

## Holotranskobalamin II'nin RIA ile Ölçümünün Megaloblastik Anemi Tanısındaki Değeri ve Diğer Tanı Parametreleri ile Karşılaştırılması

Songül ŞEREFHANOĞLU\* , İsmet AYDOĞDU\*\* , Ersoy KEKİLİ\*\*\* , İrfan KUKU\*\*

\* İnönü Üniversitesi, Turgut Özal Tıp Merkezi, İç Hastalıkları AD, Malatya.

\*\* İnönü Üniversitesi, Turgut Özal Tıp Merkezi, İç Hastalıkları AD, Hematoloji Bilim Dalı, Malatya.

\*\*\* İnönü Üniversitesi, Turgut Özal Tıp Merkezi, Nükleer Tıp AD, Malatya.

### ÖZET

Kobalamin eksikliğine bağlı megaloblastik aneminin değişken klinik belirti ve laboratuvar bulgularının olması tanıda zorluklara neden olmaktadır. Serum holotranskobalamin II (holoTC II) düzeyinin azalmasının kobalamin eksikliğinin tanısında erken bir markır olduğu belirtilmekle birlikte, klinik kullanıma uygun bir metot geliştirilmemiştir. Bu çalışmada, kobalamin eksikliğini belirlemede yeni bir ticari test olan holoTC II RIA (Radyoimmüno assay)'nin etkinliği ve diğer laboratuvar bulguları ile karşılaştırılması amaçlandı. Başvuru anında, 20 hastanın 14'ünde (%70) anemi ve makrositoz, dokuzunda (%45) trombositopeni, yedisinde (%35) nötropeni, 10'unda (%50) serum kobalamin düzeyleri (<100 pg/mL) ve 19'unda (%95) holoTC II düzeyi düşük (<37 pmol/L) bulundu. On gün 1 mg/gün siyanokobalamin tedavisi sonrası hemoglobin, hematokrit, trombosit, serum kobalamin ve serum holoTC II değerlerinde tedavi öncesi ile mukayese edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı derecede artış oldu (P<0.05). MCV, LDH ve indirekt bilirubin değerlerinde ise azalma oldu (P<0.05). Plazma holoTC II düzeyinin ölçümünün kobalamin eksikliğini belirlemede daha yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip olduğu bulundu.

**Anahtar Kelimeler:** Vitamin B<sub>12</sub> eksikliği. Holotranskobalamin II. Radyoimmünoassay.

**Value of Holotranscobalamin II Measured by RIA in the Diagnosis of Megaloblastic Anemia in Comparison with other Diagnostic Parameters**

### ABSTRACT

The presence of variations in the clinical signs and laboratory findings of megaloblastic anemia due to cobalamin deficiency causes difficulty in the diagnosis. While decreased serum levels of holo-transcobalamin II (holoTC II) is thought to be an early marker in the diagnosis of cobalamin deficiency, no suitable method for clinical use has been developed. In this study, determination of the value of a new commercial test, holoTC II RIA in the diagnosis of cobalamin deficiency, and the comparison of this test with other laboratory markers were aimed. At the admission, anemia and macrocytosis, thrombocytopenia, neutropenia, cobalamin levels <100 pg/mL, and holo tc II levels less than normal (<37 pmol/L) were found in 14 (70%), 9 (45%), 7 (35%), 10 (50%), and 19 (95%) of the 20 patients, respectively. After a 10-day course of 1 mg/day cobalamin treatment, a significant increase occurred in the value of hemoglobin, hematocrite, thrombocyte, and serum cobalamin and holoTC II when compared to their respective values before the therapy (P<0.05). But, a decrease in the values of MCV, LDH, and unconjugated bilirubin occurred (P<0.05). It was found that the measuring of the plasma levels of holo TC II has a higher sensitivity and specificity in the determination of cobalamin deficiency.

**Key Words:** Vitamin B<sub>12</sub> deficiency. Holotranscobalamin II. Radioimmünoassay.

Geliş Tarihi: 23.01.2006

Kabul Tarihi: 30.05.2006

\* Çalışma Uludağ Hematolojik Onkoloji Kongresine (2006) Bildiri Olarak Gönderilmiştir.

