

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**SUBKLİNİK B12 VİTAMİN EKSİKLİĞİ SAPTANAN
HASTALARDA NÖTROFİL SEGMENT VE LOB SAYILARI**

Dr. Hatice ÖNER

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA
2018**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**SUBKLİNİK B12 VİTAMİN EKSİKLİĞİ SAPTANAN
HASTALARDA NÖTROFİL SEGMENT VE LOB SAYILARI**

Dr. Hatice ÖNER

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Yahya BÜYÜKAŞIK**

**ANKARA
2018**

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitim sürecim ve tezimin hazırlanmasında sonsuz katkılarından ve desteğinden dolayı tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Yahya Büyükaşık hocama teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Eğitim hayatım boyunca maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen annem Halise Öner, babam Erdoğan Öner ve kardeşlerime teşekkür ederim.

ÖZET

Subklinik B12 vitamin eksikliği saptanan hastalarda nötrofil segment ve lob sayıları. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2018.

Giriş ve Amaç: Vitamin B12 insan vücudunda yapılamadığından diyetle dışarıdan alınması gereken ve suda çözünen bir vitamindir. Temel fonksiyonu folik asit ile birlikte DNA sentezinde koenzim ve kofaktör olarak görev yapmaktır. Özellikle normal hematopoezin sürdürülmesi ve sinir sisteminin devamlılığı için gereklidir. Eksikliğinde hematolojik, gastrointestinal ve nörolojik birtakım rahatsızlıklar görülmektedir. Bu çalışmada günümüzde çok sık rastladığımız subklinik ve aşikar vitamin B12 eksikliğinde nötrofil çekirdeğinde görülen segmentasyon ve lobasyon sayılarının saptanması ve günümüzde B12 vitamin eksikliği tanısına katkısı açısından incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Hematoloji polikliniğinde Nisan 2018 ve Eylül 2018 arasında yapılan tanımlayıcı prospektif bir çalışmadır. Çalışmaya alınan B12 vitamin eksikliği saptanan 45 hasta ve 50 sağlıklı gönüllü bireyin periferik yayma örneği incelendi. Hastaların demografik bilgileri hastane elektronik siteminden alındı. Çalışmaya alınan hastaların her bir periferik yaymasında 20 adet nötrofilde lob ve segment sayıldı. Segment her iki lobun ince bir kromatin ağ ile ayrıldığına sayıldı. Loblar ise en az 2/3 oranında boğumlanmış kromatin ile ayrılmış çekirdek bölgeleri olarak tanımlandı.

Bulgular: Hastaların % 52'si kadın, %48'i erkek; kontrol grubunun ise % 68'i kadın, %32'si erkek idi. Aşikar B12 eksikliği olan hastaların en fazla lobasyon oranına sahip olduğu görüldü (ortalama \pm standart sapma=3,44 \pm 0,8). Ortalama lob sayısı aşikar B12 eksikliği, subklinik eksiklik, kontrol grubu sırasına göre azalıyordu. Ancak segment sayısı için böyle bir eğilim izlenmedi. 4 lob eşik değer kabul edildiğinde, bunu üstünde lob sayısı varlığının B12 eksikliği saptamada en uygun duyarlılık (%75) ve özgüllüğe (%94) haiz olduğu belirlendi. Segment sayısı kullanılması düşük duyarlılık (%20) düzeyi gösteriyordu.

Sonuçlar: Günümüzde B12 vitamin düzeyinin sık taranması ve laboratuvar tetkiklerinin kolay ulaşılabilir olması nedeniyle eksiklik saptanan hastalarda hipersegmentasyon olmadan periferik yaymada lobülasyon artışının da B12 eksikliği tanısını saptamada değerli olduğu görülmüştür. Klinisyene, vitamin B12 değeri düşük olan hastada henüz homosistein yüksek olmadan yahut anemi ve makrositoz olmadan da nötrofil hücre çekirdeğindeki lobasyon artışının yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: B12 vitamin eksikliği, nötrofil, lob, segment

ABSTRACT

Neutrophil segment and lobe count in patients with subclinical vitamin B12 deficiency. Hacettepe University Faculty of Medicine Department of Internal Medicine, Specialization Thesis, Ankara, 2018.

Introduction and Purpose: Vitamin B12 is a water-soluble vitamin and it can not be made in human body. Its main function is to act as a coenzyme and cofactor in DNA synthesis together with folic acid. It is especially necessary for the maintenance of normal hematopoiesis and continuity of the nervous system. Some hematological, gastrointestinal and neurological disorders occur in case of vitamin B12 deficiency. The aim of this study was to determine the number of segmentation and lobation numbers in neutrophil nuclei and to evaluate the contribution of these parameters to the diagnosis of vitamin B12 deficiency.

Patients and Methods: This is a descriptive prospective study conducted at the Hacettepe University Hematology Outpatient Clinic between April 2018 and September 2018. Forty-five patients with vitamin B12 deficiency and 50 healthy volunteers were evaluated. The demographic data of the patients were obtained from the hospital electronic system. The lobes and segments were counted in 20 neutrophils in each peripheral smear. A segment was considered when both lobes were separated by a fine chromatin network. Lobes were defined as core regions separated by at least 2/3 knotted chromatin.

Results: 52% of the patients were female and 48% were male; 68% of the control group were female and 32% were male. Patients with apparent B12 deficiency had the highest lobation rate (mean \pm standard deviation = $3,44 \pm 0,8$). Mean lobation rate was decreasing in the order of manifest B12 deficiency, subclinical deficiency and control group. However such a trend was not present for segment count. A lobe count higher than 4 had the most appropriate sensitivity (75%) and specificity (94%) in detecting B12 deficiency. Using higher than 4 segments as a threshold showed low sensitivity (%20).

Nowadays, in patients with deficiency due to frequent screening of vitamin B12 levels and easy access of laboratory tests, increased lobulation increase in peripheral smear without hypersegmentation was found to be valuable in detecting B12 deficiency. It is thought that in patients with low vitamin B12 levels, the increase in lobulation in the neutrophil cell nucleus without homocysteine or without anemia and macrocytosis is thought to be helpful.

