

Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü, 1934 yılında, kötüçül aneminin (PA) tedavisini keşfettikleri için George Whipple, George Minot ve William Murphy'ye verildi.

Anemi Tedavisinin Keşfi, B12 Vitamini

Merve Çalışır ve Dr. Adil Denizli

Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Beytepe, Ankara

Giriş

Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü, 1934 yılında, aneminin (PA) tedavisini keşfettikleri için George Whipple, George Minot ve William Murphy'ye verildi. Minot ve Murphy, 45 hastayı günlük yarım kilo çığ veya hafif pişmiş sığır karaciğeri ile besledi. Bir hafta içinde retikülosit sayısında bir artış, dilde ve sindirim semptomlarında hızlı bir iyileşme gözlemlenildi, 60 gün içinde de kan sayımları normale döndü. Karaciğer seçimi, Whipple'ın tekrar tekrar kanları alınan ve standart bir diyetle tabii tutulan köpekler üzerinde yaptığı deneylere dayanıyordu. Diyetle karaciğer eklenmesinin, kan rejenerasyonunu uyarmada ve deneysel olarak indüklenen anemiye düzeltmede iyi sonuçlar verdiğini buldu. PA'da aneminin nedeni olarak beslenme yetersizliğinin keşfi, 1948'de B12 vitamini izolasyonunun yolunu açtı. Bu aynı zamanda Lucy Wills'in beslenme alanındaki araştırmalarını da teşvik etti. Bu süreç 1941'de folik asit izolasyonu ile sonuçlandı. Bu iki vitamin üzerine yapılan araştırma, bugün hala aktif olan, önemli biyokimyasal yolları ortaya çıkardı ve sadece hematoloji ve gastroenteroloji alanında değil, aynı zamanda doğuştan kusurlar, kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve nöroloji alanlarında da muazzam klinik etkileri oldu. William Bosworth Castle tarafından 1940 yılında "The Conquest of Pernicious Anemia" adlı mükemmel bir inceleme yayınlandı. Daha yakın zamanlarda, Israel Chanarin ve Victor Hoffbrand ve David Weir sırasıyla pernisiyöz anemi ve folik asit araştırmalarını gözden geçirdiler.

George Whipple

George Hoyt Whipple (1878–1976) 28 Ağustos'ta New Hampshire Ashland'de doğdu. O, pratisyen hekimlerin oğlu ve torunuydu. Yale ve ardından Johns Hopkins'e katıldı, biyokimya alanında çalıştı ve 1905'te tıp alanında yeterlilik kazanan kıdemli öğrenci eğitimci olarak çalışmalarına devam etti. O sırada William Osler dahil birçok seçkin kişiyle tanıştı. Patoloji bölümünde çalıştı ve 1907-1914 yılları arasında karaciğer hasarı ve rejenerasyonu üzerine

araştırmalar yaptı. Daha sonra San Francisco'ya taşındı ve sonraki yedi yıl boyunca Hooper Tıbbi Araştırma Vakfı Direktörü ve Araştırma Tıbbi Profesörü oldu. 1921'de Dekan olarak Rochester, New York'a taşındı ve yeni bir Tıp ve Diş Hekimliği Okulu kurulmasına yardım etti. Karaciğer üzerine yaptığı araştırma, safra pigmentleri ve sarılıkla ilgilenmesini sağladı. Bu, çoğu CW Hooper ile birlikte, safra fistülü olan köpekler kullanılarak hemogloblin oluşumu üzerine olan araştırmalara öncülük etti. Laboratuvar, köpeklerle özel olarak ilgilenen Bayan Robscheit-Robbins tarafından yürütüldü. Whipple, sabit veri birikimine ve bunların nesnel analizine inanan, disiplinli, vicdanlı ve kararlı bir araştırma görevlisiydi. Tıbbi araştırmalarında ve hobisi sinek balıkçılığında çok zaman harcadı.



George Whipple



George Minot

George Minot

George Richards Minot (1885–1950) 2 Aralık'ta Boston'da doğdu. Ataları arasında birçok seçkin bilim insanı ve doktor vardı. Gençliğinde kelebekler ve güveler üzerinde çalıştı. 1908'de lisans derecesini aldı ve 1912'de tıp okumaya hak kazandı. Klinik eğitimini atalarından birinin kurulmasına yardım ettiği Massachusetts General Hospital'da aldı. Minot'un hematolojiye olan ilgisi, bugün hala kullanılmakta olan kan lekesi eozinini ve metilen mavisini (Wright'ın lekesi) geliştiren Yardımcı Doçent J. Homer Wright ile tanışıklığından kaynaklandı. PA ile ilgilenmeye başladığı Johns Hopkins Hastanesinde çalıştı, ancak esas olarak öğrencisi Jay McLean'ın heparini keşfettiği William Howell ile kan pıhtılaşması üzerine çalışıyordu. 1915'te PA'nın diyet tedavisi ile ilgili araştırması başladığında Boston'a döndü. 1922'de Collis P.Huntington Memorial Hastane-

sinde Başhekim oldu ve daha sonra Peter Bent Brigham Hastanesinin kadrosunda yer aldı. 1928'de Thorndike Laboratuvarları Başkanı olarak William Peabody'nin yerine geçti ve Harvard Üniversitesi'ne Tıp Profesörü olarak atandı. Minot, kan transfüzyonu, pıhtılaşma, trombositler, lösemi ve lenfomalara karşı büyük ilgi duydu. 1921'de diabetes mellitus geliştirdi ve insülinle ilk tedavi edilenlerden biriydi. Hastalığı ona sıkı diyet kontrolünün gerekliliğini vurguladı. Hastalarının diyetlerini tam olarak ortaya çıkarmak ve ayrıntıları kaydetmek konusunda titizdi.