Dr. Songül ŞEREFHANOĞLU,  
Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri,  
İç Hastalıkları A.B.D  
Hematoloji Bilim Dalı,  
ANKARA  
E-mail: drsongul1978@yahoo.com  
Tel: 05052517919  
İş Tel: 03123055000

Vitamin B<sub>12</sub> (kobalamin) eksikliği özellikle yaşlıları etkileyen sık görülen bir halk sağlığı problemidir<sup>1</sup>. Yaşlılardaki prevalansı %5-15 olarak tespit edilmiştir<sup>2</sup>. Yiyeceklerle alımının azalması veya bağırsaklardan emiliminin bozulması sonucunda vitamin B<sub>12</sub> eksikliği meydana gelmektedir. Vitamin B<sub>12</sub> eksikliği megaloblastik anemi, kardiovasküler hastalık, nöral tüp defekti ve santral ve periferik sinir sisteminde ilerleyici nörolojik hastalığa neden olmaktadır<sup>3-6</sup>.

Kobalamin eksikliğinin tanısı rutin olarak azalmış serum kobalamin düzeyi ile birlikte megaloblastik aneminin klinik ve laboratuvar bulgularının olması

ve anamnez ile konulmaktadır<sup>7</sup>. Kobalamin eksikliğinin gelişimi yavaş olduğundan dolayı başlangıçta hastalar asemptomatik olabilir. Ayrıca, vitamin B<sub>12</sub> eksikliğinde görülen klinik semptom ve bulgular ve anemi, retikülositopeni, makrositoz, nötropeni, trombositopeni, nötrofillerde hipersegmentasyon, serum laktat dehidrogenaz ve indirek bilirubinlerde artışı içeren laboratuvar bulguları çeşitlilik göstermektedir<sup>8</sup>. Nörolojik ve psikiyatrik semptom ve bulgular megaloblastik aneminin laboratuvar bulguları olmaksızın görülebilir<sup>7</sup>. Klinik ve laboratuvar bulgularındaki bu değişkenlik tanıda gecikmeye ve buna bağlı olarak morbiditede artışa yol açabilmektedir. Hematolojik bozukluklar tedaviden sonra düzelerken nörolojik bozukluklar geri dönüşümsüz olabilir<sup>9</sup>. Bu nedenle vitamin B<sub>12</sub> eksikliğinin erken tanısı önemlidir.

Serum kobalamin düzeylerinin ölçümü güvenilir değildir ve tanıda zorluğa neden olabilmektedir. Plasma total homosistein ve metilmalonik asit (MMA) gibi fonksiyonel kobalamin durumunu gösteren testler tanıda kullanılabilir fakat bu metabolit ölçümlerinin kullanımını sınırlayan başlıca faktör maliyetinin yüksek olmasıdır<sup>7</sup>.

Holotranskobalamin II (holoTC II) vitamin B<sub>12</sub> ve transkobalaminin (TC) oluşturduğu bir kompleksir. Total serum kobalamininin % 25'inden daha azı holoTC II ile taşınmaktadır. Bununla birlikte, holoTC vitamin B<sub>12</sub>'nin fizyolojik olarak aktif metabolitidir ve sadece bu formu spesifik reseptörler aracılığı ile hücrelere alınmaktadır. Serum vitamin B<sub>12</sub>'nin geriye kalan kısmı haptocorrin (HC) adı verilen bir diğer taşıyıcı proteine bağlı olup, bu kompleksin fonksiyonunu tam olarak bilinmemektedir<sup>1</sup>.

HoloTC II'nin serum yarılanma ömrü sadece 0.75 gün olup, holoTC II düzeyindeki azalmanın vitamin B<sub>12</sub> eksikliğinin en erken bulgusu olduğu belirtilmektedir<sup>9</sup>. Bununla birlikte holoTC II düzeyini ölçmede standart bir yöntem bulunmamaktadır. Bu amaçla yeni bir ticari test olan holoTC RIA geliştirilmiştir<sup>10</sup>. Bu çalışmada, vitamin B<sub>12</sub> eksikliğinin tanısında rutinde kullanılmakta olan laboratuvar bulguları ile holoTC RIA testinin duyarlılık ve özgüllüğünün karşılaştırılması amaçlandı.