Keywords: B12 vitamin deficiency, neutrophil, lobe, segment

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	10
2. GENEL BİLGİLER	11
2.1. Vitamin B12'nin Biyokimyasal Özellikleri.....	11
2.1.2. Vitamin B12 'nin Emilimi ve Metabolizması	11
2.1.3 Vitamin B12'nin Fizyolojik rolü	13
2.1.4. Vitamin B12 Eksikliğinin Nedenleri	16
2.1.5. Vitamin B12 Eksikliğinde Görülen Klinik ve Laboratuar Bulgular.....	17
2.1.6. Vitamin B12 Eksikliğinin Tanısı	21
2.1.7. B12 Vitamini Eksikliğinin Tedavisi	23
2.2. Nötrofil ile ilgili genel bilgiler.....	24
3. MATERYAL ve METOD.....	25
4. İSTATİKSEL ANALİZ	28
5. BULGULAR.....	29
6. TARTIŞMA	35
7. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	38
8. KAYNAKLAR	39

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APA	Anti-pariyetal antikor
BK	Beyaz küre
Co	Kobalt
DEA	Demir eksikliği Anemisi
DNA	Deoksiribonükleik Asit
GİS	Gastro İntestinal Sistem
H.pylori	Helicobacter pylori
H2RA	Histamin Reseptör Antagonisti
Hb	Hemoglobin
Hcs	homosistein
HoloTC	Holotranskobalamin
IF	İntrinsik Faktör
KoA	Koenzim A
LDH	Laktat dehidrogenaz
MCV	Ortalama Eritrosit Hacmi
Mg	Miligram
MMA	Metilmalonik Asit
MM-CoA	Metilmalonil KoA
MS	Metionin Sentaz
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
PPI	Proton Pompa İnhibitörü
SAM	S-Adenozil Metiyonin
TC-II	Transkobalamin-II
THF	Tetrahidrofolat
Tr	Trombosit
µg	Mikrogram

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1. Vitamin B12 eksikliği nedenleri	17
Tablo 2. Değişik hasta gruplarının ve kontrol vakalarının başlıca demografik ve laboratuvar sonuçları.....	29
Tablo 3. Gruplara göre Nötrofil lob ve segment dağılımları.....	30
Tablo 4. Lob sayıları açısından grupların kıyaslandığı ANOVA testi.....	32
Tablo 5. Lob sayıları açısından grupların kıyaslandığı ANOVA testinin post-hoc analizi.....	32
Tablo 6. Hasta – kontrol segment sayısı >4	33
Tablo 7. Hasta – kontrol lob sayısı > 4	33

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. B12 vitamin emilimi	13
Şekil 2. Vitamin B12 eksikliği şüphesi olan hastalarda yaklaşım	22
Şekil 3. Nötrofil lob ve segment görünümleri. Soldaki resim 2 segment, 3 loblu nötrofil; sağdaki resim 6 segment, 6 loblu nötrofil	27
Şekil 4. Nötrofil loblarının B12 eksikliği saptamada özgüllük ve duyarlılığı	34

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Vitamin B12 insan vücudunda yapılamadığından diyetle dışarıdan alınması gereken ve suda çözünen bir vitamindir (1). Vitamin B12'nin temel fonksiyonu folik asit ile birlikte DNA sentezinde koenzim ve kofaktör olarak görev yapmaktır, özellikle normal hematopoezin sürdürülmesi ve sinir sisteminin devamlılığı için gereklidir (2, 3).

Vitamin B12 eksikliğine yol açan nedenler genel olarak vejetaryan diyet, intrinsek faktör yapım azlığı, pernisiyöz anemi, proton pompa inhibitörü veya H2 reseptör inhibitör kullanımı dolayısıyla gastrik asit salınımında azalma, H.pylori enfeksiyonu, gastrik bypass, bakteriyel çoğalma, B12 vitamininin ileal emiliminin azalması (ince barsak rezeksiyonu veya Crohn hastalığı), transkobalamin eksikliği (nadir) olarak sayılabilir (4).

Vitamin B12 eksikliği hematolojik, nöropsikiyatrik, gastrointestinal, aterosklerotik olmak üzere birtakım hastalıklar ile ilişkilidir (5). Vitamin B12 eksikliğinde hematolojik olarak makrositer anemi, nötropeni, trombositopeni ve ciddi eksiklik halinde hemolitik anemi ve pansitopeni de izlenebilmektedir (6). Denge kusuru, parestezi, periferik nöropati, optik nöropati, fekal üriner inkontinans, hafıza ile ilgili problemler, depresyon veya duygudurum bozukluğu, sinirlilik, uykusuzluk, bilişsel yavaşlama, unutkanlık, demans, nöropsikiyatrik problemler arasında sayılabilir (7-9). Vitamin B12 eksikliğinin gastrointestinal sistem üzerine etkileri arasında bulantı-kusma, iştahsızlık, dispeptik yakınmalar, karın ağrısı, aftöz ülserler, atrofik glossit (Hunter dili), sarılık, ishal yer alır (10). Hiperhomosisteinemi ve aterosklerotik sürecin başlamasında vitamin B12 eksikliğinin rolü günümüzde anlaşılabilmiştir (5).

Çalışmamızda günümüzde subklinik ve aşık vitamin B12 eksikliği olan hastalarda nötrofil lob ve segmentasyon sayımının yapılarak eksikliğin erken döneminde hücresel düzeyde görülen değişikliklerin saptanması, tanıya katkısının bulunması ve elde edinilen sonuçlar aracılığıyla literatüre katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Vitamin B12'nin Biyokimyasal Özellikleri

Vitamin B12 nükleotid benzeri kısımda 5,6 dimetil benzimidazol, α glikozid bağı ile D-riboza bağlanmıştır. Merkezi "korin" zincir sistemi porfirinlere benzer. Korin halkasının iç kısımdaki azot atomu ile koordineli olup merkezde kobalt (Co) atomu içerir. Bu nedenle B12 kobalamin olarak da anılmaktadır (11). Başlıca 4 kobalamin türevi ayırt edilir ve bunlar kobalamine bağlı olan ek grubun adıyla belirlenirler: Siyanokobalamin, hidroskobalamin, deoksiadenozilkobalamin ve metilkobalamin (12). Siyanokobalamin ve hidroskobalamin stabil bileşiklerdir. Deoksiadenozilkobalamin ve metilkobalamin ise B12 vitamininin dokulardaki aktif bileşikleridir. Hidroskobalaminin vücutta transkobalamin ile yaptığı komplekse karşı antikor oluşması nedeniyle ilaç olarak genellikle kullanılmaz ve ilaç olarak daha çok siyanokobalamin kullanılır (12, 13). Plazmada en fazla metilkobalamin bulunurken (%60-80) dokularda ise en yoğun 5'deoksiadenozilkobalamin bulunmaktadır (14).