William Murphy

William Parry Murphy (1892–1987) 6 Şubat'ta Wisconsin'de bir cemaat papazının oğlu olarak doğdu. 1914'te Oregon Üniversitesi'nden lisans derecesini aldı ve ardından Harvard Tıp Fakültesi'ne girip 1922'de mezun olmadan önce iki yıl

boyunca fizik ve matematik öğretmenliği yaptı. 1923'ten 1958'e emekli olana kadar Peter Bent Brigham Hastanesinde çalıştı. Minot tarafından PA'yı tedavi etmek için özel bir diyetin zorlu bir denemesinde ona katılmak için seçildi. Murphy diyabette klinik araştırmalar yapıyordu ve retikülosit sayımlarını yapmayı ve klinik ve hematolojik tepkileri doğru bir şekilde belgelemeyi öğrendi. Çiğ karaciğerdeki ilk başarının ardından, karaciğer fraksiyonlarını ağız yoluyla veya kas içi enjeksiyonlarla denemeye devam etti.

Tıbbi Sorun

Minot ve Murphy'nin çalışmalarına başladıkları sırada Addisonian pernisiyöz anemi dediğimiz hastalığın teşhisi, kan değişikliklerini karakterize etmeye ve bunları diğer anemi türlerinden ayırmaya dayanıyordu. PA'nın ilişkili klinik özellikleri arasında sarılık, glossit, nörolojik semptomlar ve mide atrofisi ve aklorhidri vardı. Guy's Hastanesi'nden Thomas Addison, pernisiyöz anemiyi ilk kez 1855 yılında "On the Constitutional and Local Effects of Disease of the Suprarenal Capsules" adlı monografisinde tanımladı. Addison, herhangi bir keşfedilebilir neden olmaksızın, yaşam sırasında veya ölümden sonra ortaya çıkan çok dikkat çekici bir genel anemi biçimini tanımladı. Sarılık, ağız veya dilde ağrı veya nörolojik belirtiler tarif etmedi, mikroskopik görünümünü de vermedi. Bunlar daha sonra 1872'de Anton Biermer tarafından tanımlandı ve 14'ü ölümcül olan 15 vakayı rapor etti. Bu vakalar çoğunlukla yoksul insanlar arasında, özellikle de 30'lu yaşlarındaki çok doğurgan kadınlarda meydana geldi. Bunların folat eksikliğine bağlı megaloblastik anemi vakaları olması muhtemeldir. 1874'te hemoglobin düzeyine göre alyuvar sayısının düşük olduğu PA7'de bildirildi ve 1877'de Hayem ilk kez makrositik kırmızı hücreleri belgeledi. Paul Ehrlich, yeni kan hücresi boyama yöntemlerini kullanarak PA hastalarının kanındaki "megloblastik" çekirdekli kırmızı hücreleri tanımladı. O andan itibaren araştırmacılar PA'yı diğer kronik refrakter anemilerden daha açık bir şekilde ayırbildiler. Ehrlich



William Murphy

ayrıca supra-vital boyama ile retikülositle-ri keşfetti. Daha sonra 1901'de Theobald Smith tarafından genç kırmızı hücreler olarak kabul edildi. Bu hücrelerin PA'daki anemi derecesine göre düşük olduğu görüldü. Aslında Minot, 1916 gibi erken bir tarihte, splenektomi geçiren PA hastalarında retikülositlerde bir artış olduğunu bildirdi. PA'nın mikroskobik tanımındaki bu ilerlemeler yapılırken, hastalığın klinik özellikleri de belirgin hale geliyordu. 19. yüzyılın son çeyreğinde PA ile ilişkili boğaz ağrısı ve glossit açıklamaları vardı. Nörolojik bağlantılar da ara sıra bildirildi ve 1883'te Leichtenstern, otopside iki vakada omurilikteki posterior sinir yollarının karakteristik demiyelinasyonunu tanımladı. Lichtheim (1887) ilk olarak omurilik lezyonlarının PA ile doğru ilişkisini kurdu. Nörolojik anormallikler 1900'de Russell, Batten ve Collier tarafından Londra'daki Queen Square Ulusal Hastanesinde tam olarak gösterildi, ancak bazı hastalarda anemi olmaması ne-

deniyle bunları spesifik olarak görmediler. Cabot 1908'de glossit için %40 ve omurilik hasarı için %10'luk bir insidans verdi ve ayaklarda ve ellerde daha sık duyu anormallikleri olduğunu gösterdi ve ayrıca daha anemik hastalarda sarılığı tarif etti. Makrositik anemi, glossit ve nöropati üçlüsü iyi anlaşıldı, ancak bunların her hastada mutlaka mevcut olmadığı ve birbirleriyle ciddiyle ilgili olmadığı açıktı. Mide aklorhidrisinin PA ile ilişkisi daha önce tarif edilmişti, ancak 1922'de aynı zamanda özellikle PA ile kordonun subakut dejenerasyonunun ilişkilendirilmesinde ısrar eden Hurst ve Bell tarafından tam olarak belgelendi. Diğerleri vitiligo ve saçın erken beyazlaşması ile ilişkisini bildirdi. Bununla birlikte, bu ölümcül hastalığın tedavisini bulmada çok önemli olan, anemi ve tepkisinin izlenmesiydi.

