

دور Holo-TC II كواسم حيوي لتقييم مستوى فيتامين B12 عند مرضى الداء السكري من النمط الثاني

طالبة الدراسات العليا: مروى راغب عنتر - قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة - كلية الصيدلة - جامعة البعث

إشراف الأستاذ المساعد الدكتور: وليد خدام - كلية الصيدلة / جامعة البعث

الملخص

يسبب عوز فيتامين B12 العديد من التظاهرات العصبية والدموية والاستقلابية والنفسية، والتي تُعزى إلى تراجع وظائفه كنميمة لإنزيمي ميثيونين سينتاز وميثيل مالونيل كوانزيم A ميوتاز، وهو ما قد يزيد من الاختلالات التي تُرافق مرض السكري من النمط الثاني، وتُعدُّ مقايضةً Holo-TC II الأكثر مصداقيةً للتعبير عن حالة ومستوى فيتامين B12 في جسم الإنسان لقلّة تداخلاتها.

قامت هذه الدراسة بتقييم حالة فيتامين B12 وتقصى العوز به عند 52 مريضاً بالداء السكري من النمط الثاني ومقارنتها مع 18 من الأصحاء، وذلك من خلال مقايضة مستويات Holo-TC II في عيّنات بلازما مهبرنة بطريقة ELISA، كما دُرست علاقة ارتباط مستوياته بالمستويات البلازمية لكل من الكوليسترول وثلاثيات الغليسيريد وجرعة الميتفورمين المستخدمة عند أولئك المرضى.

وجدت هذه الدراسة أنّ نسبة انتشار عوز فيتامين B12 عند مرضى السكري من النمط الثاني كانت 15.4%، وكان هناك علاقة عكسية وارتباط بين مستويات Holo-TC II (186.605±137.210 pmol/L) ومع مستويات الكوليسترول وثلاثيات الغليسيريد وجرعة الميتفورمين (P<0.001).

الكلمات المفتاحية: Holo-TC II - الداء السكري - النمط الثاني - فيتامين B12 - ميتفورمين -

كوليسترول - ثلاثيات الغليسيريد

Role of Holo-TC II as a Biomarker for Assessing Vitamin B12 Levels in Patients with Type II Diabetes Mellites

Abstract:

Vitamin B12 deficiency causes several neurological, hematological, metabolic and psychological manifestations, which are attributed to its decline in its functions as a coenzyme and cofactor to the enzymes (methionine synthase and methylmalonyl co-A mutase), which may exacerbate the complications that accompany type II Diabetes Mellitus. The Holo-TC II assay is the most reliable assay for the assessment the status and level of vitamin B12 in the human body due to its minimal interference.

This study assessed the status of vitamin B12 and investigated B12 deficiency in 52 patients with type II Diabetes Mellitus and compared them with 18 healthy subjects, by measuring the levels of Holo-TC II in heparinized plasma samples by the using of ELISA kit, and linking it to plasma level of cholesterol and triglycerides and the dose of metformin used in those patients.

This study found that the prevalence of vitamin B12 deficiency in type II Diabetes Mellitus patients was 15.4%, and there was an inverse proposition and a correlation between Holo-TC II levels (186.605 ± 137.210 pmol /L) with cholesterol and triglycerides levels and the dose of metformin ($P < 0.001$).

key words: Holo-TC II- - Diabetes Milletus- Type II- Vitamin B12- Metformin- Cholesterol- Triglycerides

1. المقدمة Introduction

قام الطبيب الأمريكيان مينو (George Richards Minot) ومورفي (William P. Murphy) في عشرينيات القرن العشرين بالتعرّف على مادّة مُستخرجة من الكبد تستطيع إزالة أعراض فقر الدم الخبيث، وسُميت فيتامين B12 [1]، وعمل بعدها هودجكن وزملاؤه في خمسينيات القرن الماضي على تحديد بنية الفيتامين الكيمائية ونالوا جائزة نوبل على هذا الإنجاز [2]. يُسبب عوزُ فيتامين B12 العديد من التظاهرات العصبية والدموية والاستقلابية والنفسية [3، 4، 5]، والتي تُعزى إلى تراجع وظائفه كتميم لإنزيمي ميثيونين سينيثاز وميثيل مالونيل كوانزيم A ميوتاز [6، 7]، ويُمكنُ تقديرُ حالة ومستوى فيتامين B12 في الجسم باستخدام العديد من الواسمات مثلُ مقايسة الفيتامين B12 الكلّي [8] والهوموسيستئين Hcy [9] وحمض ميثيل مالوني MMA [10] وترانزكوبولامين Holo-TC II [11].

