



Jüvenil İdiyopatik Artritli Hastalarda B12 Vitamini, Homosistein ve Oksidatif Stres İlişkisi

Nihan Çakır Biçer¹, Emine Aksoydan², Çiğdem Aktuğlu Zeybek³, Kenan Barut⁴, Özgür Kasapçopor⁴

¹*İstanbul Arel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Yüksekokulu, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, İstanbul*

²*Başkent Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara*

³*İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Beslenme ve Metabolizma Bilim Dalı, İstanbul*

⁴*İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Romatoloji Bilim Dalı, İstanbul*

ÖZET

Jüvenil idiyopatik artritli hastalarda B12 vitamini, homosistein ve oksidatif stres ilişkisi

Romatizmal hastalık grubunda yer alan juvenil idiyopatik artrit (JIA), periferik eklemleri de kapsayan kronik ve aşındırıcı sinovit ile karakterize, sistemik enflamatuvar bir hastalıktır. JIA tanısı almış hastalarda artan proenflamatuvar sitokinler ve sistemik enflamasyonla ilişkili metabolik değişiklikler, ateroskleroza yol açabilen vasküler endotel hasarına neden olabilmektedir.

Endotel disfonksiyona yol açan etmenler arasında yer alan bir başka metabolit ise homosisteindir. Homosistein, metiyoninin sisteine dönüşümü esnasında oluşan ara bir metabolittir ve kanda düzeyinin yükselmesi, vasküler hasara yol açabilmektedir. B12 vitamini folik asit ile birlikte, homosistein metabolizmasında enzimatik esansiyel kofaktör görevi ile homosistein düzeyinin düşük kalmasını sağlamaktadır ve eksikliklerinde kan homosistein düzeyinde artış görülebilmektedir. İnsanlarda metil grubunun transferi ve hücre bölünmesinde esansiyel olan B12 vitamini, sinir sistemi hücrelerinin proliferasyonu, olgunlaşması ve rejenerasyonu için önemli bir göreve sahiptir. Kan B12 vitamini düzeyi normal sınırlar içerisinde olmasına rağmen, anemi gibi ağır klinik bulguların görülmediği ancak, B12 vitamini vücuttaki fonksiyonları yerine getirmesini engelleyen "fonksiyonel B12 vitamini eksikliği" farklı hastalıklarda ve yaş gruplarında bildirilmektedir. Çalışmalar B12 vitamini eksikliğini, homosistein düzeyinde belirgin yükselmeye neden olmaksızın; sitokinler, büyüme faktörleri, nitrik oksit metabolizması, antioksidan enzimler üzerine etkileri ile reaktif oksijen türleri üretimi ile oksidatif strese yol açabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Jüvenil idiyopatik artrit, B12 vitamini, homosistein, oksidatif stres

ABSTRACT

Relationship between vitamin B12, homocysteine and oxidative stress in juvenile idiopathic arthritis

Juvenile idiopathic arthritis (JIA), which is one of the rheumatic diseases, is a systemic inflammatory disease characterized by chronic and erosive synovitis that involves peripheral joints. In patients who had been diagnosed with JIA, increasing proinflammatory cytokines, metabolic abnormalities associated with systemic inflammation, may provoke vascular endothelial damage which can cause atherosclerosis.

Homocysteine is another metabolite among the factors causing endothelial dysfunction. Homocysteine is an intermediate metabolite which is formed during the conversion of methionine to cysteine and high levels of homocysteine in blood can lead to vascular damage. Dietary folate and vitamin B12 deficiency can cause an increase in blood homocysteine levels. Vitamin B12 is essential for the transfer of methyl group and cell division in humans, but it is also important for the proliferation, maturation and regeneration of the nerve cells. In addition, "functional vitamin B12 deficiency" in which blood vitamin B12 level is in the normal range and without severe clinical symptoms like anemia has also been reported. Studies have showed that vitamin B12 deficiency can lead to oxidative stress without causing significant increase in homocysteine levels by its effects on cytokines, growth factors, nitric oxide metabolism, antioxidant enzymes and producing reactive oxygen species.

Key words: Juvenile idiopathic arthritis, vitamin B12, homocysteine, oxidative stress

Bakırköy Tıp Dergisi 2016;12:1-10

Yazışma adresi / *Address reprint requests to:* Nihan Çakır Biçer
İstanbul Arel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Yüksekokulu, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Büyüçekmece, İstanbul

Telefon / *Phone:* +90-212-867-2500

Elektronik posta adresi / *E-mail address:* nihancakir@gmail.com

Geliş tarihi / *Date of receipt:* 4 Mayıs 2015 / May 5, 2015

Kabul tarihi / *Date of acceptance:* 6 Temmuz 2015 / July 6, 2015

GİRİŞ

Jüvenil İdiyopatik Artrit

Jüvenil idiyopatik artrit (JIA), 16 yaşın altında en az 6 hafta süren artrit klinik görünümünü paylaşan, homojen bir grubun olmadığı rahatsızlıklarla seyreden, periferik eklemleri de kapsayan kronik ve aşındırıcı sinovit ile karakterize, çocukluk döneminin en yaygın kronik, enflamatuar romatolojik hastalığıdır (1). Uluslararası Romatoloji Dernekleri Cemiyeti'nin (International League of Associations of Rheumatology-ILAR) tanımına göre JIA, tek bir hastalık değildir; 0-16 yaş grubu çocuklarda bilinmeyen etiyoloji ile ortaya çıkan ve sürekli (6 haftadan uzun süre) görülen tüm artritleri kapsamaktadır (1-3). JIA terimi, daha önceki dönemlerde Avrupa ve Kuzey Amerika'da kullanılan jüvenil kronik artrit veya jüvenil romatoid artrit yerine uyarlanmıştır. En yaygın görülen, kısa ve uzun dönemli birçok engelliliğe yol açabilen, çocukluk çağı kronik romatolojik hastalığıdır. Yüksek gelirli ülkelerde yıllık insidansı, 100.000'de 2-20 vaka, prevelansı ise 100.000'de 16-150 olgu olarak bildirilmektedir (1,4).

Jüvenil İdiyopatik Artrit ve Vasküler Sağlık

JIA'lı hastalar, genel populasyonla kıyaslandığında, kardiyovasküler morbidite ve mortalite 3-5 kat daha yatkındır ve erken ölümlerin üçte biri ile yarısının nedeni kardiyovasküler hastalıklardır. Ayrıca kardiyovasküler hastalıklar, genel popülasyondan daha erken yaşta ortaya çıkmakta ve sıklıkla sinsi ve asemptomatik seyretilmektedir (5-7). Bu hastalarda kardiyovasküler hastalık için risk artışı, hastalığın vasküler endotel üzerine etkisi ve aterosklerozun sonucu olarak düşünülmektedir (5,6).