## Gereç ve Yöntem

Çalışma 2004 yılında, 7 aylık dönemde İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Turgut Özal Tıp Merkezi, Hematoloji bilim dalında vitamin B<sub>12</sub> eksikliğine bağlı megaloblastik anemi tanısı konulan 20 hastada prospektif olarak yapıldı.

Hastaların tanısı; anamnez, fizik muayene, periferik yaymada makro-ovalositoz ve hipersegmente nötrofillerin varlığı (altı ya da daha fazla loblu bir nötrofil veya nötrofillerin %5'inden daha fazlasının 5

loblu olması), kemik iliği aspirasyonunda megaloblastik değişiklikler, retikülosit sayısında düşme ile serum laktat dehidrogenaz seviyesinde ve indirek bilirubin düzeylerinde artış ile konuldu. Hastalara mide endoskopisi ve biyopsisi yapıldı.

Çalışmaya yeni tanı konulan megaloblastik anemili hastalar alındı. Folik asit eksikliğine bağlı olan megaloblastik anemiler ve demir eksikliğinde eşlik ettiği dimorfik anemiler çalışmaya alınmadı. Daha önce tanı konulan ve tedavi alan veya herhangi bir nedenden dolayı siyanokobalamin tedavisi gören hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Hastalardan tüm veriler siyanokobalamin tedavisinden önce ve tedavinin 10. gününde alındı. Bütün hastalara tedavi amacıyla siyanokobalamin (Dodex 1000 µg ampul) 10 gün süresince intramusküler olarak uygulandı.

Hastalardan 5 -10 ml kan alınıp cam tüplere konuldu, daha sonra 30-60 dakika oda sıcaklığında pıhtılaşmaya bırakıldı. 10 dakika kadar santrifüj edildi ve serumu ayrıştırılarak kuru plastik tüplere konuldu, ağzı kapatılıp derin dondurucuda saklandı.

Serum holoTC direk olarak yeni bir ticari RIA (HoloTC RIA; Axis Shield ASA) testi ile çalışıldı<sup>1</sup>. Kısaca, 400 µL serum 400 µL 0.1 mol/l fosfat-tamponlu serum fizyolojik ile seyreltildi ve anti-TC antikorları ile kaplı manyetik partiküller ilave edildi. Örnekler oda sıcaklığında bir saat süreyle karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında partiküllere bağlı holoTC bir manyetik yüzeyde çöktüldü, üstte kalan kısım atıldı ve çökelti fosfat-tamponlu serum fizyolojik ile yıkandı. HoloTC konsantrasyonu rekombinan insan holoTC ile standardize edilmiş RIA ile belirlendi. Burada, bağlayıcı olarak intrinsik faktör ve tracer olarak <sup>57</sup>Co-işaretili vitamin B<sub>12</sub> kullanıldı. Kalibrasyon için holoTC kalibratörleri kullanıldı. Tüm örnekler iki defa çalışıldı. HoloTC için normal referans aralığı 37-171 pmol/L olarak kullanıldı.

Tam kan sayımları Coulter STKS (Beckman-Coulter, England) hematoloji analizörü ile çalışıldı. Serum total kobalaminini bir kompetitif protein bağlayıcı yöntem (DPC, Immulite 2000) ile çalışıldı. Serum kobalamin için 100-900 pg/mL arası değerler normal kabul edildi<sup>2,11-12</sup>.

## İstatistik Analiz

Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde "SPSS 10.0 For Windows" paket programları kullanılmıştır. Hastaların verileri normal dağılım göstermediği için Wilcoxon İşaret Sıra testi kullanılarak SPSS (Statistical Program for Social Science version 10.0 Chicago USA) programı ile değerlendirildi. Değerler ortalamalar (en düşük değer- en yüksek değer) olarak verildi. P<0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## Bulgular ve Sonuçlar