2.1.2. Vitamin B12'nin Emilimi ve Metabolizması

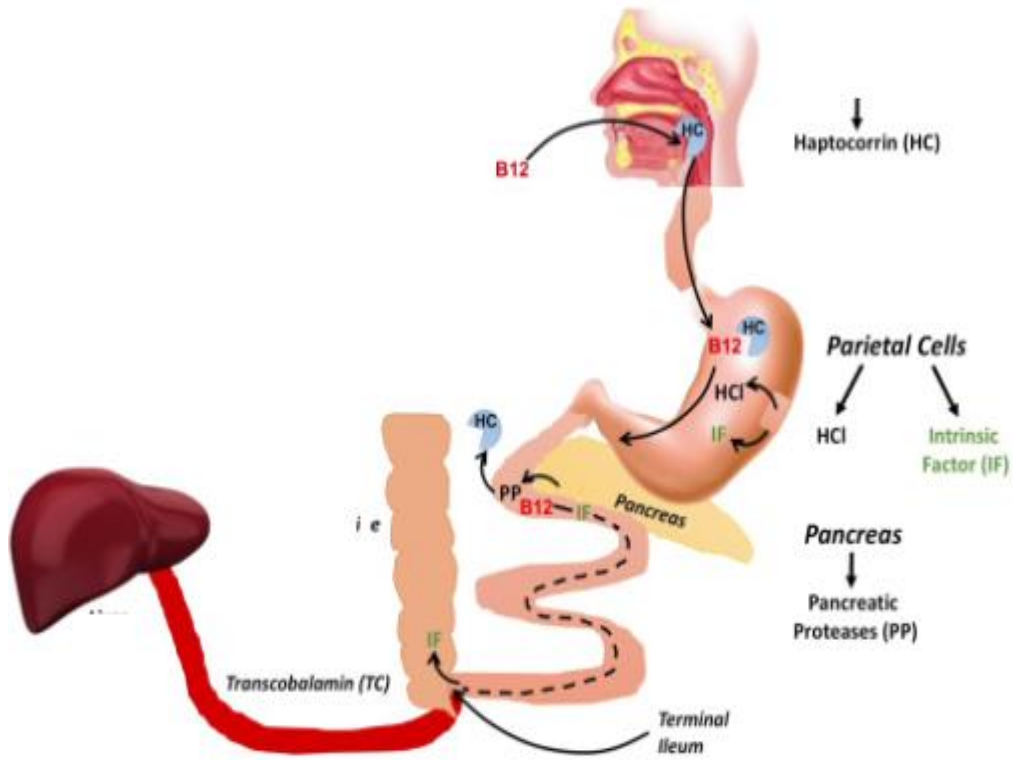
Vitamin B12 doğadaki diğer B grubu vitaminlerden farklı olarak bitkisel kaynaklı değildir. Bakteri ve bazı küf mantarları tarafından üretilir (15). Ancak bazı bitkisel kaynaklı besinlerin B12 vitaminini içerdiği gösterilmiştir (16). Örneğin deniz yosunu ve mantarlar, insanlarda inaktif olan vitamin B12 analogları içerir ve bazı türlerde Japon deniz yosununun (nori) veganlarda B12 vitamini eksikliğini önlediği öne sürülmektedir (16).

Vitamin B12 genel olarak toprak ve kontamine suda bulunur. Kolon bakterileri tarafından sentez edilirse de burada üretilen B12 vitamini emilim alanının distalinde kalır, bu nedenle gıda ile alınması zorunludur (17). B12 vitamininden zengin gıdalar özellikle karaciğer, böbrek, kas, yumurta, peynir, süt ve deniz ürünleri gibi hayvansal besinlerdir. Diyetteki kobalaminler adenosilkobalamin ve hidroskobalamin şeklindedir (2, 17).

Kobalamin günlük alım üst sınırı erkekler ve gebe olmayan kadınlar için 2.4 μg , hamile olan kadınlar için 2.8 μg , 9-18 yaş arası çocuklar içinse 1.5-2 μg

arasındadır (18). Etten, süt ve süt ürünlerinden, yumurtadan zengin ortalama bir batı diyetinde 5-7 µg/gün kobalamin bulunur ve bu düzey normal kobalamin dengesi için yeterlidir (18). Günde 0.5 µg'den daha az kobalamin içeren vejeteryan diyetler ile yeterli ölçüde kobalamin dengesi sağlanamaz ve desteklenmelidir. B12 vitamini toplam vücut depoları 2 ile 5 mg arasındadır ve bunların yaklaşık yarısı karaciğerde depolanır. B12 vitamini alımı kesilirse, eksiklik genellikle en az bir ile iki yıl, bazen daha uzun süre gelişmez (19).

B12 vitamini kimyasal olarak karmaşık bir moleküldür. Bir dizi mekanizma kararlılığını ve emilimini sağlar (20). Kobalamin gıdalarda genellikle proteinlere bağlanan koenzim formunda (deoksiadenosiyolkobalamin ve metilkobalamin) bulunur. Kobalaminin besindeki proteinden ayrılması için midedeki düşük pH değerlerinde gerçekleşen sindirim gereklidir (20, 21). Kobalamin proteoliz ile açığa çıkar ve öncelikle kobalamin bağlayan bir protein olan R proteinine yüksek afinite ile bağlanır. R proteini tükürük ile gastrik sıvıda bulunur. Kobalamin-R protein kompleksleri duodenum 2. kısma gelir ve burada pankreatik proteazlar ile kobalamin ve R proteini birbirinden ayrılır. Gastrik parietal hücrelerden üretilen intrinsik faktör, R proteininden ayrılan kobalamin ile bağlanır. Kararlı durumdaki intrinsik faktör kobalamin kompleksi jejunuma sonrada ileuma gelir ve burada ileal mukozal hücrelerin mikroviluslarındaki membran ilişkili intrinsik faktör-kobalamin reseptörlerine bağlanır. Kobalamin enterositler içinde transkobalamin 2'ye bağlanır ve dolaşıma geçer. Hücre yüzeylerinde bulunan transkobalamin 2 reseptörleri sayesinde kobalamin kolayca tanınır. Serumdaki kobalaminin %75'ine bağlanan transkobalamin 1 taşımada rol oynamaz iken daha çok kobalaminin kandaki deposunu teşkil eder. Üçüncü ve sayıca daha az miktarda bulunan bir protein olan transkobalamin 3 karaciğerden safra yolu ile atılmasını sağlar (20, 21).



Şekil 1. B12 vitamin emilimi

Vitamin B12 emilim basamakları;

1. B12 vitaminin gıdadan ayrılması,
2. Haptokorrine (R faktör) bağlanma,
3. Üst sindirim sisteminde haptokorrinin pankreas enzimlerince sindirilmesi ve intrinsik faktöre (İF) bağlanma,
4. B12-İF birleşiminin ince bağırsakta villuslara bağlanması ve B12-İF birleşiminin endositoz ile hücre içine alınması,
5. Transkobalamin II'ye bağlı vitamin B12' nin portal dolaşımına ana depo bölgesi olan karaciğere taşınması.

2.1.3 Vitamin B12'nin Fizyolojik rolü

Hücre içi kobalaminin %95'ten fazlası metil-malonil-koenzimA (KoA) mutaz ve metionin sentetaz adlı iki hücresel enzime bağlıdır. Mitokondride deoksiadenozil-kobalamin, metilmalonil-KoA için bir kofaktördür. Bu enzim ile propiyonat metabolizmasının ürünü olan metil-malonil-KoA, süksinil-KoA'ya dönüştürülür ve

bu form daha kolay metabolize edilir. 5-metil tetrahidrofolattaki metil grubu metilkobalaminin yenilenmesi için kullanılır ve böylece tek karbon metabolizmasını koruyan THF'nin oluşumu gerçekleşir. Oluşan metionin adenillenerek S-adenozilmetionin oluşur. S-adenozilmetionin 80'den fazla protein, fosfolipid, nörotransmitterler, RNA ve DNA ile ilgili hayati biyolojik tepkimelerde önemli bir metil grubu taşıyıcısıdır (22).

