



Işıktan Korunan ve Korunmayan Tüplerde Vitamin B₁₂ Düzeylerinin Karşılaştırılması

Comparison of Vitamin B₁₂ Levels in Light-Protected and Normal Tubes

Ayşegül Keleş, Nilhan Nurlu Ayan, Nilgün Bireroğlu, Zeynep Savaş, N. Özden Serin

Gaziosmanpaşa Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Amaç: B₁₂ vitamini (siyanokobalamin) suda çözünen hematopoetik bir vitamindir ve genel olarak somatik hücre metabolizmasında görev alır. Rutin biyokimya laboratuvarlarında B₁₂ vitamininin kantitatif olarak belirlenmesi sıklıkla elektrokemilüminesans-immünoetik direkt yöntemle olmaktadır. Laboratuvar Testleri Kılavuzlarında preanalitik süreçte B₁₂ vitamininin ışıktan korunmasıyla ilgili uyarılar doğrultusunda çalışmamızda ışığın ve bekleme süresinin B₁₂ vitamini üzerine etkisini araştırmayı hedefledik.

Yöntemler: Hastanemiz polikliniklerine başvuran hastalardan rastgele 27 kadın 25 erkek olmak üzere 52 gönüllü seçildi. Bu çalışma için önceden siyah bantla sarılarak ışıktan korunmak üzere karartılmış tüpler hazırlandı. Gönüllülerin kanları, karartılmış ve şeffaf normal 8 mL'lik jelli kuru tüplere, her gönüllüden iki tüp olmak üzere eş zamanlı alındı. Bu örnekler Roche Hitachi Modular E 170 otoanalizöründe elektrokemilüminesans immünoetik test (ECLIA) yöntemiyle 0 ve 12. saatlerde çalışıldı. Bu çalışmanın istatistiksel analizinde ikili grupların karşılaştırmasında Mann-Whitney U testi, 0 ve 12. saat değerlendirilmesinde Wilcoxon testi kullanılmıştır. Sonuçlar, anlamlılık p<0,05 düzeyinde değerlendirilmiştir.

Bulgular: Karartılmış tüpler şeffaf tüplerle karşılaştırıldığında, 0 ve 12. saat B₁₂ vitamini değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p>0,05). Karartılmış tüplerde çalışılan grubun 0 ve 12. saat fark ve değişim % değerleri, şeffaf tüplerde çalışılan gruptan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p<0,05).

Sonuç: Bu çalışma, hastanemiz poliklinik saatlerinin en yoğun olduğu rutin çalışma akışında gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda 0. saat vitamin B₁₂ testlerinin çalışılabilmesi amacıyla her hasta için ortalama 1,5 saat süre geçmiştir. Bu süre içerisinde (0. saat) ve 12. saatte örneklerin ışığa maruziyeti vitamin B₁₂ sonuçlarını etkilememiştir. Bekleyecek örneklerin vitamin B₁₂ çalışmalarında karartılmış tüp kullanımı, değişim yüzdesi ve farkların istatistiksel anlamlılığı açısından değerlendirildiğinde ve maliyet etkinlik oranı düşünüldüğünde göz ardı edilebilir. (JAREM 2015; 5: 14-6)

Anahtar Sözcükler: Vitamin B₁₂, immünölçüm, preanalitik interferans

ABSTRACT

Objective: Vitamin B₁₂ (cyanocobalamin) is a water soluble hematopoietic vitamin that functions in somatic cell metabolism. Vitamin B₁₂ is commonly measured by direct chemiluminescence immunoassay methods in routine biochemistry laboratories. Serum samples to be tested for vitamin B₁₂ are recommended to be kept protected from light. On the basis of this information, we aimed to evaluate the effect of light and waiting time till analysis on vitamin B₁₂ tests.

Methods: In total, 52 volunteers (27 women and 25 men) were included in our study. To prevent the effect of light, we prepared darkened tubes for blood collection. Simultaneously, two tubes of blood samples (one darkened and one normal) were drawn from each patient. The measurements were performed on the 0th and 12th hours using the Roche Hitachi Modular E 170 autoanalyser. The Mann-Whitney U test and Wilcoxon test were used, and p<0.05 was considered significant.