يُشكّل الجزء من فيتامين B12 والمرتبط transcobalamin II أو ما يُعرّف بـ Holo-TC II الجزء الفعّال من الفيتامين، وهو ما يُسهّل عملية قبضه الخلوي، ويُشكّل ما نسبته 30% [11] أو (6-20%) حسب دراسات أُخرى [12، 13، 14] من الكوبالامين الكلّي الجائل في الدوران. يُعدُّ Holo-TC II معلماً ثابتاً، ولا يحتاجُ لاحتياطاتٍ خاصّة أثناء جمع العينات لمقايسته، ويُمكنُ أن يبقى ثابتاً لأشهر أو لأكثر من سنة (16 شهر) بدرجات حرارة (-20°C وحتى -70°C) [15]. يُمكنُ استعمالُ عينات المصل أو البلازما (المهبرنة أو المجموعة على EDTA) لمقايسة Holo-TC II [16]، وقد ذكرت الدراسات أنواعاً متعدّدة لمقايسة هذا المعلم لكن أبرزها كان RIA [17] و ELISA [18]، وقد باتت مقايسة هذا المعلم منتشرةً ومقبولةً في الكثير من الأبحاث حول العالم [19] مثل المملكة المتّحدة [20] والدول الاسكندنافية [16] وسويسرا والنمسا وأستراليا وغيرها [21]. لذلك يُمكنُ القولُ أنّ مقايسة Holo-TC II تعدُّ الأكثرُ مصداقيةً للتعبير عن حالة فيتامين B12 في جسم الإنسان لقلّة تداخلاتها [22، 23، 24، 25، 26، 27].

يُشيرُ الداءُ السكرى Diabetes Mellites (DM) إلى مجموعةٍ من الاضطراباتِ الاستقلابية التي تشتركُ جميعها بنمطٍ ظاهريٍّ هو فرطُ سكرِ الدَّم hyperglycemia [28]، ويُصنَّفُ إلى أربعِ فئاتٍ رئيسيةٍ عامّةٍ [29]؛ النمطُ الأوَّلُ والنمطُ الثاني والأنماطُ الخاصة والنوعيّة من الداءِ السكرى الناجمة عن أسبابٍ متنوّعة (فيروسات وأورام وأدوية. إلخ) والنمطُ الحَملي من الداءِ السكرى. يُعدُّ الميتفورمين Metformin خطَّ المعالجةِ الأوَّلِ الداءِ السكرى من النمط الثاني [30]، يزيدُ ميتفورمين من حساسيّة الخلايا للإنسولين ويُنقِصُ من إنتاج الكبد للغلوكوز ويزيد من قبضه واستهلاكه بتواسط الإنسولين ويُثبِّط الأوكسدة الميتاكوندرية مما يزيد من مستوى AMP ويُنقِص ATP داخل الخلية ويُقلِّل الاستحداث الشحمي والسكرى [31]، ومن الممكن أن يُنافس الفيتامين B12 على موقع الامتصاص المُعتمد على الكالسيوم [32]. يبدؤُ ضبطُ الملفِّ الشحميِّ هاجساً لأطباء الغدد الصمِّ عندَ تدبيرِ حالةٍ مريضٍ سكرى، لما له من اختلاطات على مستوى الأوعية الدموية، حيثُ يُشكِّلُ ارتفاعُ مستوى الكوليسترول وLDL وثلاثيات الغليسريد عاملَ خطورةٍ للتسببِ بأمراضٍ قلبيةٍ وعائيةٍ مثلاً [5،6].

2. هدف البحث Aim of Research

يهدفُ البحثُ إلى تقييم حالة الفيتامين B12 عندَ مرضى بدءِ السكرى من النمط الثاني من خلال استخدام واسم حسّاس ودقيق هو Holo-TC II، ودراسة علاقة هذا الواسم الحيوي مع بعض معالم الملف الشحمي (الكوليسترول الكلي وثلاثيات الغليسريد) وجرعة الميتفورمين عند أولئك المرضى.

3. المواد والطرائق Methods and Materials

3.1 العيّنات Samples

3.1.1 أفراد الدراسة Study Subjects

أُجريت هذه الدراسة على 52 مريض سكرى من النمط الثاني، و18 من الأصحاء، وقد استُبعدت العيّنات المرضيّة التي كانَ أفرادها من الحوامل أو المرضعات، ومن لم يمضِ على

تشخيصه أكثر من خمس سنوات، ومن كان يتناول المتممات الفيتامينية بكافة أشكالها، ومن يُعاني قصوراً كبدياً أو كلوياً أو أُجْرِي له استئصال جزئي أو كلي للمعدة أو الأمعاء الدقيقة، ومن يتناول مثبطات مضخة البروتون PPIs أو حاصرات مستقبل الهيستامين 2 أو أيّاً من أدوية الحموضة، بينما استُعيِدَت من عيّنات الأصحاء من يتناول المتممات الفيتامينية لأيّ سبب، ومن يتناول مُضادّات الحموضة (من أيّ نوع) خلال الشّهر السّابق للاعتيان.

3.1.2. الإعتيان Sampling

استُخدِمَت عيّنات بلازما مهبرنة heparinized plasma، بعد صيام (8-12 ساعة)، بحجم (1.5 ml)، جُمِعَت العيّنات المرضيّة من مشفى حمص العسكري، ونُقِلَت إلى مختبري البحث العلمي والكيمياء الحيويّة السريريّة- كليّة الصيدلة في جامعة البعث.