Olası Mekanizmalar

Minot ve Murphy'nin PA için beslenme temeli olduğunu kanıtlamalarından önce, hastalığın doğası hakkında önemli tartışmalar olmuştur. Bunun nedeni kısmen, 19. yüzyılın son çeyreğinde PA ile diğer ilerleyici anemi türleri arasında net bir ayrım olmamasıydı. Kemik iliğinin (post-mortem) yoğun hüreselliği ve hücrelerin ilkel doğası ve düşük retikülosit sayısı, bazılarının bunun bir lösemi formu ya da birincil bir kan oluşumu bozukluğu veya iliğe zarar veren bir miktar toksin nedeniyle olduğunu düşündürdü. Ehrlich, böyle bir toksinin periferik kan tahribatına da neden olabileceğini düşünüyordu. Sarılık, bir toksin nedeniyle kırmızı hücre bozulmasına atfedildi. Bazı PA vakalarının tenyaların atılmasıyla düzeltilmesinin, böyle bir toksin kaynağının uzaklaştırılmasına bağlı olduğu düşünülüyordu. Düşük retikülosit sayısı, genellikle düşük beyaz hücre ve trombosit sayılarıyla birleştiğinde, kemik iliği yetmezliği ile uyumluydu ve bazıları karaciğer tedavisine verilen yanıtın bir toksinin atılmasını gösterdiğini düşünmesine rağmen, Minot ve Murphy, eksik bir diyet faktörünü değiştirerek işe yaradığı sonucuna varmışlardır. 1927'de, karaciğerle beslenmesinden önce ve sonra kemik iliği aspiratlarını inceleyen Peabody, karaciğerde "olgun kırmızı hücrelerin gelişimini ve farklılaşmasını destekleyen" bir faktör olduğunu yazdı. 1956'da (95 yaşında 2010 yılında ölen) Clement Finch, radyoaktif demir çalışmalarını kullanarak, yoğun tedavi görmemiş PA'da kırmızı hücre öncüllerinin çoğunun iliğinde ölümle birlikte etkisiz eritropoezi net bir şekilde gösterdi ve neden böyle bir hiperselüler olduğunu tam olarak açıkladı. 1922 gibi erken bir tarihte Whipple, dolaşımdaki az sayıdaki kırmızı hücreyle ilişkili olarak PA'daki büyük miktarlarda hemogloblin parçalanma ürünlerini tanımlamıştı.

Beslenme yetersizliği kavramı

20. yüzyılın başlarında, beri-beri, pellagra ve iskorbüt eksikliği hastalıkları açıkça tasvir edilmiştir. Whipple'in köpekler üzerinde yaptığı deneyler, besin takviyelerinin ve özellikle de karaciğerin kan rejenerasyonu üzerindeki yararlı etkilerini göstermiştir. Bununla birlikte, karaciğere verilen bu yanıtın, yüksek B12 vitamini ve folat içeriğinden ziyade muhtemelen demirinin hazır bulunmasından kaynaklandığı artık açıktır. Çeşitli diyet takviyeleri ile tedavi edilen az sayıdaki PA hastasında hastalıkta ara sıra iyileşme raporları alınmıştır. Bununla birlikte, hastalığın diyet tedavisine odaklanan George Minot'du. O sırada anemi için iki standart tedavi olan demir ve arseniğe yanıt eksikliği yaşamıştı. Daha 1912'de Johns Hopkins'teyken PA hastalarının diyetleriyle ilgilenmeye başlamıştı ve Boston'a döndüğünde hastalarının ayrıntılı diyet öykülerini alarak diyetlerine karaciğer ve et eklemelerini tavsiye etti. Daha sonra William Murphy ile "tam protein açısından zengin ve yağ oranı düşük" bir diyet denemesine başladı. 45 hastaya günlük 120-240 gr karaciğer ve 120 gr kas eti, yapraklı sebzeler, meyve, yumurta ve süt verildi. Hastaların tüm bunları anlamaları zordu, araştırmacılardan ve asistanlarından çok fazla teşvik gerekiyordu. Bu, hastalar daha iyi hissetmeye başladığında ve bir hafta kadar içinde retikülosit sayısında artış gösterdiğinde güçlendi. Minot, diyabet için katı bir diyet uyguluyordu ve hastalarınınkilerle kompulsif bir ilgi gösterdi. Yine de 45 hasta üzerinde yapılan çalışmaları tamamlamak 2 yıl sürdü. 4 Mayıs 1926'da Minot ve Murphy, Amerikan Hekimler Birliği'ne neredeyse ardışık 45 hastadan oluşan bir seride aneminin düzeltildiğini bildirdi. Tüm ayrıntılar on yıl sonra yayınlandı.

Karaciğer tedavisi neden işe yaradı?