Results: There were no significant differences in vitamin B₁₂ levels between darkened and normal tubes on the 0th and 12th hours (p>0.05). In comparison with the baseline (0th hour), the percentage difference in darkened tubes were found to be significantly decreased on the 12th hour (p<0.05).

Conclusion: Our findings indicate that the need for the darkened tubes may be ignored when cost-effectiveness is considered. (JAREM 2015; 5: 14-6)

Keywords: Vitamin B₁₂, immunoassay, preanalytic interference

GİRİŞ

Vitamin B₁₂ (siyanokobalamin) suda çözünen, eritrositlerin matürasyonu için gerekli hematopoetik bir vitamindir. B₁₂ vitamini, merkezde yer alan kobalt atomlarını çevreleyen tetrapirrol halkalarından ve kobalt atomuna bağlı nükleotid yan zincirlerden oluşmaktadır. Kobalt ve diğer yan zincirleri içeren tetrapirrol halkası korin olarak adlandırılır ve bu korin nükleusu içeren tüm bileşikler koronoidlerdir. Kobalt-korin kompleksi ise kobamid olarak adlandırılır. Kobalamin, kobalt atomuna bağlı olan yan grupların niteliğine göre farklılık göstermektedir. Örneğin; metilkobalamin,

deoksiadenozil-kobalamin, hidroksikobalamin, siyanokobalamin gibi. Siyanokobalamin serum kobalamin metodu kalibrasyonunda kullanılan referans bileşiktir. Molekül ağırlığı 1355 daldondur ve ışığa maruziyette dereceli olarak yıkılmaktadır (1).

Vitamin B₁₂ mikrobiyal sentez ile üretilir. Et ve et ürünleri, hazır tahıl ürünleri, süt ve süt ürünleri, balık ve su ürünleri vitamin B₁₂ içeren temel besin kaynaklarıdır. B₁₂ vitamini, midenin parietal hücrelerinden salınan intrinsik faktör (IF) ile birleşir, distal ileum mukoza hücrelerinin yüzeyindeki reseptöre bağlanarak hücre içine alınır. Epitel hücresi içerisinde IF'den ayrılarak mukozal kapillere ve portal

Bu araştırma 13. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi'nde sunulmuştur, 25-28 Nisan 2013, Balçova-İzmir, Türkiye.

This study was presented at the 13th National Congress of Turkish Clinical Biochemistry Society, 25-28 April 2013, Balçova-İzmir, Turkey.



Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Dr. Ayşegül Keleş,
Gaziosmanpaşa Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya
Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye
Tel: +90 212 252 43 00 E-posta: dra.dikkaya@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received Date: 25.11.2014 **Kabul Tarihi / Accepted Date:** 15.12.2014

© Telif Hakkı 2015 Gaziosmanpaşa Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi. Makale metnine

www.jarem.org web sayfasından ulaşılabilir.

© Copyright 2015 by Gaziosmanpaşa Taksim Training and Research Hospital. Available on-line at www.jarem.org

DOI: 10.5152/jarem.2015.633

vene geçer. Hepatositler tarafından alınan vitamin B₁₂ karaciğerde depolanır. Diyetle yeterli derecede vitamin B₁₂ alınmaması veya emilim mekanizmalarındaki bozukluklar halinde vitamin B₁₂ eksikliği meydana gelir. Vitamin B₁₂ eksikliğinin en yaygın nedeni; gastrik parietal hücreler ve IF'ye otoantikör üretimi sonucunda kronik atrofik gastritle karakterize bir otoimmün hastalık olan pernisiyöz anemidir. Diğer nedenler arasında; malabsorbsiyon, vejeteryan diyet, bazı ilaçlar (fenitoin, dihidrofolat redüktaz inhibitörleri, metformin, proton pompa inhibitörleri vb.) sayılabilir. Vitamin B₁₂ eksikliğinde megaloblastik anemi ve nöropati (tedavi edilmediğinde irreversibl olabilir) görülmektedir (1, 2). Bu nedenle serumda vitamin B₁₂ düzeyi rutinde sık istenilen testlerden birisidir.