3.2. الأجهزة والأدوات والمواد المُستعملة Used instruments, equipment and materials

استُعمِلَت جملة جهاز ELISA (Robonik® Readwell Touch and Washwell Plate,)، وحمّام مائي (Memmert Water Bath, Germany)، ومجمّدة ومثقلّة أنابيب (Hettich Rotofix 32, Germany)، كما استُعمِلَت الأدوات التالية: أنابيب إيبندورف وماصّات ميكرويّة وأنابيب مهبرنة ومحاقن 5ml ورؤوس للماصّات الميكرويّة بسعات مختلفة (1000, 500, 250, 10, 5µL). استُعمِلَت عتيّدة (Kit) لقياس Human Holo-TC II بطريقة (MyBioResource Southern California, San Diego (USA)) وعتيّدة ثلاثيات غليسيريد (BioSystems S.A. Costa Brava, 30. 08030 Barcelona (Spain)) وعتيّدة كوليسترول كليّ (BioSystems S.A. Costa Brava, 30. 08030 Barcelona) ((Spain)).

3.3. الطرائق Methods

3.3.1. مقايسة بعض معالم الملف الشحمي (الكوليسترول الكلي وثلاثيات الغليسيريد)

جرت مقايضة الكوليسترول الكلي وثلاثيات الغليسيريد بالطريقة الإنزيمية اللونية حسب نشرة العتائد المُستخدمة (BioSystems S.A. Costa Brava, 30. 08030 Barcelona (Spain)) واعتمدت القيمة المرجعية لثلاثيات الغليسيريد حسب نشرة العتيدة: حتى 150mg/dL، أما بالنسبة للكوليسترول الكلي فقد كانت القيمة المرجعية حسب نشرة العتيدة: حتى 200mg/dL

3.3.2. مقايضة Holo-TC II بطريقة المقايضة المناعية المرتبطة بالإنزيم ELISA

أجريت هذه المقايضة باستخدام العتيدة (MyBioResource Southern California, San Diego (USA))، والتي تعتمد طريقة ELISA التنافسية، حيث يحمل طبق المعايرة 96 بئرًا مغلّفًا مُسبقاً بـ Holo-TC II، وخلال التفاعل، سيقوم Holo-TC II الموجود في العيّنات أو في المحاليل العيارية بمنافسة الكمية المثبتة من Holo-TC II (في الطور الصلب) على مواقع الارتباط مع أضداد الكشف المقترنة بالبيوتين والنوعية لـ Holo-TC II. تُغسل الكمية الفائضة من القرائن أو من العينة أو العياري غير المرتبطة عن طبق المعايرة، وبعدها يُضاف HRP-Streptavidin (SABC) لكل بئر من طبق المعايرة ويُحضن، ويلي ذلك إضافة الركازة TMB لكل بئر ليحدث تفاعلٌ نوقفه بإضافة محلول حمض الكبريت وعندها يتغيّر اللون الذي يُقاس بمقياس الطيف الضوئي عند طول موجة 450nm. يُحدّد تركيز Holo-TC II في العيّنات من خلال منحنى الخاص بالمحاليل العيارية.

أجريت الحسابات علماً أنّ نشرة العتيدة كانت تحمل التراكيز بوحدة ng/ml بينما جميع الدراسات المرجعية التي اعتمدت عليها هذا البحث وجميع المجالات المرجعية الواردة فيها كانت بوحدة pmol/L، لذا تمّ التواصل مع الشركة المُصنّعة لإرسال عامل تحويل للرقم حسب الوزن الجزيئي الذي اعتمد عند تحضير هذه العتيدة فكان عامل التحويل حسب الشركة المُصنّعة:

For MBS760611 an approximate conversion is ~1 pmol/L=~44 pg/ml

3.4. التحليل الإحصائي Statistical Analysis

أجرى التحليل الإحصائي باستخدام البرنامج الإحصائي Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) بنسخته الرابعة والعشرين (Version 24)، وبناء على المعطيات ومنهج الدراسة المتبع تم اعتماد اختبار ستودنت T لعينتين مستقلتين وتحليل التباين وحيد الاتجاه One way ANOVA بالإضافة إلى اختبار المقارنات الزوجية المتعددة LSD. تم عد الفروق عند عتبة الدلالة ($P\text{-value} < 0.05$) ذات قيمة مهمة إحصائياً، ثم تم استخراج معامل الارتباط Correlation Coefficient (R) لبيان العلاقات الخطية باستخدام اختبار الانحدار الخطي Linear Regression لكل علاقة.

4. النتائج

بلغ عدد عينات الدراسة 70 عينة من البلازما المهربنة، وقد توزعت هذه العينات على مجموعتين:

مجموعة الأصحاء: 18 عينة (25.72%)، A.

مجموعة مرضى السكري من النمط الثاني: 52 عينة (74.28%)، B.

4.1. الإحصاء الوصفي لمجموعة الأصحاء

يُظهر الجدول 1 توصيف قيم متوسطات وحدود مجالات المعالم المدروسة في هذا البحث، وذلك في عينات الأصحاء.