Whipple'in çalışmasından hatalı bir çıkarıma dayanmasına rağmen (artık, kan damarına bağlanan köpeklerin karaciğere

tepkisinin, yüksek B12 vitamini ve folat içeriğinden ziyade demirinin hazır bulunmasından kaynaklandığı açıktır), sığır karaciğeri, sağladığı yüksek miktarda B12 vitamini nedeniyle PA'da etkiliydi. Bu, gram başına yaklaşık bir mikrogramdır, bu nedenle 240 g karaciğer, günde yaklaşık 240 ug sağlar. Normal günlük gereksinimin şu anda yaklaşık 1 µg olduğu bilinmektedir. Bu çok düşük dozla PA'da hematolojik bir yanıt elde edilebilir. Normal bir diyet kabaca 15 µg içerir ve bunun 1 µg'ı aktif iç

mekanizma tarafından absorbe edilebilir ve hastalarında hematolojik bir yanıt ortaya çıkaran, karaciğerde bulunan büyük miktarlardan pasif olarak emilen bu B12 vitamini olmuştur. Sığır karaciğeri ayrıca yaklaşık 300 µg/100 g folat içerir. Artık büyük dozlardaki folatın, tedavi edilmemiş B12 vitamini eksikliğinde hematolojik bir tepkiye yol açabileceği bilinmektedir. 240 g karaciğerden absorbe edilen folat miktarı, bununla birlikte, tedavi edilmemiş PA'da retikülosit yanıtını ortaya çıkarmak



faktör mekanizması tarafından emilir. Bu miktar, PA'da olduğu gibi intrinsik faktör yokluğunda yeterli B12 vitamini sağlamaz. Bununla birlikte, hastalarını besleyen çok daha büyük miktardaki B12 vitamini Minot ve Murphy, iç faktörün yokluğunda, bukkal, mide ve üst ince bağırsak mukozasından pasif difüzyon yoluyla yeterli B12 vitamininin emilmesine izin verir. Oral B12 vitamini dozunun % 0.1 ila % 1.0'ı bu

için gerekenden daha az olacaktır. Bununla birlikte, folat, karaciğerde bulunan vitamin B12'ye yanıtı artırmış olabilir.

Takip eden Araştırma

Minot ve Murphy'nin Nobel Ödüllü çalışması, daha sonra tartışılacak olan bir dizi önemli ilave araştırmaya yol açtı.

Bunlar:

1. 1948'de iki grup tarafından kobalamin olarak da adlandırılan B12 vitamininin izole edilmesiyle sonuçlanan, işlenmemiş PA'da gittikçe saflaşan, etkili karaciğer fraksiyonları denemeleri.
2. Mide tarafından yapılan intrinsik faktör ile birleştikten sonra B12 vitamini emiliminin ileum (ince bağırsağın alt yarısı) yoluyla meydana geldiği fizyolojik mekanizmanın gösterilmesi.
3. Lucy Wills'in diğer makrositik anemi formlarının ayrı bir beslenme faktörü ile tedavisinin gösterilmesi. Bunun, 1941'de B12 vitamininden önce izole edilen folik asit olduğu ortaya çıktı.
4. B12 vitamini eksikliğinden kaynaklanan megaloblastik anemilerin ve folat eksikliğinden kaynaklanan anemilerin açıklanması ve bunları ayırt etmek için testlerin geliştirilmesi. PA'nın kendisinin midenin edinilmiş bir otoimmün hastalığı olduğunun gösterilmesi.
5. İki vitaminin biyokimyasal işlevleri, birbirleriyle ilişkileri ve eksikliklerinin megaloblastik anemiye ve bununla ilişkili klinik belirtilere nasıl yol açtığına dair araştırma.
6. Lösemi ve diğer kötü huylu hastalıkların tedavisi için anti-folat ilaçların geliştirilmesi.
7. B12 vitamini eksikliğinin nörolojik hastalığa nasıl neden olduğu ve B12 vitamini veya folat tedavisinin özellikle yaşlılarda diğer nörolojik hastalıkları önleyip önleyemeyeceği üzerine çalışmalar.
8. B12 vitamini ve folat eksikliklerinin veya metabolizmalarındaki anormalliklerin çok çeşitli kardiyovasküler hastalıklar ve ayrıca kanserle ilgili olabileceğinin kabul edilmesi.





Vitamin B12 İzolasyonu

George Minot, Harvard'da Fiziksel Kimya Profesörü olan Edwin J. Cohn'a, aktif bileşiği saflaştırmanın ve yapmanın hızlı bir yöntemi olarak retikülosit tepkisini gözlemleyerek, hastalar üzerinde ağız yoluyla veya parenteral olarak test edilebilecek karaciğer fraksiyonları hazırladığını önerdi. O ve Murphy, aktif maddenin protein fraksiyonunda bulunacağını düşündüler. Şaşırtıcı bir şekilde, hacimli karaciğer proteinlerinin inaktif olduğu ortaya çıktı. Öte yandan, suda çözünür bir karaciğer fraksiyonu olan G, son derece aktifti. Bu fraksiyon, Eli Lilly and Co. ile işbirliğinden sonra ticari olarak

elde edilebilir hale geldi ve yaygın olarak kullanıldı. Herkesi şaşırtacak şekilde, Ganssler Almanya'dan 5 g kadar küçük bir karaciğerden aktif, protein içermeyen bir preparatın yapılabileceğini bildirdi. Aktif bileşiğin daha sonra ABD'deki Merck Laboratuvarlarında ve İngiltere'deki Glaxo Laboratuvarlarındaki çalışanlar tarafından karaciğerden saflaştırılması, *Lactobacillus* organizmaları kullanılarak mikrobiyolojik testlerle hızlandırıldı. Bunlardan biri olan *lactobacillus leichmannii*, daha sonra 1970'lere kadar insan dokularında ve serumda B12 vitamini ölçmek için klinik olarak kullanılacaktı. Aktif faktör saflaştıkça kırmızı renkte olduğu anlaşıldı. 1948 yılında her iki ticari ekip tarafından