Genellikle birçok fiziksel ve kimyasal faktör vitamin B₁₂ stabilitesini negatif etkilemektedir. Solüsyon içerisindeki suda çözünen vitaminler özellikle ışığa maruz kaldıklarında parçalanmaya meyillidirler (3). Laboratuvar testleri kılavuzlarında ve kit prospektüslerinde preanalitik süreçte B₁₂ vitamin düzeyi analiz edilecek örnek tüplerinin ışıktan korunmasıyla ilgili uyarılar bulunmaktadır (4). Hastanemiz kan alma ünitelerinde vitamin B₁₂ istemi olan hastaların örnek tüplerinin ışığa maruz kalmamasıyla ilgili özel bir önlem alınmamaktadır. Bu doğrultuda çalışmamızda; örnek tüplerinin ışığa maruziyetinin ve bekleme süresinin B₁₂ vitamin düzeyi üzerine etkisini araştırmayı hedefledik.

YÖNTEMLER

Gaziosmanpaşa Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi polikliniklerine başvuran hastalardan rastgele 27 kadın 25 erkek olmak üzere 52 gönüllü seçildi. Hastaların yaş ortalaması 41±11 idi. Çalışmanın etik kurul onayı Gaziosmanpaşa Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (03.04.2013, Karar No:17). Bu çalışma için önceden siyah bantla sarılarak ışıktan korunmak üzere karartılmış tüpler hazırlandı. Hasta onamları alındıktan sonra gönüllülerin açlık kanları, karartılmış ve şeffaf normal 8 mL'lik jelli kuru tüplere (Beckton Dickinson, Plymouth, UK), her gönüllüden iki tüp olmak üzere eş zamanlı alındı. 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu örneklerin vitamin B₁₂ düzeyleri Roche Hitachi Modular E 170 otoanalizöründe Vitamin B₁₂ kitiyle (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) elektrokemilüminesans immünolojik test (ECLIA) yöntemiyle 0. ve 12. saatlerde (oda sıcaklığında, buharlaşmayı önlemek için tüp kapakları kapalı bekletildi) çalışıldı.

İstatistiksel Analiz

Bu çalışmanın istatistiksel analizinde, SPSS 11.0 paket programı (Statistical Package for the Social Sciences Inc; Chicago, IL, USA) kullanılmıştır. İkili grupların karşılaştırmasında Mann-Whitney U testi, 0 ve 12. saat değerlendirilmesinde Wilcoxon testi kullanılmıştır. Sonuçlar, anlamlılık p<0,05 düzeyinde değerlendirilmiştir.

BULGULAR

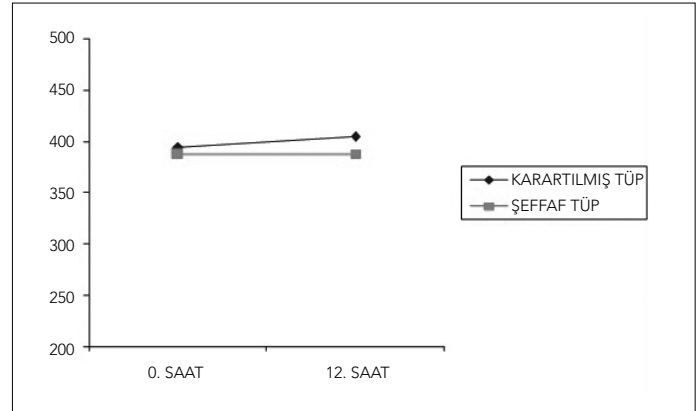
Karartılmış tüpler şeffaf tüplerle karşılaştırıldığında, 0 ve 12. saat B₁₂ vitamini değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p>0,05) (Tablo 1).

Karartılmış tüplerde çalışılan grubun 0 ve 12. saat fark ve değişim % değerleri, şeffaf tüplerde çalışılan gruptan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p<0,05) (Tablo 1). Karartılmış ve şeffaf tüplerde zamana göre ortalama vitamin B₁₂ değerleri şekilde gösterilmiştir (Şekil 1).