جدول 1 الإحصاء الوصفي للمعالم المقاسة عند مجموعة الأصحاء

الانحراف المعياري	المتوسط الحسابي	الحد الأدنى	الحد الأعلى	المعلم المقاس
57.342199	387.85094	420.682	197.909	Holo-TC II (pmol/L)

34.6954	136.917	270.0	118.0	TG الشحوم الثلاثية (mg/dl)
7.540	144.83	166	137	كوليسترول كلي (mg/dl) TCh

4.2. الإحصاء الوصفي لمجموعة مرضى النمط الثاني

يُظهرُ الجدول (2) توصيف قيم متوسطات وحدود مجالات المعالم المدروسة في هذا البحث، وذلك في عيّنات مرضى النمط الثاني.

جدول 2 الإحصاء الوصفي للمعالم المُقاسة عند مجموعة مرضى السكري من النمط الثاني

الانحراف المعياري	المتوسط الحسابي	الحدّ الأعلى	الحدّ الأدنى	المعلم المُقاس
137.210	186.605	405.682	7.090	Holo-TC II (pmol/L)
28.792	279.804	316.0	222.0	TG الشحوم الثلاثية (mg/dl)
9.791	183.44	194	158	TCh كوليسترول كلي (mg/dl)
607.023	2076.92	3000	1500	جرعة ميتفورمين اليومية (mg)

4.3. توزع العيّنات حسب درجة العوز

تمّ اعتماد المجالات التالية لمستويات Holo-TC II لتقييم حالة فيتامين B12:

طبيعية (>50 pmol/L)

منخفضة (≥ 35 pmol/L و ≤ 50 pmol/L)

حالة عوز بفيتامين B12 (<35 pmol/L)

وجاء التوزع كما يُظهر الجدول 3.

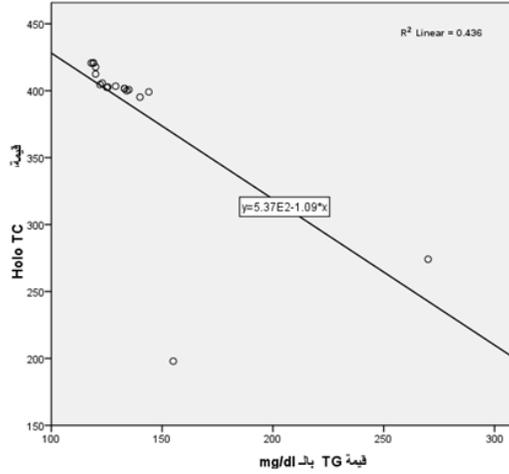
جدول 3 توزع العيآت حسب درجة العوز

المجموع	المجموعات				
	B	A			
57	39	18	العدد	طبيعي >50pmol/L	مجال العوز المجموع
81.42%	75.0%	100.0%	النسبة المئوية		
5	5	0	العدد	منخفض [35-50]	
7.14	9.5%	0.0%	النسبة المئوية		
8	8	0	العدد	عوز <35pmol/L	
11.43%	15.4%	0.0%	النسبة المئوية		
70	52	18	العدد		
100.0%	100.0%	100.0%	النسبة المئوية		

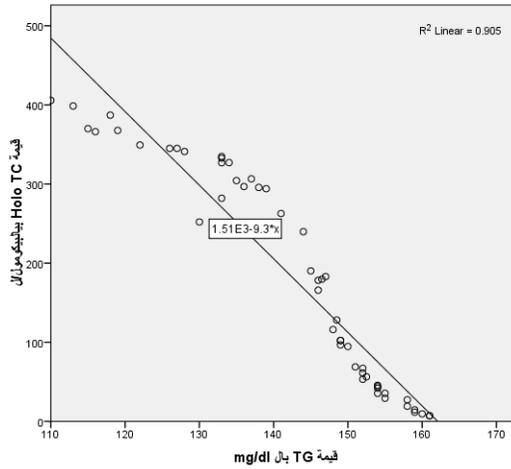
4.4. علاقة Holo-TC II بمستويات TG

عند دراسة علاقة مستويات Holo-TC II مع قيم ثلاثيات الغليسيريد عند مجموعة الأصحاء (كانَ $P=0.003 < 0.05$) مع علاقة عكسية (الشكل 1). وفي حالة مرضى الداء السكري من

النمط الثاني، أظهرت دراسة العلاقة مع مستويات Holo-TC II أن ($P < 0.001$) مع وجود علاقة عكسيّة (الشكل 2).



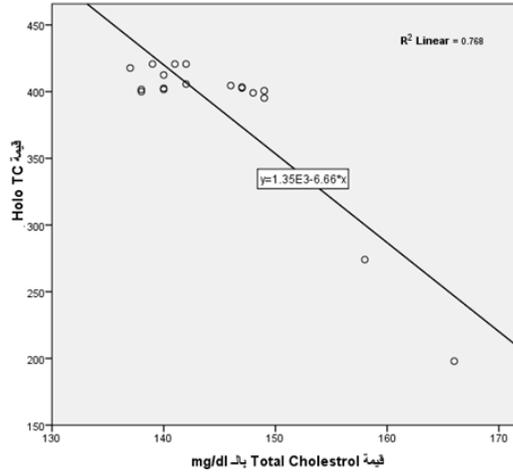
الشكل 1 علاقة مستويات Holo-TC II مع TG عند الأصحاء