siyanocobalamin olarak izole edilmiş ve B12 vitamini olarak adlandırılmıştır ve PA'daki anemiyi düzeltmek için enjeksiyonla günde sadece birkaç mikrograma ihtiyaç duyulduğu hızla gösterilmiştir. Vitaminin iki ana fizyolojik formunun daha sonra metil-kobalamin ve deoksiadenosilkobalamin (başlangıçta koenzim B12 olarak adlandırılır) olduğu bulundu. 1956'da Dorothy Hodgkin ve meslektaşları siyano- ve deoksiadenosilkobalaminin yapısını üç boyutlu kristalografiye dayalı olarak tanımladılar. Hodgkin, bu çalışması ve insülinin yapısı üzerine yaptığı çalışmalar sebebiyle 1964'te Nobel Kimya Ödülü'nü aldı.



İç ve Dış faktörler

PA mekanizmasına ilişkin ilk büyük araştırmalar, Minot'un çalıştığı ve 1928'de yönetici olduğu Boston'daki aynı Thorndike Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. William Bosworth Castle, 1922'den beri ilk Direktör olan Francis Peabody'nin yardımcısıydı. Minot ve Murphy'nin raporlarından sonra, şu soruyu sordu: Neden PA hastaları her gün büyük miktarlarda karaciğer yemek zorundayken, popülasyonun geri kalanı anemi geliştirmeden normal miktarlarda et veya karaciğer yiyebiliyorlar? PA'da iyi bilinen gastrik atrofi ve aklorhidri gözlemi ışığında, PA hastalarında eksik olan mide

faktörünün doğası üzerine bir dizi deneye başladı. Her gün 300 gr hamburger bifteği yedi ve bu yemekten bir saat sonra kendi mide içeriğini aspire etti ve bifteğin sıvılaşına kadar birkaç saat boyunca "test tüpünde" sindirilmesine izin verdi. Daha sonra bu sindirimi, on günlük bir süre boyunca her gün PA hastalarına esnek bir mide tüpü aracılığıyla besledi. Yanlışlıkla, diğer laboratuvarlardan gelen raporlara dayanarak, PA tedavisi için bifteğin karaciğere eşdeğer olduğunu düşündü. Hastalar, altı günde bir retikülosit tepkisi gösterdi ve on günde maksimuma çıktı, ardından kırmızı hücre sayısında artış ve refahta iyileşme görüldü. Önceki on gün boyunca tek başına biftek (tek

hayvansal protein kaynağı olarak günlük 200 g beslenir), hastalarda böyle bir yanıt vermedi. Azaltılmış miktar (300 g yerine 200 g) seçildi çünkü aspirasyondan önce normal denekte 100 g sığır eti kaybedildi.

Castle, bifteği 'dışsal faktör' (artık B12 vitamini olarak biliniyor) ve mide suyundaki faktörü 'içsel faktör' olarak adlandırdı. Castle, 1948'de Minot emekli olduğunda Thorndike Laboratuvarlarının üçüncü yöneticisi oldu. Hem fiziksel hem de entelektüel yapıya sahip etkileyici bir adamdı. 1967'de Maurice Friedkin'in Boston'daki laboratuvarında folat üzerine araştırma yaparken onunla kısa bir süre tanışmanın mutluluğunu yaşadı. Castle ve diğerleri tarafından yapılan sonraki



deneyler, radyoaktif B12 vitamininin de yardımıyla 1966'da Ralph Gräsbeck tarafından iç faktörün izole edilmesine yol açtı. Bir glikoprotein olduğu gösterildi. Kırk litre mide suyu, 240 µg B12 vitamini bağlayabilen 8 mg intrinsik faktör verdi. Booth ve Mollin daha sonra, intrinsik faktörün rolünün, insanlarda distal ileum yoluyla vitamin B12 emilimini teşvik etmek olduğunu gösterdi.

Folik asidin keşfi

Cambridge Üniversitesi'nden birinci sınıf onur derecesine sahip bir mezun olan Lucy Wills, 1928'de Londra'daki Royal Free Hospital'ın Kimyasal Patoloji Bölümü'nde çalışıyordu. Protein, meyve ve sebzelerden yoksun bir diyetle yaşayanlarda aneminin daha yaygın olduğunu gözlemledi. Benzer şekilde zayıf bir diyetle beslenen farelerde üretebileceği benzer bir anemiye dayanarak, bunu diyetle maya veya maya özütü ekleyerek düzeltmeyi amaçladı ve anemik hamile kadınlara maya vermeyi denedi. Onlara her gün 30 gr maya veya maya özütü, Marmite verdi ve mükemmel hematolojik tepkiler gözlemledi. Minot ve Murphy gibi, iyileşmenin erken tespiti için retikülosit sayımlarını kullandı. Ayrıca ham karaciğer ekstraktına da yanıtlar gösterdi, ancak daha sonra PA'da etkili olan saflaştırılmış karaciğer preparatlarını denediğinde, bunlar anemik hamile kadınlarında etkisizdi. 1941'de folik asit izolasyonundan önce birkaç araştırma hattı birleşti. Vitamin birçok isim aldı: Vitamin M (maymunlar için), Vitamin Bc (tavuklar için), Norit elüat faktörü ve Faktör S. Yine, *Lactobacillus casei* ve *Streptococcus lactis* R (*Streptococcus faecalis*) kullanılarak folat için mikrobiyolojik deneyler saflaştırma işleminde değerliydi. Yeşil yapraklı bitkilerin zengin bir kaynak olduğu (büyük miktarlarda ıspanaktan izole edildiği) ve ayrıca karaciğerden de izole edildiği için "folik" adı tanıtıldı. "Folik asit" terimi şimdi terapötik olarak verilen ana bileşik için ve "folat", vitamini oluşturan tüm bileşikler grubunu tanımlamak için kullanılmaktadır. Bu bileşikler genellikle di- veya tetra-hidro formlara indirgenir, tek karbon