Tablo 1. Karartılmış ve şeffaf tüplerde vitamin B₁₂ değerlerinin karşılaştırılması

Zaman	Ortalama değerleri	Karartılmış tüp	Şeffaf tüp	p değeri
0. saat	X±SS	393,24±168,26	387,05±161,81	0,884
	Median (IQR)	361,75 (246,08-510,88)	362,3 (248-483,13)	
12. saat	X±SS	403,82±173,99	387,41±162,18	0,635
	Median (IQR)	362,4 (251,4-528,7)	353,3 (249,7-496)	
Fark	X±SS	-4,73±26,07	5,25±17,77	0,047
	Median (IQR)	-0,55 (-12,15-9,6)	2 (-3,48-14,25)	
Değişim %	X±SS	-1,71±7,72	1,12±3,61	0,039
	Median (IQR)	-0,19 (-4,34-2,42)	0,85 (-1,37-4,06)	

X±SS: Aritmetik ortalama±standart sapma olarak gösterilmiştir
IQR: Interquartile range
p<0,05; İstatistiksel olarak anlamlıdır



Şekil 1. Vitamin B₁₂ değerlerinin (Ortalama±Standart Deviasyon) zamana göre değişimi

TARTIŞMA

Laboratuvar testlerinin otomatize ölçümlerinin gelişmesi, hız kazanması ve geniş ölçüde kullanılabilirliği serum vitamin B₁₂ ve folat istemlerinde artışa yol açmıştır. Günümüzde çoğu klinisyen vitamin B₁₂, folat eksikliği veya hiperhomosisteinemi düşündükleri her vakada bu testleri isteme ihtiyacı içindedir (2).

Serum vitamin B₁₂ düzeylerinin direkt kantitatif olarak belirlenmesinde yarışmalı protein bağlayıcı ve immünometrik yöntemler kullanılırken, IF genellikle bağlayıcı protein olarak kullanılmaktadır. Alkali ortam veya kimyasal reaksiyonlarla vitamin B₁₂ bağlı olduğu proteinden ölçüm öncesinde uzaklaştırılır. Serum vitamin B₁₂, potasyum siyanid ile siyanokobalamine dönüştürülür ve ölçülür (1, 2).

Laboratuvar Testleri Kılavuzlarında ve kit prospektüslerinde preanalitik süreçte B₁₂ vitamin düzeyi analiz edilecek örnek tüplerinin ışıktan korunmasıyla ilgili uyarılar bulunmasına rağmen vitamin B₁₂ ölçüm sonuçlarına ışığın ve bekleme sürelerinin etkisiyle ilgili

çalışmalar literatürde sınırlıdır. Kosem ve ark. (5) vitamin B₁₂ ve folat ölçümlerinde kullanılan farklı kit ve cihaz sistemlerinin ışıktan farklı şekilde etkilenebileceğini bildirmiştir. On bir sağlıklı gönüllüden aldıkları kan örneklerinin serumlarını ayırdıktan sonra ikiye bölmüşler ve bir bölümü karanlıkta (grup 1), kalanı ışık altında (grup 2) kapakları kapalı olarak bekletmişlerdir. Tüm örneklerde 0, 8 ve 24. saatlerde çift ölçüm olacak şekilde vitamin B₁₂ ve folat ölçümü yapmışlardır. B₁₂ ölçümlerinin 24. saate kadar ışıktan etkilenmediğini (p>0,05), folat ölçümlerinin etkilendiğini (p<0,05) gözlemlemişlerdir. Aynı gün içinde yapılacak B₁₂ ve folat ölçümlerinde örneklerin karanlıkta saklanmasına gerek olmadığını bildirmişlerdir.

İnal ve ark. (6) 33 gönüllüden aldıkları kan örneklerinin 0. saat B₁₂ düzeylerini ölçtükten sonra, numunelerin her birini 2 tüpe ayırıp, kapakları kapalı şekilde aydınlıkta (grup 1) ve karanlıkta (grup 2) oda sıcaklığında bekletip 8 ve 24. saatlerde B₁₂ vitamin düzeylerini ölçmüşlerdir. Çalışmaları sonucunda; gün içinde ışığın B₁₂ vitamin düzeyleri üzerine etkisinin olmadığını ancak 24 saat bekletilen numunelerin ışıktan etkilendiğini saptamışlardır.