Endotel; vasküler sağlık, trombosit aktivitesi ve trombozun düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (8,9). Endotel, kardiyovasküler fonksiyonun temel düzenleyicisidir ve vasodilatasyon, trombosit birikimini baskılama, antikoagülan, profibrinolitik ve anti-enflamatuar etkilere sahip olma gibi çeşitli mekanizmalarla ateroskoruyucu rolünü sürdürür. Endotel aktivasyonu ve disfonksiyonu, endotelin normal homeostatik kontrol mekanizmalarındaki değişimleri tanımlayan terimlerdir (6,10).

Ateroskleroz, endotel disfonksiyona yol açan kardiyovasküler risk faktörlerinin hasarına yanıt olarak başlar. Aterosklerozun enflamatuar bir durum olduğu ve enfla-

masyon araçlarının, endotel fonksiyondaki değişimleri ortaya çıkarttığı kabul edilmektedir (10).

Vasküler endotel hasar, aterosklerozdaki temel olaydır ve endotel disfonksiyon ile ilişkilidir (8,9). Romatolojik hastalarda artan kardiyovasküler risk, endotel disfonksiyon ve ateroskleroz gelişimi ile sonuçlanır. JIA'nın kendisi, preklinik ateroskleroz ve koroner arter hastalığı nedeniyle erken ölüm için bağımsız bir risk faktörüdür. Primer sistemik vaskülit olan hastalarda ciddi endotel disfonksiyon varlığının ve vaskülitte ikincil endotel disfonksiyonun, JIA hastalarında ateroskleroz gelişiminin altında yatan mekanizma olabileceği bildirilmiştir (11). Kronik enflamasyonun yanı sıra genetik faktörler, özellikle bazı insan lökosit antijeni (HLA) DRB1 genotipi varlığı da bu hastaların endotel disfonksiyona yatkınlığını arttırmaktadır (6).

Kronik olarak sitokin düzeylerindeki artışın enflamasyona yol açabilmesi, yıllar içerisinde vasküler bozulmaya ve uzun vadede de endotel hasarına neden olabilir (12). JIA'da sistemik enflamasyon, kandaki enflamatuar göstergelerindeki artış ve hastalığın eklem dışı belirtileri ile ortaya çıkmaktadır (5). Tümör nekroz faktör- α (TNF- α), interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-6 (IL-6) gibi sinovyal dokuda üretilen proenflamatuar sitokinler, sistemik dolaşıma salınabilir (13). Güncel çalışmalar, enflamatuar sitokinlerin ateroskleroz ve enflamatuar hastalıkların patogeneğinde merkezi bir rol oynadığını göstermektedir (14). Endotelin atero-koruyucu rolünü sürdürmesi sürecinde önemli kimyasallardan biri de endotel kaynaklı nitrik oksit (NO). NO, nitrik oksit sentetaz (NOS) tarafından L-argininin dönüşümüyle sağlıklı endotel hücrelerden sürekli üretilir. NO, sadece endotel kaynaklı olmayıp, makrofajlar tarafından NOS'ın immunolojik uyarımına yanıt olarak da ("uyanılabilir NOS") sentezlenebilir (6,10). Akut enflamasyon, hem NO hem de endotel kökenli hiperpolarize faktörün vasküler salınımını değiştirebilen proenflamatuar sitokinlerin etkisi aracılığıyla endotel fonksiyona etki edebilir. Dolaşımdaki bu sitokinler; endotel disfonksiyon, insulin direnci, dislipidemi, protrombotik etkiler ve pro-oksidatif stresi kapsayan pro-aterojenik değişimleri ortaya çıkartarak, yağ dokusu, iskelet kası, karaciğer ve vasküler endotel de dahil olmak üzere organ fonksiyonlarında değişime yol açabilmektedir (6,13). Endotel aktivasyonu ve disfonksiyonu, aterosklerotik lezyonların gelişimindeki ilk olaylardır ve klinik bulgu ve semptomların ortaya çıkmasından önce, çocukluk döneminde de görülebilir (10).

Homosistein ve Endotel Doku

Son yıllarda endotel disfonksiyona yol açan etmenler arasında homosistein de yerini almıştır. McCully'un ilk olarak aterosklerozda homosistein teorisini yayınlamasının ardından yapılan birçok çalışma, homosistein metabolizmasının ateroskleroz gelişiminde önemli bir aracı olduğunu doğrulamıştır (15,16). Homosistein, metiyoninin sisteine dönüşümü esnasında oluşan ara bir amino asittir ve bu tiyol için DNA kodu bulunmamaktadır (17). Remetilasyon döngüsünde yer alan ve kaynağı diyetsel proteinler olan metiyonin, metiyonin adenozil transferaz ile S-adenozil-metiyonine (SAM) dönüştürülür. SAM, sadece homosisteinin remetilasyonunun ve transsülfürasyonunun önemli bir düzenleyicisi olarak değil, aynı zamanda da nükleik asitlerin metilasyonu, kreatinin ve fosfotidilkolin sentezi ve birçok nöro-düzenleyicilerin oluşumu için de metil grup vericisi olarak da görev yapmaktadır. ATP ve metiyonin aktivasyonu aracılığı ile SAM'in S-adenozil-homosisteine (SAH) demetilasyonu, SAM'in azalan varlığının hücresel büyüme, farklılaşma ve fonksiyonunu neden güçlü bir şekilde etkileyeceğini açıklayan süreçler için önemlidir. Bu nedenle eğer metiyonin ve SAM düzeyleri düşükse homosistein, öncelikli olarak metiyonin sentaz (MS) aracılı remetilasyon yoluna yönlendirilir. Homosisteinin metiyonine tekrar metillendiği "remetilasyon tepkimesi" olarak adlandırılan döngü, birçok dokuda 5-metil-tetrahidrofolatı substrat ve B12 vitaminini kofaktör olarak kullanan 5-metil-tetrahidrofolat-homosistein-metiltransferaz (veya metiyonin sentaz) enzimi tarafından katalize edilir. Homosisteinin hücresel düzeylerinin önemli düzenleyicileri; metiyoninin varlığı, folat, B12 ve B6 vitaminlerinin miktarıdır (18).

Günümüzde homosistein ile aterogenez arasındaki ilişki, aktif bir araştırma alanıdır. Hiperhomosisteinemi, endotelial hücrelerin hasarından sorumlu tutulmaktadır (16,19,20). Yüksek homosistein düzeyi, endotel kökenli NO üretimini bozup, azalmasına ve vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu uyarılmasına yol açabilir (21-23). Homosistein, trombosit agregasyonunu artırabilir, koagülasyon faktörlerini (V,X ve XII) aktive edebilir ve böylece koagülasyon basamakları ile fibrinolizi etkileyebilir. Bir meta-analizin sonuçlarına göre; plazma homosistein düzeyinde 3 µmol/L düşüş, iskemik kalp hastalığı riskini %16, derin ven trombozu riskini %25 ve inme riskini %24 azaltmaktadır (24).