Yedi aylık periyotta toplam 20 hastaya megaloblastik anemi tanısı konuldu. Hastaların tedavi öncesi özellikleri Tablo I'de gösterilmiştir. Hastaların 14'ünde (%70) anemi, dokuzunda (%45) trombositopeni ve yedisinde (%35) nötropeni tespit edildi. MCV değerleri hastaların 14'ünde (%70) yüksek, dördünde (%20) normal ve ikisinde (%10) düşük olarak tespit edildi. Hastaların 10'unda (%50) serum kobalamin düzeyleri <100 pg/mL ve geriye kalan 10 hastada (%50) ise >100 pg/mL olarak tespit edildi (Tablo I). Tedavi öncesinde hastaların 16'sına üst gastrointestinal sistem endoskopi ve endoskopik biyopsi yapıldı; sekiz hastada (%40) antral gastrit, beş hastada (%25) normal üst gastrointestinal sistem bulguları ve iki hastada (%10) atrofik gastrit ve bir hastada (%5) opere mide (subtotal gastrektomi) tespit edildi. Tedavi öncesi yapılan kemik iliği aspirasyonunda hastaların tümünde eritroblastlarda megaloblastik değişiklikler tespit edildi. Kobalamin tedavisinin yedinci gününde hastaların tümünde tedaviye cevap olarak retikülosit krizi görüldü.

Hastaların tedavi sonrası hb, htc, trombosit sayısı, serum kobalamin ve holoTC II değerlerinde tedavi öncesi ile mukayese edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı derecede artış oldu (Tablo II). MCV, LDH ve indirekt bilirübin değerlerinde tedavi öncesi ile mukayese edildiğinde tedaviden sonra anlamlı derecede azalma oldu. Tedavi öncesi ile karşılaştırıldığında tedavi sonrasında beyaz küre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadı (p=0.148). Tedavi öncesinde normalin altında serum kobalamin değerleri hastaların sadece %50'sinde saptandı. Sadece bir hastada (%5) tedavi öncesi serum holo TC II değeri 43.75 pmol/L olarak tespit edildi, diğer 19 hastada (%95) <37 pmol/L olarak tespit edildi (Tablo II).

**Tablo I.** Hastaların tedavi öncesi özellikleri

Yaş (yıl)	Ortalama 50.85 ± 15 (27-85)
Cinsiyet	
Kadın	10 (%50)
Erkek	10 (%50)
Laboratuvar Özellikleri	
Anemi	14 (%70)
Trombositopeni	9 (%45)
Nötropeni	7 (%35)
Hipersegmentasyon	16(%80)
LDH artışı	20 (%100)
İndirekt bilirübin atışı	3 (%15)
Vitamin B <sub>12</sub> (<100 pg/mL)	10 (%50)
HoloTC II RIA (<37 pmol/L)	19 (%95)

**Tablo II.** On günlük siyanokobalamin tedavisi öncesi ve sonrasında hastaların tanı parametreleri

	Tedavi öncesi	Tedavi sonrası	P değeri
Hemoglobin (g/dL)	9.06 (4.9-16.2)	10.1 (5.8-15.4)	0,020
Hematokrit (%)	27.26 (13.4-50.7)	30.8 (17.3-46.2)	0,031
MCV (fL)	103.18 (70-136.20)	98.7 (69-132)	0,005
Lökosit (/mm <sup>3</sup> )	5665 (1100-18100)	5965 (2500-11000)	0,148
Platelet (/mm <sup>3</sup> )	167100 (24000-418000)	297765 (89000-665000)	0,003
LDH (U/L)	4115 (292-14470)	1534 (250-6177)	0,003
İndirekt bilirübin (mg/dL)	1 (0.1-2.6)	0.6 (0.1-1.47)	0,026
Serum kobalamin (pg/mL)	135 (<100-315)	1069 (349-1200)	<0,001
Serum HoloTC II (pmol/L)	11.87 (0.36-43.75)	2435.75 (0.01-10761.09)	0.003

## Tartışma

Kobalamin eksikliğinin klinik ve laboratuvar özellikleri değişken ve nonspesifiktir. Klinik ve laboratuvar bulgularındaki bu değişkenlik morbidite de artışa yol açabilecek derecede tanıda gecikmeye neden olabilir. Kobalamin eksikliğinin neden olduğu hematolojik bozukluklar tedavi ile düzelebilirken nörolojik bozukluklar geri dönüşümsüz olabilir<sup>13-16</sup>.

Ayrıca hematolojik ve nöropsikiyatrik bozukluklara ilaveten vitamin B<sub>12</sub> eksikliğinin indirekt kardiyovasküler etkileri de bulunmaktadır. Folik asit eksikliğine benzer şekilde vitamin B<sub>12</sub> eksikliği de aterosklerotik hastalığın bağımsız bir risk faktörü olup hiperhomosisteinemiye yol açmaktadır<sup>17</sup>.