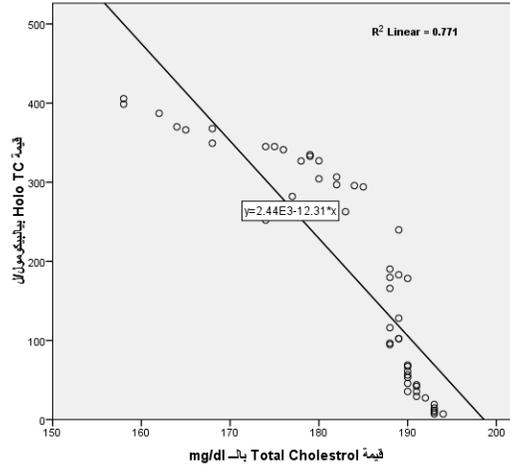
الشكل 2 علاقة مستويات Holo-TC II مع TG عند مرضى السكري من النمط الثاني

4.5. علاقة Holo-TC II بمستويات الكوليسترول الكلي

عند دراسة علاقة مستويات Holo-TC II مع قيم الكوليسترول الكليّ عند مجموعة الأصحاء (كانَ ($P < 0.001$) مع علاقة عكسيّة (الشكل 3). وفي حالة مرضى الداء السكري من النمط الثاني، أظهرت دراسة العلاقة مع مستويات Holo-TC II أنّ ($P < 0.001$) مع وجود علاقة عكسيّة (الشكل 4)



الشكل 3 علاقة Holo-TC II مع الكوليسترول الكليّ عند الأصحاء

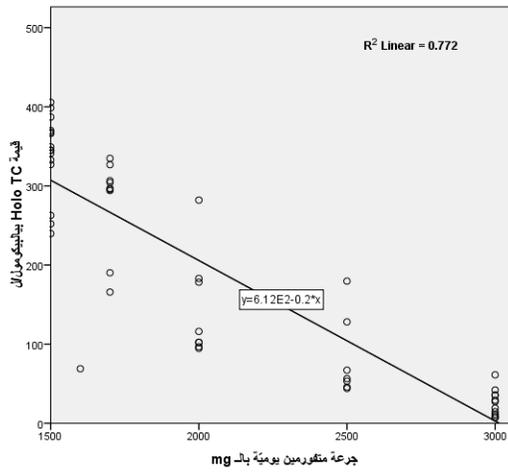


الشكل 4 علاقة Holo-TC II مع الكوليسترول الكليّ عند مرضى داء السكري من النمط الثاني

4.6. علاقة Holo-TC II مع جرعة الميتفورمين عند مرضى السكري من

النمط الثاني

أظهرت نتائج هذه الدراسة عند تحليلها إحصائياً أنَّ مجال جرعة الميتفورمين الموصوفة كان [1500mg-3000mg]، بمتوسط 2076.92 ± 607.023 mg يومياً، وعند دراسة ارتباط مستويات Holo-TC II مع جرعة ميتفورمين اليومية كان $P < 0.001$ مع علاقة عكسية، وهو ما يُظهره الشكل (5).



الأمريكية^[34]، إلا أن نتائج Pflipsen جاءت من خلال مقايضة مستويات فيتامين B12 الكلّي وليس Holo-TC II، وهو ما قد يُفسّر وجود قيمٍ عوزٍ قد لا تكون حقيقيّة. كانت نسبة انتشار العوز في دراسة Kang وزملائه (كوريا، 2014) 17.4% عند مرضى السكري من النمط الثاني المُعالجين بالميتفورمين^[35]، وكانت النسبة 9.5% في دراسة Sun-Hye Ko وزملائها في كوريا الجنوبيّة أيضاً^[36]. بيّنت دراسة قامَ بها Sparre Hermann وزملاؤه (السويد 2004) أن نسبة Holo-TC II كانت أقلّ بنسبة 21.6% عند مرضى السكري من النمط الثاني (53 عينة) مقارنةً مع الأصحاء^[37].

عند دراسة علاقة ارتباط مستويات Holo-TC II مع بعض معالم المرتسم الشحمي لمجموعتي الدراسة تبين أنه لا يوجد ارتباط بين مستويات Holo-TC II ومستويات ثلاثيّات الغليسيريد والكوليسترول الكلّي عند الأصحاء ($P=0.003>0.05$) بينما كان هناك ارتباط قويّ وعلاقة عكسيّة عند مرضى السكري من النمط الثاني ($P<0.001$)، ويُشير ذلك إلى الأثر السلبي لتناقص مستويات Holo-TC II على مستويات ثلاثيّات الغليسيريد TG والكوليسترول الكلّي (TCh) وزيادة خطورة المَرَاضة المرافقة لارتفاع مستويات معالم المرتسم الشحمي (TG, TCh) مع المستويات المُتدنيّة من Holo-TC II وما تدلُّ عليه من انخفاضٍ وظيفيّ في فيتامين B12 وهو ما يتوافق مع دراسة Adaikalakoteswari وزملائه (2014)^[38]. قد يُفسّر ذلك بكون فيتامين B12 يعملُ تميماً للإنزيم ميتيل مالونيل كوانزيم A ميوتاز (MM-CoA) الذي يُحوّل MM-CoA إلى سوكسينيل-CoA، وبالتالي فإنّ عوز فيتامين B12 سيؤدّي إلى تراكم MM-CoA والذي يعملُ مثبّطاً للإنزيم كارنتين بالميتويل ترانز فيراز CPT المسؤول عن معدّل أكسدة الشحوم الدسمة^[39]، ما يؤدّي إلى استحداث الدسم بشكلٍ أكبر، وازدياد مستويات TG. إضافةً إلى ما سبق، يؤدّي تناقص وعوز فيتامين B12 إلى أن تكون كمية أدينوزيل ميثيونين AdoMet محدودة، وهو بدوره سيقلّل من مينة DNA وفرط في التعبير عن بعض المورثات مثل SREBF1 وغيرها في النسيج الشحمي، والتي تُحرّض الاضطناع الحيوي للكوليسترول والهوموسيستئين وتزيدُ من مستوياتهما المصلية^[40].