Bu çalışmada, örnek tüplerinin gün ışığına maruziyetinin ve analiz öncesi bekleme sürelerinin vitamin B₁₂ ölçüm sonuçlarına etkisi araştırılmıştır. Çalışmamız sonucunda karartılmış tüpler şeffaf tüplerle karşılaştırıldığında, 0 ve 12. saat B₁₂ vitamini değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Bu sonuç Kösem ve ark. yaptıkları çalışmalarının sonucuyla uyumludur. Karartılmış tüplerde çalışılan grubun 0 ve 12. saat fark ve değişim % değerleri, şeffaf tüplerde çalışılan gruptan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur.

SONUÇ

Hastanemiz kan alma ünitelerinin yoğun olduğu saatlerde hastalardan alınan örnekler aynı gün içerisinde sonuçlandırılmakla birlikte, çalışılmadan önce belli bir zaman geçmektedir. Bekleyecek örneklerin vitamin B₁₂ çalışmalarında karartılmış tüp kullanımı, değişim yüzdesi ve farkların istatistiksel anlamlılığı açısından değerlendirildiğinde önerilebilir. Ancak maliyet-etkinlik oranı düşünüldüğünde bekleme süresi ve ışığa maruziyetin B₁₂ değerlerindeki değişim üzerine etkisi göz ardı edilebilir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Gaziosmanpaşa Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

Hasta Onamı: Yazılı hasta onamı bu çalışmaya katılan hastalardan alınmıştır.

Hakem değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - A.K., N.N., Z.S.; Tasarım - N.N., N.O.S., N.B.; Denetleme - A.K., N.N., N.O.S.; Kaynaklar - A.K., N.B., Z.S.; Malzemeler - N.N., A.K.; Veri toplanması ve/veya işlemesi - A.K., N.B., Z.S.; Analiz ve/veya yorum - N.O.S., Z.S.; Literatür taraması - N.N., A.K.; Yazıyı yazan - N.N., A.K.; Eleştirel İnceleme - N.O.S., N.N., A.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Gaziosmanpaşa Taksim Training and Research Hospital.

Informed Consent: Informed consent was obtained from patients who participated in this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author contributions: Concept - A.K., N.N., Z.S.; Design - N.N., N.O.S., N.B.; Supervision - A.K., N.N., N.O.S.; Resource - A.K., N.B., Z.S.; Materials - N.N., A.K.; Data Collection and/or Processing - A.K., N.B.; Analysis and/or Interpretation - N.O.S., Z.S.; Literature Search - N.N., A.K.; Writing - N.N., A.K.; Critical Reviews - N.O.S., N.N., A.K.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

KAYNAKLAR

1. Shenkin A, Roberts B.N. Vitamins, trace elements and nutritional assessment. In: Burtis CA, Brunis DE, editors. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Seventh ed. St Louis: Elsevier; 2014. p. 473-5.
2. Klee GG. Cobalamin and folate evaluation: Measurement of methylmalonic acid and homocysteine versus vitamin B12 and folate. Clinical Chemistry 2000; 46: 1277-83.
3. Monajjemzadeh F, Ebrahimi F, Zakeri-Milani P, Valizadeh H. Effects of formulation variables and storage conditions on light protected vitamin B12 mixed parenteral formulations. Adv Pharm Bull 2014; 4: 329-38.
4. Chernecky CC, Berger BJ. Laboratory Tests and Diagnostics Procedures. 6th ed. St Louis: Elsevier; 2013. p. 1180-1.
5. Kosem A, Senes M, Topkaya C, Yucel D. Effect of light on serum vitamin B12 and folate levels. Turk J Biochem 2007; 32: 61-4.
6. İnal BB, Şahin M, Usta M, Aral H, Emecen Ö, Güvenen G. Serum B12 vitamini ölçümünde ışığın etkisi. İstanbul Tıp Dergisi 2008; 1: 6-8.