Vitamin B12 ve folat, DNA ve RNA sentezinde kritik bir rol oynar. Bu vitamin eksikliklerinde DNA sentezini bozulabilir. Sonuçta hücre döngüsünün DNA sentez fazında durmasına neden olabilir. DNA replikasyonundaki hatalar nedeniyle de hücre apoptozisi gerçekleşebilir (20).

B12 vitamini eksikliği, folatın 5-metil-THF formunda sıkışmasına neden olabilir (metil-THF tuzağı hipotezi) (23). Ek olarak, B12 vitamini eksikliği, tek karbonlu bir verici olarak kullanılan S-adenozilmetionin (SAM) yapmak için kullanılan metioninin eksikliğine yol açabilir (formate açlık hipotezi) (23). Tek karbon metabolizması, DNA'nın yapı taşlarını yapmak için gereken çeşitli reaksiyonlarda kullanılır. 10-formil THF, pürin sentezi için iki metil grubunu bağışlar (pürin halkasına dahil edilir) ve 5,10-metilen THF ise deoksiüridin monofosfatı, deoksitimidin monofosfata dönüştürmek için bir metil grubu bağışlar. Deoksiüridin trifosfat, yanlışlıkla deoksitimidin trifosfat yerine DNA'ya dahil edilebilir ve normal eksizyon onarım işlemleri, mevcut deoksitimidin trifosfat eksikliğinden dolayı hatayı düzeltebilir (23). Arızalı DNA onarımının tekrarlanan döngüleri, DNA iplikçığının kırılmasına ve parçalanmasına neden olabilir. Normal sitoplazmik olgunlaşma düzenindeki sentez fazı gecikmesi, nükleer sitoplazmik dissenkron olarak adlandırılır ve bu kemik iliğinde megaloblastik değişikliklerin temelini oluşturur. Apoptotik hücre ölümü, etkisiz eritropoezin temelini oluşturur (23, 24).

Hematopoetik öncü hücreler vücuttaki en hızlı bölünen hücreler arasındadır ve dolayısıyla B12 vitamini ve folat eksikliklerinin neden olduğu anormal DNA sentezine en duyarlı olan hücre tiplerinden biridir (25). Vitamin B12'nin hematopoezis üzerine iki majör etkisi vardır;

1-Megaloblastik değişiklikler: megaloblastik değişiklikler, sitoplazmik olgunlaşma döngüsüne göre nükleer bölünme döngüsünün yavaşlamasından

kaynaklanır. Kemik iliğinde bulunan çekirdekli prekürsör hücrelerin herhangi birinde çeşitli megaloblastik değişiklikler görülebilir. Dev metamyelositlere ve artmış mitotik figürlere göre olgunlaşmamış veya morfolojik olarak anormal çekirdeğe sahip olan prekürsör hücreler bunlara örnektir (24). Bu değişiklikler genellikle hafif olan izole anemiye ve/veya diğer sitopenilere neden olabilir. Makrositik eritrositler ve hipersegmente nötrofiller periferik kan yaymalarındaki klasik bulgulardır. Hipersegmente nötrofiller sıklıkla makrositozdan önce gelir ve makrositoz da sıklıkla anemiden önce gelir (24).

2-İnefektif eritropoezis: Kemik iliğinde gelişen eritropoetik öncü hücrelerin erken ölümü (örn. fagositoz veya apoptoz) olduğunda etkisiz eritropoez (intramedüller hemoliz olarak da adlandırılır) ortaya çıkar. Kemik iliği hipersellülaritesi, yüksek serum demiri, indirekt bilirubin, laktat dehidrogenaz (LDH) ve düşük haptogloblin de dahil olmak üzere hemoliz laboratuvar bulguları olabilir ancak retikülosit sayısı düşüktür (3, 26).

Nöronal mekanizmalarda B12'nin büyük rol aldığı düşünülmektedir (27). Nöronal lipidlerin ve miyelin basic proteini gibi nöronal proteinlerin azaltılmış metilasyonunun, bazı nörolojik defisitlerde rol oynadığı varsayılmıştır. Miyelin basic proteini, miyelinin yaklaşık üçte birini oluşturur ve B12 vitamini eksikliğindeki demiyelinizasyon, nörolojik bulguların çoğunu açıklayabilir (25).

Homosisteinin metiyonine dönüşümünün bozulması, kobalamin eksikliğinde görülen nörolojik komplikasyonlardan kısmi olarak sorumludur. Bu reaksiyon sonucu oluşan metiyonin, miyelin sentezi için gerekli olan kolin ve kolin içeren fosfolipidlerin üretimi için gereklidir (27, 28). Kobalamin eksikliği folat metabolizmasından bağımsız olarak da demiyelizasyona bağlı sinir sistemi hasarı ve nörolojik bulgulara neden olabilmektedir. Nöronal metabolizmada SAM'ın da büyük önem taşıdığı düşünülmektedir. Metiyonin eksikliğinin sonucu olarak S-adenozilmetiyonin açığı meydana gelir. SAM aynı zamanda bir metilen-THF redüktaz inhibitörüdür. THF redüktaz inhibe edilemediğinden metil-THF yapımı bu yolla da artmaktadır. SAM, miyelin içinde gerekli olabilen bazı transmetilasyon reaksiyonlarında da yer alır. Bu durum B12 vitamini eksikliğinde oluşan nöropatileri açıklamada ileri sürülen hipotezlerden birini açıklamaktadır (27, 28).

Kobalaminin kofaktör olarak rol aldığı bir diğer reaksiyon ise metilmalonil-KoA'nın süksinil-KoA'ya dönüşümü olup bu reaksiyonda adenzilkobalamin kullanılır. Bakteri ve memeli sistemlerinde adenzilkobalaminine bağımlı tek enzim metilmalonil-KoA mutazdır. Adenzilkobalamin bağımlı metilmalonil-KoA Mutaz mitokondriyal matrikste bulunur (29). Bu kofaktörün yokluğunda metilmalonil-KoA ve prekürsörü olan propiyonil-KoA'nın dokudaki düzeyleri belirgin olarak artar.

2.1.4. Vitamin B12 Eksikliğinin Nedenleri

Vitamin B12 emilimi göreceli olarak karmaşık bir süreçtir. Emilim basamaklarında bozulan herhangi bir mekanizma sonucu B12 vitamini eksikliği gelişir. Eksikliğin nedenlerine bakılacak olursa bunlardan en yaygın olanı, pernisiyöz anemi, otoimmün bir durumdur. Vitamin B12 emilimine (örneğin, bariatrik cerrahi) müdahale eden mide veya ince bağırsağın immün olmayan bozuklukları da görülebilmektedir. Aşağıdaki tabloda vitamin B12 eksikliğine neden olan faktörler özetlenmiştir.