Hiperhomosisteinemi, oksidatif stresin patogenezi katkısında bulunan bir faktör olarak da değerlendirilmektedir (25). Homosisteinin plazma trigliserit düzeylerini ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksidasyona yatkınlığı artırarak, lipid metabolizmasını değiştirdiği de gösterilmiştir (23). Ek olarak, nötrofiller ve endotelial hücreler arasındaki etkileşimin homosisteinden etkilendiği bulunmuştur. Bu durumun endotel hücrelerin, lökositler tarafından yönetilen oksidatif değişimlerin hedefi haline gelmesini kolaylaştırabileceği düşünülmektedir (18,26). Ayrıca artan kanıtlar, superoksit anyonları ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açabildiğini, oluşan hidrojen peroksitin, doğrudan endotel hücre hasarına neden olduğunu ve trombosit birikimini tetiklediğini göstermektedir (16).

Bazı enzim defektleri, fizyolojik değişimler, olumsuz yaşam biçimi alışkanlıkları, homosistein yüksekliğinin nedenleri arasında sayılmaktadır. Bazı kronik hastalıklar da orta düzey hiperhomosisteinemi ile ilişkili görülmektedir. Nörodejeneratif hastalıklar, romatoid artrit, Behçet hastalığı, Raynaud fenomeni, böbrek disfonksiyonu, hipotiroidi gibi bazı hastalıkların orta derecede homosistein yükselmesine neden olduğu bilinmektedir. Homosistein düzeyi, çeşitli ilaçların yan etkisi olarak da artış gösterebilmektedir. Bu ilaçlara örnek olarak; hormonlar, anti epileptik ilaçlar ve metotreksat gösterilebilir (27). Metotreksat ve benzeri ilaçlar, dihidrofolat redüktazı inhibe ederek, dihidrofolatın, tetrahidrofolata dönüşümünü engeller, hücrede folat tüketimine yol açar. Bu durum, hücre fonksiyonu ve yeniden üretimi için gerekli olan DNA ve RNA nükleotidlerinin sentezini azaltarak, hücre çoğalmasının baskılanmasına neden olur ve bu ilaçların kanser, psoriasis veya romatoid artrit için tedavi olarak kullanılmasını sağlar (17,28).

Romatoid artritte sıklıkla gözlenebilen hiperhomosisteineminin tek nedeninin metotreksat kullanımı olmadığı gösterilmiştir (27). Azalmış B vitaminleri düzeyleri ile paralel olarak uyarılmış Th1-immun yanıt ve oksidatif stres gelişiminin saptanması, immun aktivasyonun homosistein birikiminden sorumlu olabileceğini düşündürmüştür (29). Bu hastalıkların progresyonu, hücresel immun sistemin uyarılmasının göstergeleri olan yüksek neopterin veya TNF-R75 kD'nin yüksek kan düzeyleri, bu hastalıkların progresyonunda görülür ve hastalarda homosistein birikimi, immun aktivasyon esnasında meydana gelen metabolik değişimlerin yan etkisi olarak ortaya çıkabilir. Yaygın olarak kabul edilen görüşe zıt olarak

homosistein, hastalık gelişimi ve ilerlemesi için birincil neden olmaktan çok immuno-düzenleyici aşamalardan kaynaklanıyor görünmektedir (18).

B12 Vitamini (Kobalamin)

Homosistein yüksekliğinin en çok bilinen nedenlerinden biri folik asit ve B12 vitamini eksikliğidir. B12 vitamini (kobalamin), bir nükleotid kalıntısına bağlı olan merkezi bir kobalt atomu ile porfirin benzeri makromolekülden oluşan, önemli bir metaloenzimdir (30). B12 vitamini; neredeyse sadece hayvansal besinlerde, metil-, hidroksi- ve deoksiadenosil-kobalamin formları halinde bulunur. Bitkiler tarafından sentezlenmediği gibi insanlar da yeterli kobalamin depolarını korumak için hayvansal besinlere bağımlıdır (31).

Kobalaminin emilimi, gastrointestinal sistemin normal fonksiyonuna bağlıdır ve etkili bir şekilde emilimini sağlamak için bağırsaklarda karmaşık bir süreç işlemektedir; (1) gastrik asit ve pepsin tarafından besinlerdeki kobalaminin serbestleşmesi, (2) midede serbest kobalaminin haptokorrin ile bağlanması, (3) haptokorrinin proksimal ince bağırsakta sindirimi ve kobalaminin gastrik parietal hücrelerden salgılanan intrinsik faktöre (IF) transferi, (4) ince bağırsakta kobalamin-IF bileşiğinin spesifik reseptörlere bağlanması ve (5) kobalamin-IF bileşiğinin endositozu ve sonrasında IF'un serbest kalması (31,32). İnce bağırsaktan emilen kobalamin, serumda büyük oranda iki proteine bağlanır. Kobalaminin %70-90'ı biyolojik olarak inaktif olan haptokorrine bağlıyken, geri kalan kısmı transkobalamin II'e, diğer adı ile holotranskobalamin (holoTC), bağlıdır. HoloTC, spesifik reseptörler aracılığı ile tüm hücreler tarafından kobalaminin alımını sağlar, biyolojik olarak aktif kobalamin içerir ve kobalaminin hücrelere taşınması için gereklidir (30,33). Transkobalamin II-kobalamin bileşiği, hedef hücreler üzerinde transkobalamin II reseptörlerine bağlandıktan sonra endositoza uğrar. Hücre içerisinde kobalamin, transkobalamin II'den ayrılır, indirgenir ve metilmalonil-CoA mutaz (mitokondri) veya metiyonin sentaz (sitoplazma) için kofaktör olarak bağlanır. Deoksiadenosilkobalamin, L-metilmalonil CoA'nın süksinil CoA'ya izomerizasyonunda, L-metilmalonil CoA mutaz'ın kofaktörüdür. Diğer taraftan ise metilkobalamin, metiyonin sentazın kofaktörüdür. Bu enzim, metiyonin sentezi esnasında 5-metil-tetrahidrofolatın bir metil grubunu homosisteine transfer eder. Kobalaminin intraselüler eksikliği durumunda, metil

malonik asit (MMA) ve homosisteinin plazma düzeyleri artar (34).

B12 vitamini eksikliği ve gereksinimi

Kobalamin vücutta metiyonin, treonin ve valin amino asitlerinin metabolizmasında koenzim olarak ve DNA sentezi için gerekli olan metil-tetrahidrofolatın, tetrahidrofolata transformasyonunda görev alır. DNA ve RNA sentezi, hücre proliferasyonu, normal hematopoezis ile nörolojik ve bilişsel fonksiyonların sürdürülmesi gibi birçok fonksiyon için elzem olan kobalaminin eksikliğinin çocuklarda yaygın olduğu bildirilmektedir (35,36,37). Yeterli B12 vitamini alımı, normal sinir sistemi fonksiyonu, normal kırmızı ve beyaz kan hücreleri ve trombosit üretimi için esansiyeldir (18). Yaygın bir şekilde görülen B12 vitamini eksikliğinin tanısı her zaman kolay değildir çünkü birçok hasta klinik bulgu göstermez. Geleneksel olarak çoğu hastanın tanısı, kobalamin eksikliğine bağlı gelişmiş olan megaloblastik anemi ile konulmaktadır. Aslında kobalamin eksikliği, sıklıkla hematolojik değişimler olmadan görülmektedir. Kobalamin eksikliğinin zamanında saptanarak düzeltilmesi; makrositik anemi, yüksek homosistein düzeyi, geri dönüşümsüz periferik nöropati gelişimi, hafıza kaybı ve diğer bilişsel eksiklikleri engeller. Bu semptomların tek başına veya birlikte görülmesi, kobalamin eksikliğinin şiddetine göre değişkendir (38).