birimi ilavelerine sahiptir; metil, metilen veya formil ve hücrelerin içinde, aktif koenzimleri oluşturmak ve hücre tutulmasını sağlamak için poliglütamatlanır. Lucy Wils, Londra'ya döndüğünde, çeşitli makrositik anemileri olan hastaları Marmite ile besledi. 1973'te Royal Free Hospital'da Hematoloji Kürsüsü'ne atandığında ofisinde bulunan el yazısıyla yazılmış defterleri artık hastanenin arşivlerinde tutuluyor. O ve diğerleri, hangi makrositik anemilerin Marmite'e tepki verdiğini hızlı bir şekilde gösterdi. Yazarın görüşüne göre, Lucy Wils folatı keşfettiği için Nobel Ödülü alması olmalıydı. Oldukça aktif ve neşeli bir hanımefendi, meslektaşlarının çoğu Rolls Royce arabalarına geldiği ortama bisikletle gelen bir sosyalistti. 1964'te vefat etti. Hayat hikayesi Daphne Roe tarafından ayrıntılı olarak kaydedildi. 1941'den sonra, B12 vitamini izole edilmeden önce, her türlü makrositik veya megaloblastik anemili hastaları tedavi etmek için saf sentetik folik asit kullanıldı. Her tipte yanıt bulundu, ancak PA'da yanıtın genellikle yetersiz ve zayıf bir şekilde sürdürüldüğü ve nörolojik kusurun düzeltilmediği veya daha kötü hale gelebileceği veya hatta ilk kez ortaya çıkabileceği ortaya çıktı. Folik asit, yüksek dozlarda B12 vitamini eksikliğinin neden olduğu DNA sentezini etkileyen folat metabolizmasındaki bloğu baypas edebilir (en azından geçici olarak). Muhtemelen bir miktar folik asit, folat koenzim 5,10 metilnetetrahidrofolata dönüştürüldü. Bununla birlikte, nörolojik hasara neden olan kusur dahil, B12 vitamini eksikliğinin neden olduğu tüm biyokimyasal anormallikleri düzeltilmedi.

İki vitamin

İki vitaminin izolasyonundan ve doğal türevlerinin belirlenmesinden sonra, dahil oldukları biyokimyasal yollar - özellikle 1-karbon metabolizmasındaki rolleri ve etkileşimleri - keşfedildi. PA, ileal rezeksiyon, bağırsak kör halkaları ve balık tenyası gibi hangi hastalıkların B12 vitamini (kobalamin) eksikliği ile ilişkili olduğu ve çölyak hastalığı, tropikal sprue, gebelik ve hemolitik anemilerin folat eksikliği ile iliş-

kili olduğu ortaya çıktı. Eksikliklere neden olan diyet türleri de netleşti. Hayvansal ürünlerden kaçınma (veganlık) B12 vitamini eksikliğine, kalitesiz beslenme ('çay ve tost') ise folat eksikliğine neden oldu. Ayrıca doğadaki tüm B12 vitamininin mikro organizmalardan geldiği de kabul edildi; hayvanlar bu vitamini işkembeden emerek veya insanlarda olduğu gibi hayvan ürünlerini yiyerek elde ettiler. 1960'larda PA'nın, serumda intrinsik faktör ve paryetal hücre antikörleri ve karakteristik gastrik atrofi ve aklorhidriye eşlik eden gastrik intrinsik faktör eksikliği ile midenin bir otoimmün hastalığı olduğu bulundu. İki vitaminin izolasyonunda mikrobiyolojik tahliller kullanılmış ve vücut sıvıları ve dokularındaki konsantrasyonlarını ölçmek için ek mikrobiyolojik tahliller uyarlanmıştı. Bu serum ve folat testleri, otomasyon için daha uygun olan immünolojik testlerle değiştirilene kadar, klinik uygulamada iki vitaminin eksikliklerini test etmek için yıllarca kullanıldı. Tüm bu yönler, Chanarin'in monografisinde ayrıntılı olarak incelenmiştir.