Tablo 1. Vitamin B12 eksikliği nedenleri

Gastrik nedenler
İntrinsik faktör (İF) eksikliği (Konjenital İF mutasyonu, pernisiyöz anemi, otoimmün poliendokrinopatilere eşlik eden pernisiyöz anemi)
Gastrektomi/bariyatrik cerrahi
H.pylori gastriti /Kronik gastrit
Atrofik gastrit
İnce Barsak hastalıkları
Malabsorpsiyon sendromu
Ileal rezeksiyon / bypass
İnflamatuvar barsak hastalıkları (Crohn hastalığı)
Çölyak hastalığı disease
Bakteriyel aşırı çoğalma
Kör loop sendromu
Diphyllobothrium latum
Pankreatit
Pankreatik yetmezlik
Diyet
Vejeteryan diyet, kötü sosyoekonomik koşullar, malnütrisyon
Kötü kontrol edilen fenilketonüri
Gebelik döneminde kobalamin eksikliği veya pernisiyöz anemi
İlaçlar
Neomisin
Biguanidler(metformin)
Proton pompa inhibitörleri(omeprazol)
Histamin 2 receptor antagonistleri (simetidin)
Nitröz oksid (N ₂ O)
Kalıtsal transkobalamin 2 eksikliği

2.1.5. Vitamin B12 Eksikliğinde Görülen Klinik ve Laboratuvar Bulgular

B12 vitamini eksikliği olan birçok birey, bir veya daha fazla vitamin yetmezliğine yatkınlığı olan ilişkili bir duruma sahiptir. Bazı durumlarda bu koşullar bilinebilir ancak diğerlerinde ise B12 vitamini eksikliği tanısı konulduktan sonra geriye dönük olarak değerlendirilebilir (7). Vitamin B12 eksikliği makrositik

aneminin yaygın bir nedenidir ve nöropsikiyatrik bozuklukların bir spektrumunda rol oynar. Hiperhomosisteinemi ve aterosklerozun başlamasında vitamin B12 eksikliğinin rolü ancak günümüzde anlaşılabilmiştir (5). Diyet eksikliğinin daha az endişe duyduğu ülkelerde, aşağıdakilerden bir veya daha fazlasına sahip bir hastada vitamin B12 ve / veya folat eksikliği şüphelenebilir (30).

Açıklanamayan anemi, makrositoz (MCV>100 fL), pansitopeni veya hipersegmente nötrofiller. Açıklanamayan nörolojik veya psikiyatrik belirtiler. Uygun takviye olmadan bariatrik cerrahi, yetersiz beslenme veya katı vegan diyet gibi absorpsiyonu etkileyebilecek ilişkili durumlar. B12 vitamini eksikliği için risk altında olabilecek ve test için daha düşük bir eşikten faydalanabilecek diğer gruplar arasında tiroidit veya vitiligo gibi otoimmün rahatsızlıkları olan veya kronik metformin tedavisi alan kişiler bulunur. Vitamin B12 eksikliği boğaz ağrısı, anoreksiya veya diyare gibi mide-bağırsak belirtileri olan kişilerde düşünülebilir (30).

Vitamin B12 eksikliğinin hematolojik etkileri folat eksikliğindekilere benzer ve DNA sentezindeki bozulma neticesinde gelişir. Vitamin B12 eksikliğine bağlı hematolojik bulguları, folat eksikliğine bağlı hematolojik bulgulardan ayırmak oldukça güçtür. Hastaların en sık başvuru nedeni anemi ile ilgili semptomlardır. Anemiye atfedilebilecek semptomların varlığı, B12 vitamini eksikliğin oranına, eksikliğin şiddetine, hemogloblin düzeyine ve kişinin genel sağlığına bağlıdır (20). B12 vitamini veya folat eksikliği olan birçok bireyde anemiye (en azından kısmen) bağlı olabilecek belirsiz veya spesifik olmayan semptomlar (örn, yorgunluk, sinirlilik, bilişsel gerileme) vardır. Bu durum, kemik iliğinde kırmızı kan hücresi öncüllerinin hızlı bir şekilde bölünmesinden ve dolayısıyla bu vitaminler yetersiz olduğunda ortaya çıkan nükleik asitlerin yokluğuna bağlıdır. Anemi ağır ise yahut bireyin iskemik kalp hastalığı altında olması durumunda doku hipoksisine ve organ iskemisine (örn. göğüs ağrısı, nefes darlığı) ikincil semptomlar görülebilir. Bununla birlikte, anemi tipik olarak B12 vitamini eksikliğinde yavaş yavaş gelişir ve telafi edici mekanizmalar, çarpıntı, sersemlik ve nefes darlığı gibi doku hipoksisine bağlı semptomları hafifletebilir (20). Daha şiddetli anemisi olan bireyler de deride solgunluk olabilir ve hemoliz nedeniyle hafif sarılık ile kombine edildiğinde, bu durum cildin "tuhaf bir limon-sarı rengi" olmasına neden olabilir (20).

Tam kan sayımı yapıldığında anemiye eşlik eden makrositoz var ise B12 vitamini eksikliğinden şüphelenilir. Ancak, tam kan sayımı tek başına tanısal bir tetkik olarak kabul edilmez. Eşlik eden demir eksikliği anemisi, talasemi taşıyıcılığı veya inflamatuvar hastalıkların bulunması halinde normositer ve hatta mikrositer değerler görülebilir (31). Megaloblastik anemi vitamin B12 eksikliğinin klasik bulgusudur fakat yapılan çalışmalarda vitamin B12 eksikliği olan kişilerde, anemi ve makrositoz bulgusunun çoğu kez olmadığı bildirilmiştir (32). Özellikle ağır eksikliklerde, lökosit ve trombosit sayısı da azalmış olarak bulunabilir. Periferik kan yayması da tam kan sayımını destekler şekilde, makrositer oval eritrositler, anizositoz, poikilositoz, şistositler ve genç miyeloid öncüller, nötrofillerde hipersegmentasyon (100 granülositte, 1 tane 6 loblu veya ≥ 5 tane 5 loblu nötrofil görülmesi) görülür (31). Retikülosit sayısı genellikle azalır. Laktik asit dehidrogenaz ve indirekt bilirubin düzeylerinde artma, haptoglobinde düşme görülür (31). Vitamin B12 eksikliğine bağlı hematolojik komplikasyonlar, vitamin verilmesi ile genellikle tamamen düzelir (32).