أظهرت هذه الدراسة ارتباطاً كبيراً ($P < 0.001$) وعلاقةً عكسيةً بين مستويات Holo-TC II وجرعة الميتفورمين، وهو ما توافق مع العديد من الدراسات التي تحدّثت عن استعمال الميتفورمين كعامل خطورة لحدوث عوز فيتامين B12 عند مرضى السُّكري من النمط الثاني، فقد أظهرت دراسة Kang وزملائه [35] (2014) أنّ انتشار العوز كان أكبر عند استعمال الميتفورمين مقارنةً باستعمال السيلفونيل يوريا، كما بيّنت دراسة Reinstatler وزملائها (2012) أنّ 5.8% من المرضى المُعالجين بالميتفورمين، يُعانون من عوز كيميائي حيوي بفيتامين B12 [41]، بينما أظهر Wile وزميله (2010) أنّ استعمال الميتفورمين كان مصحوباً بتناقص مستويات الكوبالامين [42]، مع اختلاف المعالم المقاسة بين دراسة Wile وهذه الدراسة. كما أنّ دراسة Ko وزملائها بيّنت أنّ العوز كان أكبر مع جرعة الميتفورمين ($>2000\text{mg}$, $P = 0.008$) [36]، كما بيّنت دراسة Kim وزملائه أنّ نسبة عوز فيتامين B12 كانت 22.2% من مرضى الدراسة، وأنّ ذلك العوز كان مرتبطاً بجرعة ميتفورمين (≥ 1500 mg) [43]. إنّ جميع نتائج الدراسات السابقة تستند إلى تنافس ميتفورمين مع فيتامين B12 والعامل الداخلي على الارتباط بالمستقبل في موقع الامتصاص من الأمعاء، وهي عملية تعتمد على الكالسيوم.

6. الخلاصة Conclusion

- يُمكن الاعتمادُ على Holo-TC II كواسم حيويّ حسّاس ودقيق لتقصّي حالة فيتامين B12 في الجسم، وتقدير مدى انتشار العوز بالفيتامين في العينات البشرية.
- كان انتشارُ العوز بين مرضى الداء السُّكري من النمط الثاني 15.4%.
- يوجد ارتباط معنوي عكسي بين مستويات فيتامين B12 وبعض معالم الملفّ الشحمي عند مرضى بداء السُّكري
- يوجد ارتباط معنوي عكسي بين مستويات فيتامين B12 وجرعة الميتفورمين المُستخدمة من قبل مرضى السُّكري من النمط الثاني.

7. المقترحات والتوصيات Suggestions and Recommendations

- تثقيف مرضى داء السكرى بأهمية الفيتامين B12 الحيوية في ضبط بعض عوامل خطورة مضاعفات الداء السكرى (الإمراضيات القلبية الوعائية على سبيل المثال)
- إدخال متممات فيتامين B12 ضمن الخطة العلاجية لتدبير النمط الثاني للداء السكرى
- أن تكون جميع متممات فيتامين B12 تحتوي الكالسيوم بهدف التقليل من المنافسة على موقع امتصاص الفيتامين مع المواد الأخرى (الميتفورمين مثلاً)

المراجع

1. Minot GR, Murphy WP. Treatment of Pernicious Anemia by a Special Diet. **JAMA.** 1983;250(24):3328-3335. doi:10.1001/jama.1983.03340240054032
2. Schneider Z, Stroinski A. 2011 Comprehensive B12: Chemistry, Biochemistry, Nutrition, Ecology, **Medicine.** Walter de Gruyter,;
3. Oberley MJ, Yang DT. 2013 Laboratory testing for cobalamin deficiency in megaloblastic anemia. **American journal of hematology.**;88(6):522-526.
4. Smith AD, Warren MJ, Refsum H. 2018 Vitamin B12. In: **Advances in Food and Nutrition Research.** Vol 83. Elsevier,;215-279.
5. Hötte GJ, Lindemans J, Wijnhoven BPL. 2017 Vitamin B12 deficiency after esophagectomy with gastric tube reconstruction for esophageal cancer. **Diseases of the esophagus: official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus.**;30(12):1-8.
6. Herbert V. 1988 Vitamin B-12: plant sources, requirements, and assay. **The American Journal of Clinical Nutrition.**;48(3):852-858. doi:10.1093/ajcn/48.3.852
7. Zhang M, Han W, Hu S, Xu H. 1988 Methylcobalamin: A Potential Vitamin of Pain Killer. Li ST, ed. **Neural Plasticity.** 2013; 2013:424651. doi:10.1155/2013/424651