B12 vitamini / folat etkileşimleri

Eksikliklerin nasıl anemiye neden olduğunu ve kan ve kemik iliğinin görünümünün neden eksiklik olursa olsun aynı olduğunu açıklamak için çok sayıda araştırma yapılmıştır. En makul açıklama, folat eksikliğinin, deoksiüridin monofosfattan timidin monofosfat sentezinde folat koenzim 5,10-metilenetetrahidrofolat poliglütamata ihtiyaç duyulması nedeniyle DNA sentezini bozarak anemiye neden olmasıdır. Bu, DNA sentezinde hız sınırlayıcı bir adımdır. Eksiklik, DNA replikasyon çatalında bulunan dört acil DNA öncülünden biri olan timidin trifosfat miktarını azaltarak DNA sentezini bozar. B12 vitamini eksikliği dolaylı olarak bu folat koenzimin seviyesini düşürür ve dolayısıyla DNA sentezini bozar. Metiltetrahidrofolatın (metilTHF) tetrahidrofolata (THF) dönüştürülmesinde metilkobalamin olarak B12 vitamini gereklidir ve buradan tüm folat poliglütamat koenzimleri hücreler içinde sentezlenir. Me-

til THF, kemik iliğindeki de dahil olmak üzere tüm hücrelerin plazmadan folat aldığı formdur. Bunun nedeni, ince bağırsağın diyetteki tüm folatları metil THF'ye dönüştürmesidir, bu nedenle portal ve sistemik plazmadaki vitaminin baskın formu budur. Metil THF hücrelere girer ancak kendisi, folat poliglütamatların sentezlenebileceği bir substrat değildir. B12 vitamini eksikliğinde, metil THF, THF'ye dönüşümündeki hücre içi blok nedeniyle plazmada birikirken, tüm folatların hücre içi seviyeleri azalır. B12 vitamini veya folat eksikliğindeki DNA sentezindeki kusurun doğası da tespit edilmiştir. Başlangıçta timin bazından yoksun DNA'nın kromozom kırılmalarını ve hücre ölümünü açıklayabileceği öne sürülmüştür, ancak megaloblastik DNA'nın baz bileşimi normaldir. Hoffbrand ve meslektaşları bunun yerine, dTTP'nin açığı nedeniyle bölünen hücrenin, mitoz sırasında açılan çoklu replikon kökenlerinden DNA'yı uzatamadığını öne sürdüler. DNA sentezinin DNA zincirinin uzaması üzerinden aşırı başlatıldığına dair kanıt, muamele edilmemiş megaloblastik hücrelerde ve aynı zamanda DNA sentezini de inhibe eden antimetabolitler hidroksiüre veya metotreksat ile muamele edilmiş hücrelerde azalmış çoğaltma çatal hareketi ve bozulmuş yığın DNA oluşumunu gösteren deneylerden geldi. Kromozom boyunca birçok noktada DNA sentezinin tamamlanmamasının, kromozomların yoğunlaşmasının, kırılabilirliğinin ve DNAazlara duyarlılığının başarısız olmasına yol açtığı öne sürüldü. Ayrıca urasilin yanlış dahil edilmesinin, B12 vitamini ve folat eksikliklerinde anormal DNA sentezi anormallliğine neden olabileceği öne sürülmüştür, ancak bu, genetik kusurlara veya DNA sentezindeki noktalarda hareket eden ilaçlara bağlı timidilat sentezinde megaloblastik anemileri açıklayamaz.

Nörolojik hasar

B12 vitamini eksikliğinden kaynaklanan ancak folat eksikliği de söz konusu olan periferik sinir ve omurilik hasarının açıklaması daha zordur. Miyelinin metilasyon başarısızlığı önerilmiş ancak tam olarak

doğrulanmamıştır. Metilmalonik asit birikiminin de miyeline zarar verdiği öne sürüldü, ancak hastalardaki düzeylerin sinir hasarının olup olmadığı ile ilişkili olmadığı bulundu. Ayrıca nitroz oksit, metilmalonik yolu etkilemeden B12 vitaminini etkisiz hale getirerek sinir hasarı oluşturabilir. Yaşlılarda takviye edici B12 vitamini ve folatın bilişsel işlevi iyileştirip iyileştiremeyeceği, Alzheimer hastalığının veya yaşlılık bunamasının başlangıcını ve ilerlemesini geciktirip geciktiremeyeceği konusunda çalışmalar halen devam etmektedir.

Vitamin ve folat eksikliklerinin sistemik etkileri

B12 vitamini ve folatın keşfedilmesinden sonra, klinik yönleriyle ilgili baskın araştırma hematologlar tarafından gerçekleştirildi. Bununla birlikte, son yirmi ya da otuz yılda, araştırmaların çoğu kardiyovasküler, obstetrik ve habis hastalıklarla ilgiliydi. Metiyonin sentaz reaksiyonu, metil THF'nin THF'ye dönüştürüldüğü ve metilkobalamin gerektiren reaksiyon, homosisteinin metiyonine metilasyonu ile sonuçlanır. Folat veya vitamin B12 eksikliği olan hastaların plazmasında homosistein seviyelerinin yükseldiği bulunmuştur. Metiyonin sentaz da dahil olmak üzere metabolizmasını etkileyen çeşitli kalıtsal enzim eksikliklerinde plazmada çok yüksek homosistein seviyeleri meydana gelir. Bu çok yüksek seviyeler, erken yaşta ortaya çıkan şiddetli arter hastalığı ile ilişkilidir. Büyük popülasyon çalışmaları temelinde, B12 vitamini veya folat eksikliğinde plazmada meydana geldiği gibi, daha mütevazı bir şekilde yükselen seviyeler, yaşlı kişilerdeki arter hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, mevcut araştırmaların çoğu, uzun vadeli, çok merkezli denemelerde profilaktik olarak verilen vitamin kombinasyonları (folik asit, vitamin B12 ve piridoksin) ile felç ve koroner kalp hastalığı insidansının olası azaltılmasına odaklanmıştır. Şimdiye kadar elde edilen kanıtlar, inme insidansında mütevazı bir azalma olduğunu kanıtlamıştır, ancak koroner kalp hastalığı veya enfarktüs insidansı üzerinde çok az