Vitamin B12 eksikliği olan hastalarda gastrointestinal sistem bulgularına sık rastlanır. GİS epitelini sürekli yenilenme potansiyeline sahiptir. Artmış DNA sentezi nedeniyle vitamin B12 eksikliğine son derece duyarlıdır (27). Vitamin B12 eksikliği glossite neden olabilir ve buna bağlı dilde ağrı, şişlik, kızarıklık, tat almama, Hunter dili (kırmızı-papillar atrofik dil) görülebilir (21). Malabsorbsiyona neden olan hastalıklar genellikle vitamin B12 eksikliğine de yol açar. Vitamin B12 eksikliğinin nörolojik komplikasyonları GİS'de otonomik disfonksiyona neden olabilir ve sonuçta motilite bozuklukları, anoreksi, kabızlık, diyare, iştahsızlık görülebilmektedir (27).

Nöropsikiyatrik belirtiler hem vitamin B12 hem de folat eksikliğinde mevcut olabilir. Bu bulgular en sık B12 vitamini eksikliğine atfedilse de, nörobilişsel ve diğer değişiklikler folat eksikliği ile de bildirilmiştir (8). Kesin mekanizma tam olarak bilinmese de B12 vitamini eksikliğindeki bu değişikliklerin sebebinin, B12 vitamininin nöronal miyelinyasyonda önemli olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (7). Nöropati tipik olarak simetriktir ve sıklıkla bacakları kollardan daha fazla etkiler. B12 vitamini eksikliğinde klasik nörolojik bulgu, demiyelinizasyona bağlı omurilikte dorsal (posterior) ve lateral kolonların subakut

kombine dejenerasyonudur (7). Nörolojik belirtiler aneminin süresi veya derinliği ile ilişkisizdir ve anemi olmadan da ortaya çıkabilir. Ayrıca ilerlemiş olgularda tedaviden etkilenmemeye riski de taşımaktadır. Arka kordon tutulumu vibrasyon his kusuruna yol açar. Yan kordon tutulumuna bağlı olarak da spastisite, reflekslerde hiperaktivite ve ekstansör plantar yanıtlar görülebilir.

Diğer bulgular aşağıdakilerden bir veya daha fazlasını içerebilir (7, 9).

- Depresyon veya duygudurum bozukluğu
- Sinirlilik
- Uykusuzluk
- Bilişsel yavaşlama
- Unutkanlık
- Demans
- Psikoz
- Optik atrofi ile ilişkili olabilecek görsel bozukluklar
- Periferik duyu defisitleri
- Şiddet varsa, parapleji ve inkontinans ilerleyebilir zayıflık
- Dengesizlik
- Bozulmuş titreşim hissi
- Lhermitte işareti
- Ataksi veya pozitif Romberg testi
- Anormal derin tendon refleksleri
- Ekstrapiramidal işaretler (örneğin distoni, dizartri, sertlik)
- Huzursuz bacak sendromu.

Retrospektif çalışmalar, B12 vitamini seviyeleri ile zaman içinde bilişsel işlevlerin azalması arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur, ancak nedensel bir ilişki gösterilmemiştir (33). Vitamin B12 eksikliği olan hastalarda genellikle nörogörüntüleme yapılmaz, ancak diğer şartlar için değerlendirmenin bir parçası olarak yapılırsa, B12 vitamini eksikliği olan bir bireyde omuriliğin manyetik rezonans görüntülemesi servikal ve torakal omurilikte "ters V paterni" olarak tanımlanan klasik değişiklikleri gösterebilir (34).

Vitamin B12 eksikliği ile birlikte nadirde olsa ciltte hiperpigmentasyon saptanan olgular bildirilmiştir (35). Pernisyöz anemiyle birlikte gastrik kanser riski

artışı yapılan calısmalarda gösterilmiştir (36). Diğer nadir bulgular arasında diyare, konstipasyon, meteorismus, bulantı, karın ağrısı ve splenomegali sayılabilir (37).