1980'li yılların ortasında iki gelişme, kobalamin eksikliğinin ve tanımının kapsamını değiştirmiştir. Bunlardan biri; sıklıkla "klinik belirtisi olmayan-fonksiyonel" eksikliğinin, anemi, makrositoz veya eksiklik semptomları olmayan hastalarda bildirilmesidir. Diğer bir gelişme ise kobalamin aracılı reaksiyonların substratları olan MMA ve homosisteinin ufak yükselmelerinin güvenilir bir biçimde ölçülebilmesidir. Bu değerlendirmeler, klinik belirtisi olmayan - fonksiyonel kobalamin eksikliğinin, klasik klinik eksiklikten daha yaygın olduğunu kanıtlayan geniş araştırmalara olanak tanımıştır (39).

B12 vitamini, mikroorganizmalar tarafından sentezlenir ve hayvansal kaynaklı besinlerde besin zincirine katılır (38). Çocukluk dönemi için önerilen günlük kobalamin alım miktarı; 1-3 yaş grubu için 0.7 µg/gün, 4-6 yaş grubu için 1.1 µg/gün, 7-10 yaş grubu için 1.4 µg/gün, 11-18 yaş grubu için ise 2.0 µg/gün'dür (40). Yetişkinler günlük 2.4 µg, hamile kadınlar ise 6 µg'a kadar B12 vitamini almalıdır. B12 vitamini yetersiz alımı ve bozulmuş emilimi, B12 vitamini eksikliğine neden olabilir. Günlük gereksi-

nim miktarının hesaplanması, normal hematolojik durumu, normal hemoglobin ve eritrositlerin ortalama korpuskular volümünü (MCV) sağlamak ve Pernisiyöz anemide remisyonu korumak için gereken B12 vitamini miktarının hesaplanmasına dayanmaktadır (34). Ancak, çalışmalar kromozom kırılması ve kaybının bir göstergesi olan periferik kan lenfositlerinde mikronükleus oluşumunun, plazma B12 vitamini düzeyinin 410 pg/ml'nin üzerinde olması halinde en düşük düzeyde tutulabildiğini ve bunun sağlanabilmesi için de günlük B12 vitamini alımının 7 µg/gün olması gerektiğini göstermiştir. Bu nedenle, B12 vitamini için güncel olan önerilen alım düzeyi, genetik dengenin sağlanması için yetersiz olabilir (33).

Serum B12 vitamininin normal düzeyleri için geniş bir referans aralığı (150-900 pg/ml) önerilmektedir. B12 vitamini eksikliğinin saptanmasında toplam B12 vitamini ölçümü, ucuz bir gösterge olarak kullanılmasına rağmen, özellikle B12 vitamin düzeyleri 400 pg/ml'nin altında olan bireylerde, sınırlı hassasiyete ve özgüllüğe sahiptir (41). B12 vitamini düzeyi, normal referans aralığının alt sınırında (156-400 pg/ml) olan bireylerde de eksikliğin klinik bulguları oluşabileceğinden, bu düzeylerde özellikle dikkatli olunması gerektiği bildirilmektedir (42). Normal B12 vitamini düzeyi olan bireylerde intraselüler, metabolik olarak görülen (fonksiyonel) B12 vitamini eksikliği nedeniyle, MMA düzeylerinde artış (>300 nmol/L) ve holoTC düzeylerinde düşüklük (<35 pmol/L) olabilir. Zıt olarak, B12 vitamininin düşük düzeylerine rağmen normal MMA düzeyleri saptanabilir (34).

Hvas ve arkadaşları, 169 pg/ml altındaki düzeyleri B12 vitamini eksikliği olarak tanımlarken, 169-338 pg/ml aralığındaki B12 vitamini düzeylerinin, homosistein-metiyonin döngüsünün iyi çalışmadığı (DNA sentezinin, metillenmenin iyi olmadığı), metil malonik asidürinin ortaya çıkabildiği bir "gri bölge" olduğunu ifade etmişler ve ancak 338 pg/ml üzerindeki B12 vitamini değerlerinin yeterli görülebileceğini bildirmişlerdir. Bir çalışmada DNA hipometilasyonu, kromozom kırılmaları, urasil depolanması ve mikronükleus oluşumunu en alt düzeye indirmek için B12 vitamini plazma düzeyinin 406 pg/ml ve plazma homosistein düzeyinin <7.5 µmol/L olması gerektiği bildirilmiştir (43,44,45).

B12 vitamini eksikliğinin tedavisinde vücut depolarını doldurmak amacıyla 1-3 aylık süreçte, günlük/haftalık intramusküler kobalamin uygulaması önerilmektedir (9,46). Deneysel tek doz 1-2 mg (1000-2000 µg) kobalamin enjeksiyonunun anemiyi düzeltmek için yeterli olduğu

bildirilmektedir. 1000 µg doz, depoları doyurmaya başlar ancak birçok hastada, enjekte edilen miktarın en fazla 150 µg'ının depolanabildiği bildirilmiştir (46). İntramusküler siyanokobalamin ve hidroskobalamin, farklı farmakolojik özelliklere sahiptir. Hidroskobalamin, siyanokobalamininden daha büyük sistemik tutulmaya ve hücrelerde bulunabilme özelliğine sahiptir ve siyanokobalamin tedavisi, bazı doğumsal metabolik hastalığı olan hastalarda etkisiz olabilir. Bu nedenle, hidroskobalaminin 1 mg'lık koruma dozları her 1.5-3 ayda verilirken; siyanokobalaminin 1 mg'lık dozunun, 2 hafta aralıklarla verilmesi gerekebilir. Ayrıca bazı hastalar, normal serum kobalamin düzeyini korumak ve klinik olarak tekrarlama önlemek için her iki kobalamin türevinde daha sık aralıklarla enjeksiyona ihtiyaç duymaktadır (9).

Kobalaminin ince bağırsakta IF'den bağımsız pasif difüzyon ile emilmesi nedeniyle, günlük yüksek siyanokobalaminin dozları, pernisiyöz anemiye bağlı megaloblastik anemili hastalarda düzelme sağlayabilir. Güncel olarak, randomize çalışmanın değerlendirildiği Cochrane Derlemesi, günlük oral tedavi için B12 vitamini eksikliği olan hastalarda kısa dönemde hematolojik ve nörolojik yanıt elde etmede intramusküler uygulama kadar etkin olduğu sonucuna varmışlardır (47). Ancak, değerlendirilen çalışmalarda 104 hastanın sadece 9'u Pernisiyöz anemiyeye ve 10'u da (hem besinsel kobalamin malabsorbsiyonuna hem de intrinsik faktör eksikliğine neden olan) atrofik gastrite sahipken; 66 hastada besinsel kobalamin malabsorbsiyonu veya düşük diyetel kobalamin alımı tanımlanmıştır. 20 hastadan fazlasında, kobalaminin parenteral dozunu gerektiren, geçmişte kullanılan Schilling testi uygulanmıştır. Ancak bu çalışmalarda hastaların hiçbiri nörolojik bulguları olduğu için seçilmemiştir. Çoğu, sadece düşük kobalamin ve yüksek metabolit düzeyleri, bazıları megaloblastik anemi olduğu için seçilmiştir (33,47).