etki olduğunu göstermektedir. B12 vitamini veya folat eksikliğinin kansere, özellikle kolon veya meme kanserine yatkın olup olmadığı ve diyetin folik asit ile takviye edilmesinin güvenli olup olmadığı (Kuzey Amerika ve diğer birçok ülkede halihazırda yapıldığı gibi) hakkında çok sayıda yayın yapılmıştır. Bu konunun ayrıntılı tartışması bu bölümün kapsamı dışındadır, ancak kardiyovasküler hastalıkların önlenip önlenemeyeceğini belirlemeyi amaçlayan çok sayıda büyük ölçekli, uzun vadeli folik asit (ve bazı B12 vitamini) takviyeleri denemelerinin meta-analizi gösterilmiştir. Plasebo alan kontrollere kıyasla vitamin alan kişilerde herhangi bir tümör türünün artmış insidansına dair hiçbir kanıt yoktur. B12 vitamini ve folik asidin keşfedilmesinin diğer iki önemli sonucu, Farber'in çocukluk çağı lösemisini anti-folat ilaç aminopterin ile tedavisi ile başlatılan antimetabolit ilaçların geliştirilmesi ve profilaktik folik asit ile nöral tüp kusurlarının önlenmesidir.

PA hastalarının yaşam beklentisi, Minot ve Murphy'nin





**keşfi
sayesinde
kayda değer
bir iyileşme
göstermiştir.**

B12 Vitamininin Keşfedilmesinin Tıbbi Uygulamaya Etkisi

Minot ve Murphy'nin araştırmasından önce, neredeyse tüm PA hastaları kaybedildi. Şimdi, esasen % 100 hayatta kalma oranıyla, tedavisi en kolay ve en ödüllendirici hastalıklardan biridir. 1948'de B12 vitamininin siyanokobalamin olarak izole edilmesinden sonra, bu, tedavide kullanılan vitaminin formu haline geldi ve halen ABD'de aylık olarak verilmektedir. Diğer ülkelerin çoğunda, siyanokobalamin gibi idrarda baskın olarak atılmak yerine vücutta çok daha iyi tutulan hidroskobalamin tedavisi için değiştirilmiştir. Standart uygulama, hastayı başlangıçta her biri 1 mg hidroskobalamin içeren altı kas içi enjeksiyonla vücut depolarını korumaktır. Enjeksiyon ucuz, ağrısız ve güzel pembe renkte olduğundan, B12 vitamini her türlü tıbbi rahatsızlığı olan hastalara 'tonik' olarak verilir. B12 vitamini eksikliğine bağ-

lı nöropati iyileşir, ancak semptomları üç aydan uzun süredir mevcut olan omurilik hasarı vakalarında iyileşme genellikle eksiktir. Daha büyük veya daha sık dozların standart dozlardan daha fazla nörolojik iyileşmeye yol açtığına dair hiçbir kanıt yoktur. B12 vitamini ayrıca siyanokobalamin olarak ağızdan da verilebilir. Minot ve Murphy'nin karaciğer besleme deneylerinde olduğu gibi, çoğu PA hastasında günlük 1000 µg dozlar vücut depolarını korumak için yeterlidir ve her gün birkaç mikrogram pasif difüzyonla emilir. Hastalar bu şekilde tedavi edilmeyi seçseler bile, ilk yükleme parenteral hidroskobalamin ile yapılmalıdır ve oral yoldan yeterli B12 vitamini aldıklarından ve günlük doz rejimine uyduklarından emin olmak için izlenmelidirler. Daha düşük derecelerde B12 vitamini eksikliği için örn. yaşlılarda malabsorpsiyon veya veganlarda olduğu gibi diyetle B12 vitamini eksikliği, tek bir yerleşik tedavi rejimi yoktur. Yılda bir veya iki kez enjeksiyonlar veya 1 mg'dan daha düşük dozlarda günlük oral siyanokobalamin, hematolojik ve vitamin B12 durumunun izlenmesiyle kullanılabilir. PA için olduğu gibi tedavi de kullanılabilir ve bu, total gastrektomi veya ileal rezeksiyon veya baypas geçirmiş kişilere ömür boyu verilir. Ne yazık ki, radyoaktif B12 vitamini, B12 vitamini emilim bozukluğunun teşhisi ve mideyi bağırsak nedenlerinden ayırmak için artık mevcut değildir. Parietal ve intrinsik faktör antikorları ve gastrin seviyeleri için serum testleri PA tanısında yardımcı olur. Üst gastrointestinal endoskopi, mide atrofisini doğrulamak ve mide poliplerini veya kanseri dışlamak için kullanılır. PA hastalarının yaşam beklentisi, Minot ve Murphy'nin keşfi sayesinde kayda değer bir iyileşme göstermiştir. Şu anda kadınlar için ve muhtemelen genel mide kanseri insidansındaki düşüşle birlikte erkekler için de esasen normaldir.