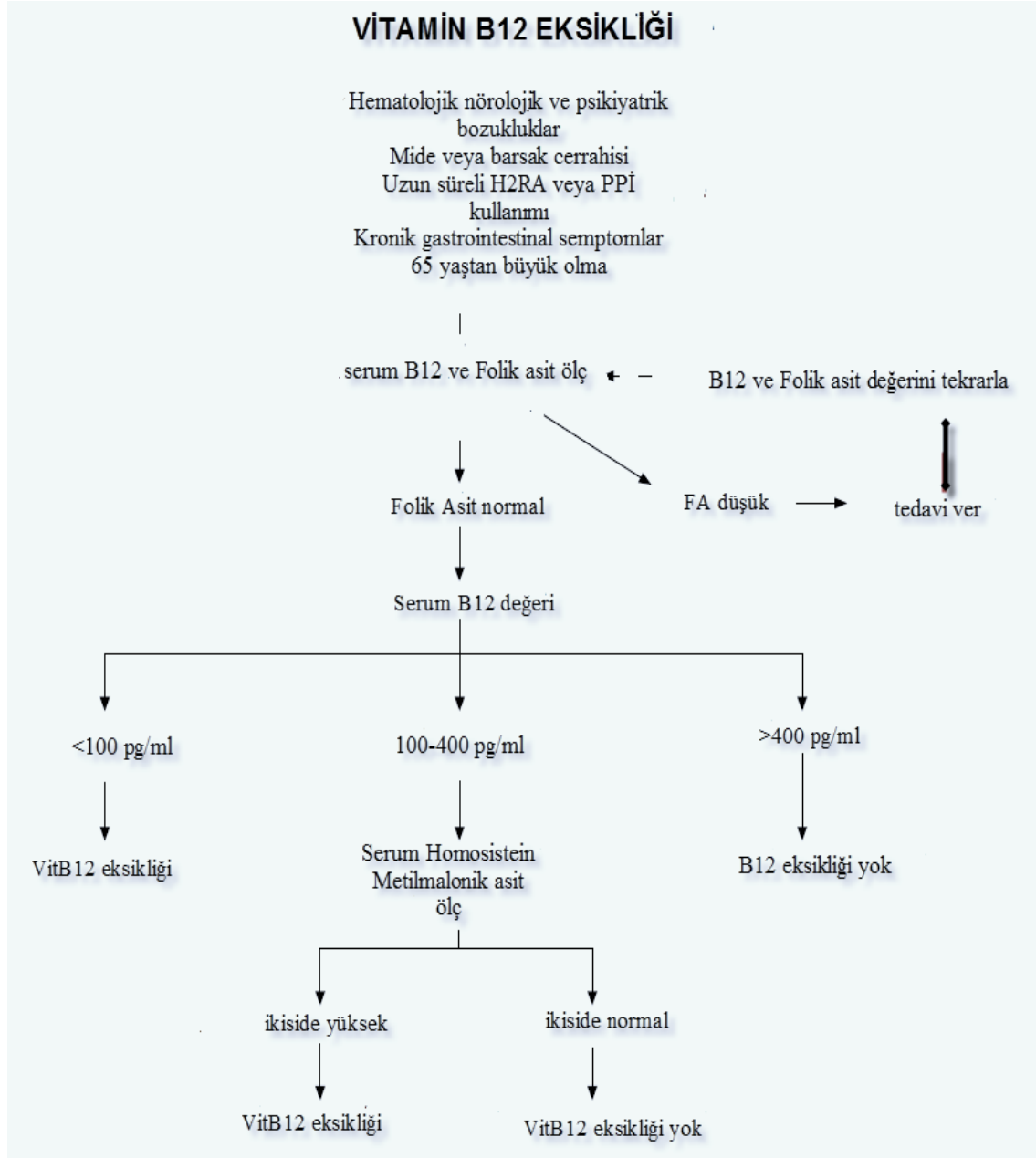
2.1.6. Vitamin B12 Eksikliğinin Tanısı

Vitamin B12 <200 pg/mL olan değerler vitamin B12 eksikliği olarak değerlendirilir (7). Bununla birlikte klinik bulguların görülebildiği durumlarda vitamin B12 değerleri normal veya alt sınırlarda bulunabilir. B12 vitamini testinin doğruluğuna ilişkin endişelerden dolayı, çoğu şüpheli eksiklik durumunda, sıklıkla ara ürün olan metilmalonik asit ve homosistein ayrıca vitamin B12 aktif formu olan holotranskobalamini ölçümü kullanılabilir (38, 39).

MMA, vitamin B12 eksikliği tanısı için sensitif ve spesifik bir markerdir. MMA, B12 vitamini eksikliğinde artmıştır ancak folat eksikliğinde bu artış görülmez. Bunun nedeni, B12 vitamininin metilmalonil-KoA'nın süksinil-KoA'ya dönüşmesinde, mitokondride meydana gelen ve metilmalonil-KoA mutaz ile katalize edilen bir kofaktör olmasıdır (40). MMA ve homosistein için normal aralıklar laboratuvar bağımlıdır; laboratuvara özgü ve analize özgü eşikler kullanılmalıdır. MMA ve homosistein normal olarak görüldüğünde B12 vitamini veya folat eksikliği olabilir. MMA ve homosistein yüksek saptandığında B12 vitamini eksikliği olabilir (folat eksikliği olasılığını ortadan kaldırmaz). MMA normal, homosistein yüksek ise B12 vitamini eksikliği yoktur ve folat eksikliği ile uyumludur (38, 39). Hem MMA hem de homosistein seviyeleri serum kreatinin konsantrasyonu ile ilişkili olduğu için böbrek yetmezliğinde de yüksek tespit edilebilmektedir (41).

Homosistein ve MMA ile birlikte holotranskobalamin düzeyi bakılarak da erken dönemde vitamin B12 eksikliği tespit edilebilir. Serum holotranskobalaminin, insanlarda kobalaminin biyolojik olarak aktif fraksiyonunu temsil ettiğinden ve ilk olarak subklinik kobalamin eksikliğinden tüketilebildiğinden, serum kobalamine göre B12 eksikliği durumlarının daha iyi bir göstergesi olabileceği uzun süredir önerilmiştir (42). Bununla birlikte, fizyolojik ve patolojik holotranskobalamin varyasyonlarının non-kobalamine bağlı belirleyicilerinin henüz tam olarak açıklığa kavuşturulmaması endişesi taşımaktadır. Transkobalamin düzeylerinin karaciğer hastalığı, makrofaj aktivasyonu ve transkobalamin otoantikör jenerasyonundan etkilendiğini gösteren bazı sınırlı veriler bulunmaktadır (43).

Vitamin B12 eksikliğinin etiyolojik nedenine yönelik yapılan eski bir testte Schilling testidir. Birkaç aşamada yapılan, uygulaması zor olan bir testtir. Günüümüzde tanısal amaçla kullanımı terkedilmiştir. Vitamin B12 eksikliğine tanısal yaklaşım aşağıdaki algoritmada özetlenmiştir.



Şekil 2. Vitamin B12 eksikliği şüphesi olan hastalarda yaklaşım (44).

2.1.7. B12 Vitamini Eksikliğinin Tedavisi

Vitamin B12 eksikliği saptanan tüm bireyler tedavi edilmelidir (21). B12 vitamini eksikliği olan bireylerin çoğu semptomların yavaş gelişmesi ile asemptomatik olarak, tesadüfi bir laboratuvar bulgusu ile saptanır. Bazı durumlarda erken müdahale etmek yararlıdır. Semptomatik anemisi olan veya nörolojik, nöropsikiyatrik bulguları olan hastalar, gelişmekte olan fetüsün etkilenebileceğinden dolayı gebe hastalar, gelişimleri etkilenebilecek yenidoğan ve bebekler öncelikli olarak tedavi edilmelidir (45).

B12 vitamini, siyanokobalamin formunda ağırlıklı olarak Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanılmaktadır ve hidroskobalamin ise ağırlıklı olarak Avrupa'da kullanılmaktadır; her ikisi de vitamin B12 eksikliğinin tedavisinde etkilidir (46). Farmakokinetikleri farklılık gösterir ve sonuç olarak, siyanokobalaminin idame dozları aylık olarak uygulanır; hidroskobalamin ise daha az sıklıkta uygulanır (46). B12 vitamini çeşitli formülasyonlarda mevcuttur ve kas içi, derin deri altı, oral veya dil altı dahil olmak üzere çeşitli yollarla uygulanabilir (46)

Parenteral tedavi genellikle oral replasmanı tolere edemeyen hastalar için kullanılmaktadır (örn. pernisiyöz anemi, malabsorbsiyon). Yetişkinler için tedaviye 1000 µg/gün/hafta olarak başlanır sonra bir ay 1000 µg/hafta dozunda tedaviye devam edilir. İdame tedavisi olarak da 1000 µg/ay şeklinde eksiklik nedeni düzeltilinceye kadar veya pernisiyöz anemi, total gastrektomi veya ileal rezeksiyon gibi sebeplerde ise hayat boyu devam edilir (31). Oral replasman vitamin B12 eksikliği düşük diyet alımına bağlı olan ve oral takviyeleri alma kapasitesine sahip olanlar için yeterlidir (46). Oral tedavi 250-1000 µg/gün 1 hafta süreyle her gün, takiben haftada 2 gün 2 hafta süreyle, sonra haftada 1 defa 1-2 hafta süreyle, en son aylık tedavi verilir. Oral tedavi yolu seçilecekse, hastanın yeterli dozu aldığından emin olmak için, periyodik B12 vitamini düzeylerinin ölçümü yapılır. Hafif-orta düzeyde B12 vitamini eksikliği olan yaşlılarda önerilir. Çocuklarda kullanım kolaylığı nedeniyle tercih edilebilir. Yüksek dozlarda verildiğinde pasif difüzyon nedeni ile pernisiyöz anemi, İmerslund-Grasbeck Sendromu gibi emilim bozukluklarında bile etkindir (31).