8. Hannibal L, Lysne V, Bjørke-Monsen A-L, et al. 2016 Biomarkers and algorithms for the diagnosis of vitamin B12 deficiency. **Frontiers in molecular biosciences**; 3:27.
9. Azzini E, Ruggeri S, Polito A. 2020 Homocysteine: Its Possible Emerging Role in At-Risk Population Groups. **International Journal of Molecular Sciences**;21(4):1421. doi:10.3390/ijms21041421
10. B. MATCHAR D, R. FEUSSNER J, S. MILLINGTON D, H. WILKINSON Jr R, J. WATSON D, GALE D. 2020 Isotope-Dilution Assay for Urinary Methylmalonic Acid in the Diagnosis of Vitamin B12 Deficiency. **Annals of Internal Medicine**. Published online March 10,. Accessed March 1, 2021. <https://www.acpjournals.org/doi/abs/10.7326/0003-4819-106-5-707>
11. Refsum H, Johnston C, Guttormsen AB, Nexø E. 2006 Holotranscobalamin and Total Transcobalamin in Human Plasma: Determination, Determinants, and Reference Values in Healthy Adults. **Clinical Chemistry**;52(1):129-137. doi:10.1373/clinchem.2005.054619
12. Herrmann W, Obeid R, Schorr H, Geisel J. 2003 Functional Vitamin B12 Deficiency and Determination of Holotranscobalamin in Populations at Risk. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**;41(11):1478-1488. doi:<https://doi.org/10.1515/CCLM.2003.227>
13. Herrmann W, Obeid R. 2012 Cobalamin Deficiency. In: Stanger O, ed. **Water Soluble Vitamins: Clinical Research and Future Application**. Subcellular Biochemistry. Springer Netherlands;;301-322. doi:10.1007/978-94-007-2199-9_16
14. Hall CA. 1977 The carriers of native vitamin B12 in normal human serum. **Clin Sci Mol Med**;53(5):453-457. doi:10.1042/cs0530453
15. Loikas S, Löppönen M, Suominen P, et al. 2003 RIA for Serum Holo-Transcobalamin: Method Evaluation in the Clinical Laboratory and Reference Interval. **Clinical Chemistry**;49(3):455-462. doi:10.1373/49.3.455
16. Ulleland M, Eilertsen I, Quadros EV, et al. 2002 Direct assay for cobalamin bound to transcobalamin (holo-transcobalamin) in serum. **Clin Chem**;48(3):526-532.

17. Morkbak AL, Heimdal RM, Emmens K, et al. 2005 Evaluation of the technical performance of novel holotranscobalamin (holoTC) assays in a multicenter European demonstration project. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**.;43(10):1058-1064. doi:10.1515/CCLM.2005.185
18. Orning L, Rian A, Campbell A, et al. 2006 Characterization of a monoclonal antibody with specificity for holo-transcobalamin. **Nutrition & Metabolism**.;3(1):3. doi:10.1186/1743-7075-3-3
19. Harrington DJ. 2017 Laboratory assessment of vitamin B12 status. **Journal of Clinical Pathology**.;70(2):168-173. doi:10.1136/jclinpath-2015-203502
20. Sobczyńska-Malefora A, Gorska R, Pelisser M, Ruwona P, Witchlow B, Harrington DJ. 2014 An audit of holotranscobalamin (“Active” B12) and methylmalonic acid assays for the assessment of vitamin B12 status: Application in a mixed patient population. **Clinical Biochemistry**.;47(1):82-86. doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.08.006
21. Griffioen PH, van Dam-Nolen DHK, Lindemans J, Heil SG. 2017 Measurement of total Transcobalamin employing a commercially available assay for Active B12. **Clinical Biochemistry**.;50(18):1030-1033. doi:10.1016/j.clinbiochem.2017.08.009
22. Hvas A-M, Ellegaard J, Nexø E. 2001 Increased Plasma Methylmalonic Acid Level Does Not Predict Clinical Manifestations of Vitamin B12 Deficiency. **Arch Intern Med**.;161(12):1534. doi:10.1001/archinte.161.12.1534
23. Kim J, Kim H, Roh H, Kwon Y. 2018 Causes of hyperhomocysteinemia and its pathological significance. **Arch Pharm Res**.;41(4):372-383. doi:10.1007/s12272-018-1016-4
24. Moretti R, Caruso P. 2019 The Controversial Role of Homocysteine in Neurology: From Labs to Clinical Practice. **International Journal of Molecular Sciences**.;20(1):231. doi:10.3390/ijms20010231
25. Vladimirova- Kitova LG, Deneva TI, Marinov B. 2011 Effect of Moderate and High-Dose Simvastatin on Asymmetric Dimethylarginine-Homocysteine Metabolic Pathways in Patients with Newly Detected Severe Hypercholesterolemia. **Cardiovascular**