Yapılan çalışmalarda oksidatif stres, nitrik oksit üretimi ve çeşitli sitokinlere maruz kalma gibi enflamasyon ile ilişkili faktörler, artan intestinal geçirgenlik ile ilişkili bulunmuştur. Behçet hastaları ile yürütülmüş bir çalışmada da intestinal geçirgenliğin arttığı görülmüş, bu hastalarda subklinik gastrointestinal enflamasyon nedeniyle, folat ve B12 vitamininin emiliminde azalma olabileceği bildirilmiştir (48). Behçet hastalarında hiperhomosisteineminin enflamasyonla ilişkisinin değerlendirildiği diğer bir çalışmada, hastaların serum B12 vitamini düzeyleri (255.3 pmol/L), kontrol grubuna göre (309.8 pmol/L) daha

düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Aynı çalışmada, B12 vitamini düzeyi ile homosistein ve CRP düzeyi arasında güçlü bir negatif ilişki bildirilmektedir (sırasıyla; $p=-0.778$, $p<0.001$ ve $p=-0.430$, $p=0.014$). Benzer olarak güncel çalışmalar da homosistein düzeylerinin, romatoid artritte enflamasyon göstergeleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir (49,50).

B12 vitamini, yaygın terapötik kullanımda tamamen güvenilir bir profile sahiptir. Enflamatuar bağırsak hastalığı olan ve B12 vitamini eksikliği olmayan vakalara 6 hafta süresince 15 gün arayla 1000 µg intramusküler B12 vitamini uygulaması deneyiminin yer verildiği bir çalışmada, hastaların bu uygulamadan yarar gördüğünü ve kronik dermatozu olan hastalarla yürütülmüş bir çalışmada ise haftalık yüksek doz (1000 µg) B12 vitamininin intramusküler enjeksiyonunun yararlı olduğunu belirtilmiştir (51).

Nörolojik bozukluklarda yüksek doz hidroskobalamin, siyanokobalamin ve metilkobalaminin uygulandığı bir çalışmaya göre; klinik bulgular kobalamin eksikliği ile uyumluysa, farmakolojik dozlarda parenteral kobalaminin (1-3 gün/hafta, en az 1000 µg intramusküler olarak) uzamış (6-12 ay) tedavi uygulamaları gerekmektedir (33).

B12 Vitamini ve Oksidatif Stres ilişkisi

Son yıllarda kobalamin üzerine olan çalışmalar sonucunda kobalaminin enflamatuar yanıtlar da dahil olmak üzere serbest radikal hasarını ve oksidatif stres yanıtlarını düzenleyebileceği gösterilmiştir (52).

Serbest radikaller ve oksidatif hasar

Serbest radikaller, kendilerini hücrel hasara güçlü bir şekilde yol açabilecek çok reaktif ve stabil olmayan türler yapan, dış atomik veya moleküler orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren moleküller veya moleküler parçacıklar olarak tanımlanabilir. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS), süperoksit (O_2^-), nitrik oksit (NO) ve hidroksil radikali (OH) gibi hem serbest radikalleri hem de hidrojen peroksit (H_2O_2) ve peroksinitrit (ONOO) gibi diğer moleküler türleri içerirler. Birçok hücrel ROS, mitokondri içerisinde oksijenin suya tamamlanmamış metabolik indirgenmesi sırasında ortaya çıkar (53).

ROS, fizyolojik ve patolojik koşullar altında oluşur. Oksijen radikalleri, hücrelerde sinyal iletimi, gen transkripsiyonu ve çözünür guanilat siklaz aktivitesinin düzen-

lenmesi gibi önemli etkiler ortaya koyabilir. Ayrıca endotel hücrelerden üretilen NO'nin fizyolojik düzeyleri, vasoregülasyon, lökosit adhezyonu, platelet agregasyonu, anjiogenezis ve nöro-transmisyon için elzemdir. Aktive olmuş makrofajlar tarafından üretilen NO de immün yanıtın önemli bir aracıdır (53,54).

Serbest radikallerin aşırı üretimi, biyomoleküllerde (proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve DNA) oksidatif hasara neden olabilir, hücre hasarına veya ölümüne yol açabilir (55,56). Proteinlerin oksidasyonu, enzimlerin aktif bölgelerinin bozulması veya daha ileri inaktivasyonla yapısal proteinlerin konformasyonlarının değişmesi gibi geniş kapsamlı hasar veren etkilere sahiptir. Protein oksidatif hasarı, yan zincirler içerisindeki karbonil gruplarının oluşumuna yol açar (57,58).

Antioksidan savunma sistemleri

Serbest radikal üretimi tarafından oluşan hücrel hasarı engellemek veya azaltmak için organizmalar, antioksidan savunma mekanizmaları geliştirmiştir. Serbest radikallerin temizlenmesi, enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlarla başarılıdır. Enzimatik antioksidan savunma; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSHPx), glutatyon redüktaz (GSHRd) ve katalaz aktivitelelerinden oluşmaktadır (53).

SOD, O_2^- 'i H_2O_2 ve O_2 'e parçalayarak uzaklaştırır. SOD izoformları, GSHPx veya CAT aktivitesiyle ya da diğer peroksidazlar ile temizlenen H_2O_2 oluşturur. GSHPx, selenyum içeren enzim ailesindedir ve glutatyonun (GSH) oksidasyonu ile H_2O_2 'i suya indirgeyerek temizler. Bu reaksiyonun ürünü olan okside glutatyon (GSSG), GSHRd aracılığı ile tekrar GSH'a dönüştürülür (53).

H_2O_2 , OH veya hipokloroz asit (HOCl) gibi reaktif oksijen türleri oluşturmak için güçlü bir şekilde monositleri/makrofajları uyaran aktive olmuş T-hücreleri tarafından, Th1- immün yanıtı sitokin interferon (IFN)- γ salgınır. Oldukça reaktif olan bu oksijen araçları, hücrel makromoleküller ile hızlı bir şekilde etkileşime girerler ve hücrel hasara neden olurlar (18). Sağlıklı organizmalarda ROS üretimi ile antioksidan savunma sistemleri yaklaşık olarak dengelidir. Ancak, bazı koşullar altında ROS üretimi sürekli olarak artar ve/veya antioksidan yanıt, redoks homeostazını korumak için yeterli olmaz. Prooksidan-antioksidan dengesinde prooksidana doğru bir bozulma, oksidatif stres olarak adlandırılır. Bu durum, genellikle bazı hastalıklarda önemli bir patomekanizma gösteren,

oksidatif hücre hasarına yol açar (53).

