağrı, iltihaplanma olabilir. Vitamin B12 kan potasyum seviyesini düşürüp, trombosit (pıhtılaşma pulcukları) sayısını artırabilir. Tüm bu belirtilen basit yan etkiler çocuğunuza ve çalışmaya katılmayan tüm hastalara uygulanacak tedavinin gerekliliği açısından gözardı edilecektir.

Tüm tanı için alınacak kan örneği miktarı ve tedavi, çalışmaya katılmayacak diğer vitamin B12 eksikliği olguları gibidir.

Yukarıda sayılanlar böylesi bir analizde yaşanabilecek potansiyel risklerdir. Ancak bunlardan en az oranda zarar görmeyi sağlamak için elimizden geleni yapacağız. Çalışmanın devamı sırasında aya çıkabilecek sorun ve riskler katılımcının/hastanın kendisine ya da ebeveyni/sorumlusuna iletilecektir.

**Yapılacak araştırmanın getireceği olası yararlar:** Bu çalışma sonucunda çocuğunuzun vitamin B12 eksikliği düzeltilmiş olacaktır. Ayrıca vitamin B12 eksikliğine bağlı iştahsızlık, yorgunluk, solukluk, kollarda bacaklarda uyuşma, baş dönmesi, baş ağrısı, unutkanlık, öğrenme güçlüğü gibi oluşabilecek etkilerden çocuğunuz korunmuş olacaktır.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz Dr. Önder GÜN tarafından çocuğunuzun vitamin B12 eksikliğine yönelik tedavisi yapılacak ve aralıklı yapılacak kontrollerde alınacak rutin kan tahlilleri ile yapılan tedavinin takibi gerçekleştirilecek ve kayıt tutulacaktır.

Çocuğunuza vitamin B12 eksikliği tanısı poliklinik şartlarında konduktan sonra uygulanacak tedavi şekli doktorunuz tarafından belirlenip tedavi başlatılacaktır. Çocuğunuzu ilk 7 günlük tedaviden 1 hafta sonra, 1. ay, 2. ay ve 3. ay kontrole getirmeniz istenecektir. Çocuğunuzdan tedavinin etkinliğinin kontrol ve takibini yapabilmek amacıyla zaten bakılması gereken kan tahlilleri alınacaktır.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır. Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve

reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

**(Katılımcının/Hastanın Beyanı)**

Doç. Dr. Saadet AKARSU sorumluluğunda Araştırma Gevlisi Dr. nder GÜN tarafından F.Ü. Tıp Fakóltesi Hastanesi ocuk Hematolojisi BD’da tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük zen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağının bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

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

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun aya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr. nder GÜN’, 2333555 (2315)-05052345665 ve F.Ü Tıp Fakóltesi ocuk Hematolojisi BD’nı arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımıma ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde

“katılımcı” (denek olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

**Katılımcı**

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

**Görüşme tanığı**

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

**Katılımcı ile görüşen hekim**

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel:

İmza:

**Hastanın**

Adı soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

## 7. ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Diyarbakır'ın Ergani ilçesinde doğdum. İlk ve ortaöğretimimi Ergani'de tamamladıktan sonra 1993 yılında Elazığ Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde başladığım eğitimimi, 1999 yılında Diyarbakır Dicle Üniversitesinde bitirerek mezun oldum. 2007 yılında Tıpta Uzmanlık Sınavı ile Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak göreve başladım.