- Therapeutics**;29(5):340-348. doi:https://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2010.00149.x
26. Hvas A-M, Nexø E. 2005 Holotranscobalamin – a first choice assay for diagnosing early vitamin B12 deficiency? **Journal of Internal Medicine**;257(3):289-298. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2004.01437.x
27. Remacha AF, Sardà MP, Canals C, et al. 2014 Role of serum holotranscobalamin (holoTC) in the diagnosis of patients with low serum cobalamin. Comparison with methylmalonic acid and homocysteine. **Annals of hematology**;93(4):565-569.
28. Powers AC, Niswender KD, Evans-Molina C. 2018 Diabetes Mellitus: Diagnosis, Classification, and Pathophysiology. In: Jameson JL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J, eds. **Harrison's Principles of Internal Medicine**. 20th ed. McGraw-Hill Education;. Accessed April 30, 2020. accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1156520865
29. Association AD. 2. 2020 Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2020. **Diabetes Care**;43(Supplement 1):S14-S31. doi:10.2337/dc20-S002
30. Association AD. 9. 2020 Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes—2020. **Diabetes Care**;43(Supplement 1):S98-S110. doi:10.2337/dc20-S009
31. ER Pearson, RJ McCrimmon. Diabetes mellitus. In: **Davidson's Principles and Practice of Medicine**. 23th ed.p720
32. Damião CP, Rodrigues AO, Pinheiro MFMC, et al. 2016 Prevalence of vitamin B12 deficiency in type 2 diabetic patients using metformin: a cross-sectional study. **Sao Paulo Medical Journal**;134(6):473-479.
33. Akabwai GP, Kibirige D, Mugenyi L, et al. 2016 Vitamin B12 deficiency among adult diabetic patients in Uganda: relation to glycaemic control and haemoglobin concentration. **J Diabetes Metab Disord**;15(1):26. doi:10.1186/s40200-016-0250-x
34. Pflipsen MC, Oh RC, Saguil A, Seehusen DA, Seaquist D, Topolski R. 2009 The Prevalence of Vitamin B12 Deficiency in Patients with Type 2

- Diabetes: A Cross-Sectional Study. **J Am Board Fam Med.**;22(5):528-534. doi:10.3122/jabfm.2009.05.090044
35. Kang D, Yun J-S, Ko S-H, et al. 2014 Higher Prevalence of Metformin-Induced Vitamin B12 Deficiency in Sulfonylurea Combination Compared with Insulin Combination in Patients with Type 2 Diabetes: A Cross-Sectional Study. **PLoS One.**;9(10). doi:10.1371/journal.pone.0109878
36. Ko S-H, Ko S-H, Ahn Y-B, et al. 2014 Association of Vitamin B12 Deficiency and Metformin Use in Patients with Type 2 Diabetes. **Journal of Korean Medical Science.**;29(7):965-972. doi:10.3346/jkms.2014.29.7.965
37. Sparre Hermann L, Nilsson B, Wettre S. 2004 Vitamin B12 status of patients treated with metformin: a cross-sectional cohort study. **Diabetes & Vascular Disease.**;4(6):401-406. doi:10.1177/14746514040040060701
38. Adaikalakoteswari A, Jayashri R, Sukumar N, et al. 2014 Vitamin B12 deficiency is associated with adverse lipid profile in Europeans and Indians with type 2 diabetes. **Cardiovasc Diabetol.**;13. doi:10.1186/s12933-014-0129-4
39. Sigauke E, Rakheja D, Kitson K, Bennett MJ. 2003 Carnitine Palmitoyltransferase II Deficiency: A Clinical, Biochemical, and Molecular Review. **Laboratory Investigation.**;83(11):1543-1554. doi:10.1097/01.LAB.0000098428.51765.83
40. Adaikalakoteswari A, Finer S, Voyias PD, et al. 2015 Vitamin B12 insufficiency induces cholesterol biosynthesis by limiting s-adenosylmethionine and modulating the methylation of SREBF1 and LDLR genes. **Clinical Epigenetics.**;7(1):14. doi:10.1186/s13148-015-0046-8
41. Reinstatler L, Qi YP, Williamson RS, Garn JV, Oakley GP. 2012 Association of Biochemical B12 Deficiency With Metformin Therapy and Vitamin B12 Supplements. **Diabetes Care.**;35(2):327-333. doi:10.2337/dc11-1582
42. Wile DJ, Toth C. 2010 Association of Metformin, Elevated Homocysteine, and Methylmalonic Acid Levels and Clinically

Worsened Diabetic Peripheral Neuropathy. **Diabetes Care.**;33(1):156-161. doi:10.2337/dc09-0606

43. Kim J, Ahn CW, Fang S, Lee HS, Park JS. 2019 Association between metformin dose and vitamin B12 deficiency in patients with type 2 diabetes. **Medicine.**;98(46):e17918. doi:10.1097/MD.00000000000017918