SOD veya katalaz gibi enzimler ile okside ajanların detoksifikasyonu, çok etkili bir stratejidir ve glutatyon, askorbik asit veya α -tokoferol gibi antioksidanlar da ROS'ni etkisizleştirmede etkindir. Ancak eğer bu antioksidan sistemleri, artmış ve sürekli ROS üretimi tarafından aşırı yüklenirse, oksidatif stres gelişir. Bu nedenle sadece antioksidanlar değil, 5,6,7,8-tetrahidrofolat (THF) ve B12 vitamini gibi oksidasyona oldukça yatkın olan diğer oksidasyona duyarlı maddeler de kolayca okside olabilir (59). Ayrıca folik asit ve B12 vitamini, immun bileşen hücrelerinin proliferasyonu için elzemdir ve hastalık aracılı immun aktivasyon içerisinde bu hücrelerin döngüsü fazladır. Ek olarak, hücre aracılı immun aktivasyon ile seyreden hastalıklarda, yüksek hızda hücre döngüsü meydana gelmektedir. Mitojenler tarafından insan periferik kan mononükleer hücrelerinin uyarılmasının, süpernatantlarda homosistein birikimi ile anlamlı derecede ilişkili olduğu gösterilmiştir ve bu durum, immun hücrelerinin proliferasyonunun da artan B vitaminleri depresyonuna katkıda bulunduğuna işaret etmektedir. Enflamatuar hastalıklarda ve uzun süreli immun aktivasyon ve IFN- γ 'nin endojen üretimi ile ilişkili hastalıklarda folat ve B12 vitamini depresyonu ile ilişkilendirilmektedir (18).

Artan vasküler oksidatif stresin sadece endotel disfonksiyona neden olmadığı, aynı zamanda koroner arter hastalığı olan hastalarda kardiyovasküler olay riski için de öngörü oluşturabileceği bildirilmiştir (60). Bu nedenle homosistein aracılı oksidatif stres, uzun yıllardır üzerinde çok sayıda çalışma yapılan önemli bir başlıktır. Buna karşın, yüksek plazma homosistein düzeyleri ile enflamasyonun, aterosklerotik hastalıkların patogenezi ile ilişkisinin moleküler mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Birçok hipotez, homosisteinin özellikle oksidatif stres aracılığıyla artan vasküler enflamasyona yol açtığını savunmaktadır (61).

Homosisteinin tiol grubu kolaylıkla oto-oksidasyona uğrayabilir ve oksidatif stres gelişimi için sorumlu tutulan tiollerin oto-oksidasyonu, metal katalizörlerin değişimi ve moleküler oksijen varlığında ortaya çıkabilir. Bu nedenle homosistin, homosistein karışımı disülfidler ve homosistein tiolaktan oluşumuna yol açabilir (18,62). Sülfidril grubunun oksidasyonu esnasında O_2^- ve H_2O_2 gibi reaktif oksijen türleri oluşur ve bu oksijen kökenli moleküllerin homosisteinin endotel sitotoksitesinden sorumlu olduğuna inanılmaktadır. Nitrik oksit varlığında metal katalizörlü oksidasyon veya O_2^- oluşumu esnasında, H_2O_2

oluşumunun uyarılmasıyla homosistein, lipid peroksidasyonunu tetikleyebilir. Bu oksidasyondan sorumlu enflamatuar süreçler, lezyonları ele geçiren ve köpük hücrelere dönüşen makrofajları etkileyebilir. İn vitro deneyler, homosisteinin toksik etkilerinin ROS oluşturma yeteneğine dayandığını göstermektedir. Yüksek homosistein düzeylerine maruz kalma süresinin uzaması durumunda veya glutatyon peroksidaz enzim düzeylerinin baskılanması nedeniyle endotel hücreler, homosisteinin toksisitesini azaltamayabilir (18).

O_2^- , oksijenin bir elektron ile indirgenmesi sırasında oluşur. Mitokondrial ve retikuler membran elektron transport sistemleri veya NADPH oksidaz, ksantin oksidaz ve ayrılmamış nitrik oksit sentaz gibi enzimler tarafından üretilir. Hücrelerin homosisteine maruz kalmaları da O_2^- düzeylerinde artışa neden olur. O_2^- , hem fizyolojik hem de patolojik süreçlere dahil olmaktadır ve O_2^- 'nin aşırı üretimi, romatoid artrit, osteoartrit, arterioskleroz ve iskemi-reperfüzyonu gibi enflamatuar durumlarda yer almaktadır (63).

O_2^- üretiminin temel kaynağı olan nikotinamid adenin dinükleotid (NADPH) oksidazın artan aktivitesi, aterosklerotik lezyonlarda bildirilmiştir. NADPH oksidaz, homosistein ve aynı zamanda sitokinler veya CRP gibi enflamatuar araçlar ile aktive olabilir. Ayrıca homosistein tarafından kolaylaşan endotel hücreler ile monositler arasındaki etkileşim veya enflamasyon, NADPH oksidaz aktivitesini arttırabilir (62). Bu veriler, O_2^- üretimi SOD koruyucu sistemini aştığında, kobalaminin ikinci bir savunma hattı olarak görev aldığı hipotezini desteklemektedir. Ayrıca bu etkisinin homosistein metabolizmasından bağımsız olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar, kobalaminin etkili bir şekilde O_2^- 'i temizlediğini gösteren in vitro kinetik veriler ile de uyumludur ve kobalaminin doğrudan O_2^- , temizlemesi, kobalaminin intraselüler oksidatif strese karşı koruyucu olduğunu göstermektedir (63).

Orta düzeyde yüksek homosisteininin, kontrol grubuna göre, alkolik olmayan steatohepatit hastalarında yüksek düzeyde oksidatif stres, düşük toplam ve indirgenmiş glutatyon, redoks durumunun bir göstergesi olan indirgenmiş glutatyon/glutatyon disülfid oranı ve glutatyon peroksidaz aktivitesi ile lipid peroksidasyonunun bir işareti olan yüksek malondialdehid düzeyleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada homosistein düzeyi ile SOD aktivitesi arasında negatif korelasyon saptanmıştır. Bu hastalarda görülen düşük indirgenmiş glu-

tasyon düzeyinin, sadece karaciğer hastalığının gelişiminde ve progresyonunda değil, klinik belirti göstermeyen ateroskleroz ile de ilişkisi olduğu belirtilmektedir (64).