Kobalamin eksikliğinin tanısında rutinde kullanılan laboratuvar bulguları, serum kobalamin düzeyinde azalma, anemi, retikülositopeni, makrositoz, nötropeni, trombositopeni, hipersegmente nötrofiller ve serum LDH ve indirekt bilirübin artışının olmasıdır<sup>8</sup>.

Makrositoz (MCV >96 fl), kobalamin eksikliğinin önemli bir bulgusudur. MCV hemoglobin değerlerinde belirgin bir azalma meydana gelmeden önce yükselme eğilimindedir<sup>18</sup>. Bununla beraber, özellikle demir eksikliği ve talaseminin eşlik ettiği durumlarda normal ve hatta düşük bulunabilir<sup>19-22</sup>. Buna ek olarak, makrositozun kobalamin eksikliğinin tanısındaki özgüllüğü de düşüktür. Yapılan bir çalışmada, MCV'si 115 fl'den büyük olan hastaların %50'sinden daha azında kobalamin değerleri subnormal değerlerde bulunmuş ve sadece MCV'si 130 fl'den büyük olan bir hastada serum kobalamin değeri düşük olarak bulunmuştur<sup>23</sup>. Bizim çalışmamızda da, hastalarımızın sadece % 70'inde

makrositoz (MCV >100 fl) tespit ettik. Geriye kalan altı hastanın dördünde normal ve ikisinde düşük değerler saptandı.

Periferik yaymada nötrofillerde hipersegmentasyonun varlığı kobalamin eksikliğinin bir diğer bulgusudur, fakat bunun da özgüllüğü ve duyarlılığı düşüktür. Metz ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, kobalamin düzeyi düşük olan hastaların 2/3'ünde ve normal kontrol grubunun da %4'ünde hipersegmentasyon gösterilmiştir<sup>7</sup>. Çalışmamızda, hastalarımızın %80'inde<sup>16-20</sup> hipersegmentasyon saptandı.

Serum kobalamin düzeyinin ölçümü kobalamin eksikliğinin tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, serum kobalamin ölçümünün tanı değeri düşüktür. Bunun nedeni, serumdaki kobalaminin büyük bir kısmının haptocorrine bağlı olmasıdır. Haptocorrine bağlı kobalamin ise hücrelerin içine alım için uygun değildir<sup>7</sup>. Ayrıca, serum kobalamin değerleri bağlayıcı proteinlerin düzeyine bağlı olarak değişmektedir<sup>24</sup>. Miyeloproliferatif hastalıklar yalnızca yüksek değerlere neden olabilirken, folat eksikliği, gebelik ve transkobalamin eksikliğinde yalnızca düşük değerler görülebilir. Sindirim sisteminde aşırı bakteriyel çoğalma bakteriler tarafından biyolojik olarak inaktif kobalamin analoglarının üretimine neden olarak yalnızca normal serum kobalamin ölçümüne yol açabilir<sup>7</sup>. Serumdaki kobalaminin normal düzeyi 200–900 pg/mL olup, <100 pg/mL değerler klinik olarak belirgin eksikliği gösterir. Çalışmamızda hastalarımızın sadece 10'unda (%50) serum kobalamin değerini <100 pg/mL olarak bulduk.

Yapılan çeşitli çalışmalarda, holoTC II ölçümünün total plazma kobalamin ölçümünden daha etkili olduğu gösterilmiştir. Lindemans ve ark. holoTC II'nin hücreler tarafından alınabilen biyolojik olarak aktif kobalamini ihtiva ettiğini göstermişlerdir<sup>25</sup>. Bu çalışmada, holo TC II ölçümünün aynı zamanda oldukça basit ve kolay olduğu da belirtilmiştir. Herzlich ve Herbert tarafından yapılan bir çalışmada, tedavi edilmemiş vitamin B<sub>12</sub> eksikliği olan hastalarda holoTC II deki azalmanın vitamin B<sub>12</sub> eksikliğinin oldukça erken bulgularından biri olduğu gösterilmiştir<sup>26</sup>. Lindgren ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada, çalışmaya alınan kobalamin malabsorpsiyonu ile ilişkili gastrointestinal bozukluğu tespit edilen 48 hastanın hepsinde plazma holoTC II düzeyi 35 pmol/L'nin altında (referans aralığı 35–160 pmol/L) tespit edilmiş ve bu testin olası malabsorpsiyonu serum kobalamin ölçümünden daha iyi bir şekilde yansıtabileceği gösterilmiştir<sup>27</sup>. Herbert ve ark. tarafından 95 yetişkin AIDS'li hastada yapılan bir çalışmada, holoTC II değerlerinin ölçümü ile hastaların büyük bir kısmında negatif vitamin B<sub>12</sub> dengesi saptanmıştır. Bu hastaların büyük bir kısmında ise serum kobalamin düzeyleri normal değerde bulunmuştur<sup>28</sup>.