Güncel çalışmalar kobalaminin, TNF- α ve IL-6 gibi anahtar enflamatuar sitokinler, epidermal büyüme faktörü ve sinir büyüme faktörü ve doğal öldürücü hücre aktivitesini doğrudan kontrol ettiğini göstermiştir (24). Kobalamin, enflamasyonu daha önceden düşünüldüğü gibi NO'ü temizleyerek veya antagonist olarak değil, NO'ü düzenleyerek düzeltir. NO üretimini ve yayılmasını, 3 farklı NO sentetazın tamamını, temel endotel ve nöronal NOS (eNOS, nNOS) ve uyarılabilir NOS (iNOS), düzenleyerek ve eş zamanlı olarak karşılıklı yanıtı tamamlayıcı hareket ile anahtar antioksidan sistemleri de düzeltir. Kobalamin bunu, NOS substratları ve kofaktörlerinin sentezi, hem, arjinin, tetrahidrobiopterin, nükleotidler; flavin adenin dinükleotid/flavin mononükleotid (FAD/FMN), NADPH ve aynı zamanda kobalamin durumuna bağımlı olan glutatyon (GSH) aracılığıyla da dolaylı olarak yapar (65). Herhangi bir substrat veya kofaktörün eksikliği, "ayrılmamış" NOS reaksiyonları, NO üretiminde azalma ve artmış veya aşırı O₂⁻, H₂O₂, ONOO⁻ ve diğer reaktif oksijen türleri/reaktif nitrojen türleri ile sonuçlanır ve çözümlenemeyen enflamasyon patolojilerine yol açar. Kobalamin ile geliştirilen GSH, sırasıyla daha benign NO türlerinin, s-nitrosotiollerin oluşumuna etki eder ve hücre sinyal iletiminde nitrozilasyon etkilerini değiştirir veya geri çevirir (6).

GSH ve kobalamin birlikteliği, glutatyonilkobalamin (GSCbl) oluşumuyla sonuçlanır. Yeni kanıtlar, GSCbl'nin

enflamasyonun erken aşamalarında özellikle seçici olarak iNOS'ü geliştirdiğini ve eNOS NO oluşumunu desteklediğini göstermektedir (6). Hidroksikobalamin (OHcbl), int-raselüler olarak, metilmalonil-CoA mutaz (MMA mutaz) ve metiyonin sentaz (MS)'in kofaktörleri olan sırasıyla, adenosilkobalamin ve metilkobalamine dönüşür. MS, metilasyon döngüsü aracılığıyla homosisteini, metiyonine dönüştürür ve metil-grupları ve yenilenmiş homosistein oluşturur. Homosistein, glutatyon sentezi için substrat sağlayarak, transsülfürasyon yolunda sisteine dönüşür. Serbest glutatyon, çoğunlukla indirgenmiş formunda (GSH) bulunur ve geri dönüşümlü reaksiyonlar ile okside glutatyon (GSSG) veya protein-bağlı glutatyon (GSH-Pro) dönüşebilir. Bu reaksiyonlar, oksidatif stres ve aşırı ROS üretimi durumlarında geri dönüşsüz hale gelir (66).

Kobalamin, uzun süre methotrexat kullanımı ile uyarılan hiperhomosisteinemi azaltır ve böylelikle oksidatif stres (H₂O₂) oluşumunu uyararak endotel disfonksiyona katkıda bulunan yüksek homosistein düzeyi gibi endotel disfonksiyonu da düzeltir (67).

Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarla enflamatuar bir hastalık olan JIA'nın endotel disfonksiyon ve bazı kronik hastalık risklerini arttırdığı gösterilmiştir. Bu tip hastalarda görülebilen homosistein yüksekliği de endotel disfonksiyona yol açan bağımsız bir risk faktörü olarak tanımlanmaktadır. Kobalamin eksikliği, hiperhomosisteineminin en önemli nedenlerinden biridir. Güncel çalışmalarda kobalaminin antioksidan özelliğinin de olabileceği, JIA'da artan sitokin düzeylerini ve oksidatif stres göstergelerini etkileyebileceğine dikkat çekilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Makay B, Unsal E, Kasapcopur O. Juvenile idiopathic arthritis. World J Rheumatol 2013; 3: 16-24.
2. Woo P, Colbert RA. An overview of genetics of paediatric rheumatic diseases. Best Pract Res Clin Rheumatol 2009; 23: 589-597.
3. Prakken B, Albani S, Martini A. Juvenile idiopathic arthritis. Lancet 2011; 377: 2138-2149.
4. Ravelli A, Martini A. Juvenile idiopathic arthritis. Lancet 2007; 369: 767-778.
5. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Martin J. Rheumatoid arthritis: a disease associated with accelerated atherogenesis. Semin Arthritis Rheum 2005; 35: 8-17.
6. Syngle A, Vohra K, Garg N, et al. Advanced glycation end-products inhibition improves endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis. Int J Rheum Dis 2012; 15: 45-55.
7. Sitia S, Atzeni F, Sarzi-Putti P, et al. Cardiovascular involvement in systemic autoimmune diseases. Autoimmun Rev 2009; 8: 281-286.
8. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. N Eng J Med 1999; 340: 115-126.
9. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. Lancet 1992; 340: 1111-1115.
10. Khan F. Assessment of endothelial function as a marker of cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis. Int J Rheum Dis 2010; 13: 189-195.
11. Raza K, Thambyrajah J, Townend JN, et al. Suppression of inflammation in primary systemic vasculitis restores vascular endothelial function: lessons for atherosclerotic disease? Circulation 2000; 102: 1470-1472.
12. Blann AD. Endothelial cell activation, injury, damage and dysfunction: separate entities or mutual terms? Blood Coagul Fibrinolysis 2000; 11: 623-630.
13. Sattar N, McCarey DW, Capell H, et al. Explaining how "high-grade" systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. Circulation 2003; 108: 2957-2963.