Nexo ve ark. yaptıkları çalışmada, holoTC II'yi 137 sağlıklı kişinin %95'inde normal değerlerde saptarken, vitamin B<sub>12</sub> eksikliği olan hastaların tamamında referans aralığının oldukça altında değerlerde tespit etmişlerdir<sup>29</sup>. Bor MV ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, 31 sağlıklı kişide oral yoldan uygulanan vitamin B<sub>12</sub> absorpsiyonunu holoTC II ve TC saturasyonu, serum vitamin B<sub>12</sub> düzeyinden daha iyi yansıttığı gösterilmiştir<sup>30</sup>. Çalışmamızda da benzer şekilde, tedavi öncesi holoTC II değerini ortalama 11,87 ± 13,95 pmol/L (referans aralık 37–171 pmol/L) olarak tespit ettik. Hastaların 19'unda (%95) holoTC II değerleri 37 pmol/L'nin altında tespit edildi ve sadece bir hastada normal değerde bulundu. Hastalara 10 gün süresince parenteral olarak uygulanan 1000 µg/gün siyanokobalamin tedavisinden sonra ortalama holoTC II değeri 2435,75 (0.01–10761.09) pmol/L olarak bulundu ve bu artış tedavi öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (p=0,003).

Bu sonuçlara göre, holoTC II klinik veya subklinik vitamin B<sub>12</sub> eksikliğinin tanısında erken tanı bulgusu olarak kullanılabilir ve rutinde kullanılmakta olan laboratuvar testlerine kıyasla oldukça yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahiptir. Bu sayede riskli kişilerde nörolojik bozukluklar gelişmeden önce erken tanı konularak geri dönüşümsüz olaylar engellenebilir.

## Kaynaklar

1. Ulleland M, Ellertsen I, Quadros EV, Rothenberg SP, Fedosov SN, Sundrehagen E, et al. Direct assay for cobalamin bound to transcobalamin (Holo-Transcobalamin) in serum. *Clin Chem* 2002;48: 526–32.
2. Pennypacker LC, Allen RH, Kelly JP, Matthews LM, Grigsby J, Kaye K, et al. High prevalence of cobalamin deficiency in elderly outpatients. *J Am Geriatr Soc* 1992;40: 1197–204.
3. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Notulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA* 1995;274:1049–57.
4. Mills JL, Scott JM, Kirke PN, McPartlin JM, Conley MR, Weir DG, et al. Homocysteine and neural tube defects. *J Nutr* 1996;126:756–60.
5. Graham IM, Dali LE, Refsum HM, Robinson K, Brattsröm LE, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA* 1997;277:1775–81.
6. Afman LA, Van Der Put NM, Thomas CM, Trijbels JM, Blom HJ. Reduced vitamin B12 binding by transcobalamin II increases the risk of neural tube defects. *QJM* 2001;94: 159–66.
7. Kartı SS, Ratip S, Yılmaz M, Ukinç K, Örem A, Adıgüzel C ve ark. Therapeutic trial of cobalamin in patients with normal serum cobalamin levels and predicted cobalamin deficiency. *Turk J Haematol* 2003;20: 69–74.
8. Allen RH. Megaloblastic anemias. In: Goldman L, Bennet JC (eds). *Cecil Textbook of Medicine*. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000. 859–67.
9. Nexo E, Hvas AM, Bleie O, Refsum H, Fedosov SN, Vollset SE, et al. Holo-transcobalamin is an early marker of changes

## Megaloblastik Anemide Holotranskobalamin II'nin RIA ile Ölçümü

- in cobalamin homeostasis. A randomized placebo-controlled study. *Clin Chem* 2002;48: 1768–71.
10. Loikas S, Lopponen M, Suominen P, Moller J, Irjala K, Isoaho R, Kivela SL, Koskinen P, Pelliniemi TT. RIA for serum holo-transcobalamin: method evaluation in the clinical laboratory and reference interval. *Clin Chem* 2003;49: 455–62.
  11. Zittoun J, Zittoun R. Modern clinical testing strategies in cobalamin and folate deficiency. *Semin Hematol* 1999;36: 35–46.
  12. Gren R. Screening for vitamin B<sub>12</sub> deficiency: caveat emptor. *Ann Intern Med* 1996;124: 509–11.
  13. Halliday AW, Vukelja SJ. Neurologic manifestations of vitamin B-12 deficiency in a military hospital. *Mil Med* 1991;156:201–4.
  14. Heaton EB, Savage DG, Brust JC, Garrett TJ, Lindenbaum J. Neurologic aspects of cobalamin deficiency. *Medicine(Baltimore)* 1991;70: 229–45.
  15. Roach ES, Mclean WT. Neurologic disorders of vitamin B12 deficiency. *Am Fam Physician* 1982;25: 111–5.
  16. Beck WS. Neuropsychiatric consequences of cobalamin deficiency. *Adv Intern Med* 1991;36: 33–56.
  17. Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997;337: 230–6.
  18. Van Sant PV, Kusters PF, Harthoorn-Lasthuizen EJ. Dependency of MCV and hemoglobin concentration on plasma vitamin B12 levels in relation to sex and age. *Clin Lab Haematol* 1997;19: 27–31.
  19. Seward SJ, Safran C, Marton KI, et al. Does the mean corpuscular volume help physicians evaluate hospitalized patients with anemia? *J Gen Intern Med* 1990;5: 187–91.
  20. Gren R, Kuhl W, Jacobsen R, Johnson C, Carmel R, Beutler E. Masking of macrocytosis by alpha-thalassemia in blacks with pernicious anemia. *N Engl J Med* 1982;307: 1322–5.
  21. Spivak JL. Masked megaloblastic anemia. *Arch Intern Med* 1982;142: 2111–4.
  22. Lee CA, Fielding J. Combined dietary vitamin B12 deficiency and  $\beta$ -thalassaemia trait. *Lancet* 1975;2: 127–8.
  23. McPhedran P, Barnes M, Weinstein JS, Robertson JS. Interpretation of electronically determined macrocytosis. *Ann Intern Med* 1973;78: 677–83.
  24. Wickramasinghe SN and Fida S. Correlations between holo-transcobalamin II, holo-haptocorrin, and total B<sub>12</sub> in serum samples from healthy subjects and patients. *J Clin Pathol* 1993;46: 537–9.
  25. Lindemans J, Schhoester M, Van Kapel J. Application of a simple immunoadsorption assay for the measurement of saturated and unsaturated transcobalamin II and R-Binders. *Clin Chim Acta* 1983;132: 53–61.
  26. Herzlich B, Herbert V. Depletion of serum holotranscobalamin II. An early sign of negative vitamin B<sub>12</sub> balance. *Lab Invest* 1988;58: 332–7.
  27. Lindgren A, Kilander A, Bagge E, Nexo E. Holotranscobalamin- a sensitive marker of cobalamin malabsorption. *Eur J Clin Invest* 1999;29: 321–9.
  28. Herbert V, Fong W, Gulle V, Stopler T. Low transcobalamin II is the earliest serum marker for subnormal vitamin B<sub>12</sub> (cobalamin absorption in patients with AIDS). *AM J Hematol* 1990;34: 132–9.
  29. Nexo E, Christensen A-L, Hvas A-M, Petersen TE, Fedosov S. Quantification of holo-transcobalamin, a marker of vitamin B<sub>12</sub> deficiency. *Clin Chem* 2002;48: 561–2.
  30. Bor MV, Nexo E, Hvas AM. Holo-transcobalamin concentration and transcobalamin saturation reflect recent vitamin B<sub>12</sub> absorption better than does serum vitamin B<sub>12</sub>. *Clin Chem* 2004;50:1043-9.