14. Gokkusu C, Tulubas F, Unlucerci Y, et al. Homocysteine and pro-inflammatory cytokine concentrations in acute heart disease. *Cytokine* 2010; 50: 15-18.
15. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-128.
16. Yesilova Z, Pay S, Oktenli C, et al. Hyperhomocysteinemia in patients with Behçet's disease: is it due to inflammation or therapy? *Rheumatol Int* 2005; 25: 423-428.
17. Haagsma CJ, Blom HJ, van Riel PL, et al. Influence of sulphasalazine, methotrexates, and the combination of both on plasma homocysteine concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1999; 58: 79-84.
18. Schroecksnadel K, Frick B, Wirleitner B, et al. Moderate hyperhomocysteinemia and immune activation. *Curr Pharm Biotechnol* 2004; 5: 107-118.
19. Wall RT, Harlan JM, Harker LA, et al. Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury. *Thromb Res* 1980; 18: 113-121.
20. Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest* 1986; 77(4): 1370-1376.
21. Tawakol A, Omland T, Gerhard M, et al. Hyperhomocyst(e)inemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation* 1997; 95: 1119-1121.
22. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, et al. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest* 1993; 91: 308-318.
23. Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, et al. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6369-6373.
24. Williams TG. Homocysteine-a risk factor for vascular diseases: guidelines for the clinical practice. *J Am Nutraceutl Assoc* 2004; 7: 10-24.
25. El Kossi MMH, Zakhary MM. Oxidative stress in the context of acute cerebrovascular stroke. *Stroke* 2000; 31: 1889-1892.
26. Dudman NP, Wilcken DE, Wang J, et al. Disordered methionine/homocysteine metabolism in premature vascular disease. Its occurrence, cofactor therapy, and enzymology. *Arterioscler Thromb* 2000; 13: 1253-1260.
27. De Bree A, Verschuren WMM, Kromhout D, et al. Homocysteine determinants and the evidence to extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 599-618.
28. Quinn CT, Griener JC, Bottiglieri T ve arkadaşları. Elevation of homocysteine and excitatory amino acid neurotransmitters in the CSF of children who receive methotrexate for the treatment of cancer. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2800-2806.
29. Widner B, Enzinger C, Laich A, et al. Hyperhomocysteinemia, pteridines and oxidative stress. *Curr Drug Metab* 2002; 3: 225-232.
30. Al Aisari F, Al-Hashmi H, Mula-Abed WA. Comparison between serum holotranscobalamin and total vitamin B12 as indicators of vitamin B12 status. *Oman Med J* 2010; 25: 9-12.
31. Hoey L, Strain JJ, McNulty H. Studies of biomarker responses to intervention with vitamin B-12: a systematic review of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2009; 89: 1981S-1996S.
32. Oberley MJ, Yang DT. Laboratory testing for cobalamin deficiency in megaloblastic anemia. *Am J Hematol* 2013; 88: 522-526.
33. Solomon LR. Disorders of cobalamin (vitamin B12) metabolism: emerging concepts in pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Rev* 2007; 21: 113-130.
34. Herrmann W, Obeid R. Causes and early diagnosis of vitamin B12 deficiency. *Dtsch Arztebl Int* 2008; 105: 680-685.
35. Bailey RL, Carmel R, Gren R, et al. Monitoring of vitamin B-12 nutritional status in the United States by using plasma methylmalonic acid and serum vitamin B-12. *Am J Clin Nutr* 2011; 94: 552-561.
36. Woo KS, Kim KE, Park, JS ve arkadaşları. Relationship between the levels of holotranscobalamin and vitamin B12. *Korean J Lab Med* 2010; 30(2): 185-189.
37. Ulak M, Chandyo RK, Adhikari RK, et al. Cobalamin and folate status in 6 to 35 months old children presenting with acute diarrhea in Bhaktapur, Nepal. *PLoS ONE* 2014; 9: e90079.
38. Sobczyńska-Malefora A, Gorska R, Pelisser M ve arkadaşları. An audit of holotranscobalamin ("Active" B12) and methylmalonic acid assays for the assessment of vitamin B12 status: application in a mixed patient population. *Clin Biochem* 2014; 47: 82-86.
39. Carmel R. Biomarker of cobalamin (vitamin B-12) status in the epidemiologic setting: a critical overview of context, applications, and performance characteristics of cobalamin, methylmalonic acid, and holotranscobalamin II. *Am J Clin Nutr* 2014; 94: 348S-358S.
40. Food and Nutrition Board, Commission on Life Sciences, National Research Council. Recommended Daily Allowances. 10th edition. Washington, DC, National Academies Press, 1989; p.158-165.
41. Herrmann W, Schorr H, Obeid R, et al. Vitamin B12 status, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians. *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 131-136.
42. Lesho EP, Hyder A. Prevalence of subtle cobalamin deficiency. *Arch Intern Med* 1999; 159: 407.
43. Hvas AM, Nexø E. Diagnosis and treatment of vitamin B12 deficiency-an update. *Haematologica* 2006; 91: 1506-1512.
44. Fenech M. The role of folic acid and vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutat Res* 2001; 475: 57-67.
45. Önal H, Adal E, Öner T, et al. Gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sorun: annede ve yenidoğanda B12 vitamini eksikliği. *Türk Pediatri Arşivi Dergisi* 2010; 45: 242-245.
46. Carmel R. How I treat cobalamin (vitamin B12) deficiency? *Blood* 2008; 112: 2214-2221.
47. Vidal-Alaball J, Butler CC, Cannings-John R ve arkadaşları. Oral vitamin B12 versus intramuscular B12 for vitamin B12 deficiency. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; 20: CD004655.
48. Fresko I, Hamuryudan V, Demir M, et al. Intestinal permeability in Behçet's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 65-66.
49. Yxfeldt A, Wallberg-Jonsson S, Hultdin J, et al. Homocysteine in a patient with rheumatoid arthritis in relation to inflammation and B-vitamin treatment. *Scand J Rheumatol* 2003; 32: 205-210.
50. Chiang EP, Bagley PJ, Selhub J, et al. Abnormal vitamin B(6) status is associated with severity of symptoms in patients with rheumatoid arthritis. *Am J Med* 2003; 114: 283-287.

51. Mortimore M, Florin TH. A role for B12 in inflammatory bowel disease patients with suppurative dermatoses? An experience with high dose vitamin B12 therapy. *J Crohns Colitis* 2010; 4: 466-470.
52. Birch CS, Brasch NE, McCaddon A, et al. A novel role for vitamin B2: Cobalamins are intracellular antioxidants in vitro. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 184-188.
53. Ribas GS, Sitta A, Wajner M, et al. Oxidative stres in phenylketonuria: what is the evidence? *Cell Mol Neurobiol* 2011; 31: 653-662.
54. Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci* 1999; 893: 13-18.
55. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stres. *Am J Med* 2000; 108: 652-659.
56. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002; 18: 872-879.
57. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* 2001; 32: 790-796.
58. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003; 329: 23-38.
59. McCaddon A, Regland B, Hudson P ve arkadaşları. Functional vitamin B(12) deficiency and Alzheimer disease. *Neurology* 2002; 58(9): 1395-1399.
60. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, et al. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 104: 2673-2678.
61. Khatri JJ, Johnson C, Magid R, et al. Vascular oxidant stress enhances progression and angiogenesis of experimental atheroma. *Circulation* 2004; 109: 520-525.
62. Ventura E, Durant R, Jaussent A, et al. Homocysteine and inflammation as main determinants of oxidative stress in the elderly. *Free Radic Biol Med* 2009; 46: 737-744.
63. Moreira ES, Brasch NE, Yun J. Vitamin B12 protects against superoxide-induced cell injury in human aortic endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2011; 51: 876-883.
64. Leach NV, Dronca E, Vesa SC, et al. Serum homocysteine levels, oxidative stres and cardiovasvular risk in non-alcoholic steatohepatitis. *Eur J Intern Med* 2014; 25: 762-767.
65. Wheatley C. Cobalamin in inflammation III-glutathionylcobalamin and Methylcobalamin/adenosylcobalamin coenzymes: the sword in the stone? How cobalamin may directly regulate the nitric oxide synthases. *J Nutr Environ Med* 2007; 16: 212-226.
66. Pastore A, Martinelli D, Piemonte F, et al. Glutathione metabolism in cobalamin deficiency type C (cblC). *J Inherit Metab Dis* 2014; 37: 125-129.
67. Hernanz A, Plaza A, Martin-Mola E, et al. Increased plasma levels of homocysteine and other thiol compounds in rheumatoid arthritis women. *Clin Biochem* 1999; 32: 65-70.