2.2. Nötrofil ile ilgili genel bilgiler

Nötrofiller, doğal immün yanıtın en önemli efektör hücrelerinden biridir. İnsanda, nötrofiller, en fazla bulunan doğal bağışıklık hücresidir. Periferal kanda tüm lökositlerin yaklaşık % 60-70'ini oluşturur. Hücreler, dolaşım sisteminin dışındaki enfeksiyöz veya hasarlı bölgelerden gelen enflamatuvar işaretlere hızla yanıt verir (47). Geleneksel olarak kısa ömürlü bir homojen popülasyon olarak görülürler. Hücreler esas olarak fagositoz ve hücre içi öldürme ile mikroorganizmalara karşı savunmaya karşı görevlidirler (47). Hücreler, bu fonksiyona yardımcı olan ve bir membrana bağlı NADPH oksidaz tarafından sitotoksik proteinlere ve sitoplazmada bulunan farklı granüllerde yer alan peptidlere kadar reaktif oksijen türlerinin üretilmesinden oluşan geniş bir armamentarium içerirler (48). Son zamanlarda, homojen bir hücre popülasyonuna ait olan nötrofillerin görüşüne itiraz edilmiştir ve doku onarımı, tümör öldürme ve bağışıklık regülasyonuna dahil olma gibi özel fonksiyonlar sergileyen çeşitli nötrofil fenotipleri tarif edilmiştir (47). Bu hücrelerin, kemik iliğinden kaynaklanan ayrı paralel soylara ait olup olmadıkları ya da uzak dokularda nötrofillerin bilgilendirildiği ve böylece fenotiplerinin değiştirilip değiştirilmediği açık değildir. Ayrıca, nötrofil fenotipinin fenotipik olarak homojen bir popülasyonunda fonksiyonel heterojenite, nötrofil fenotipinin karmaşıklığına katkıda bulunur (49).

Nötrofillerde hipersegmentasyon ilk olarak 1904 'te Arneth tarafından tanımlanmıştır (50). Arneth'e göre, nötrofillerin segmentasyonu, hücre olgunlaşması sırasında artar. Bu nedenle, segmentlerin sayısı, hücrenin bir yaş indeksi olarak hizmet edebilir. 100 granülositte, 1 tane 6 loblu veya ≥ 5 tane 5 loblu nötrofil görülmesi hipersegmente nötrofiller olarak tanımlanmıştır (51, 52).

3. MATERYAL ve METOD

Çalışmanın Tasarımı

Prospektif çalışma olarak tasarlanan bu çalışmanın protokolü Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na sunularak 10.04.2018 tarihinde (Karar numarası: GO 18/363-13) onay alındı.

Araştırmaya Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'ne Nisan 2018–Eylül 2018 tarihleri arasında başvuran, B12 vitamin eksikliği saptanan erişkin hastalar ve sağlıklı kontrol bireyleri dâhil edildi.

Vakaların cinsiyet, yaş, vitamin B12, folik asit, homosistein, LDH, hemoglobin, hematokrit, MCV, lökosit, trombosit, ferritin, demir, demir bağlama, transferrin saturasyonu, antiparietal antikor pozitifliği değerlendirildi. Periferik yaymalarında nötrofil lob ve segment sayımı yapıldı.

Katılımcılar

Çalışmaya dâhil edilme ve dışlama kriterleri aşağıda tanımlandığı şekildedir.

Hasta grubu için çalışmaya dâhil edilme kriterleri

- Vitamin B12 düzeyinin Hastanemiz Biyokimya Laboratuvarının referans aralığından (126-400 pg/ml) düşük (< 126 pg/ml) olması.
- Tanı anında 18 yaş ve üzerinde olmak
- Tanı anında vitamin B12 replasmanı almıyor olmak

Hasta grubu için çalışmadan dışlama kriterleri

- Tanı anında 18 yaşın altında olmak
- Anti-neoplastik ilaç kullanıyor olmak
- Tanı anında vitamin B12 replasmanı alıyor olmak
- Tanı anında folik asit eksikliği (< 3 ng/ml) olması
- Tanı anında enfeksiyonu olmak
- Böbrek yetmezliği olmak veya > 1 gr/gün proteinüri olmak
- Kronik karaciğer hastalığı olmak

Kontrol grubu için çalışmaya dahil edilme kriterleri

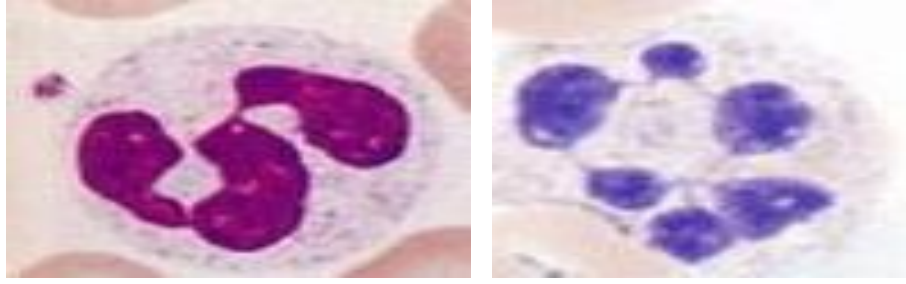
- Vitamin B12 düzeyi > 250 pg/ml olmak
- Tanı anında 18 yaşın üstünde olmak
- Anti-neoplastik ilaç kullanmıyor olmak

Kontrol grubu için çalışmadan dışlanma kriterleri

- Vitamin B12 düzeyi <250 pg/ml olmak
- Tanı anında 18 yaşın altında olmak
- Anti-neoplastik ilaç kullanıyor olmak

Kontrol vakaları çoğunluğu sağlıklı hastane personeli olmak üzere, poliklinik başvurusunda klinik endikasyonla vitamin düzeylerine bakılmış ancak eksiklik saptanmayan sağlıklı gönüllerden oluşmaktadır.

Vitamin B12 eksikliği tespit edilen hastaların ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyet bilgileri, tam kan sayımı değerleri, serum demir, serum demir bağlama kapasitesi, ferritin, homosistein değerleri, antipariyetal antikor varlığı hastane elektronik kayıt sisteminden ve hasta dosyalarından elde edildi. Demir eksikliği inflamasyon gibi başka bir nedene bağlanamayan transferrin saturasyon düşüklüğü ile tanımlandı. Hastaların nötrofil lob sayımları, Wright boyası ile boyanmış periferik kan hücreleri üzerinde gerçekleştirildi. Tez asistanı (HÖ) ve danışman (YB) tarafından aynı anda çift gözlü mikroskop kullanılarak görüntülendi. Her bir periferik yayma örneğinde 20 adet nötrofilde lob ve segment sayıları sayıldı. Ayrı bir segment loblar arasında ince filament var ise sayıldı. Loblar ise en az 2/3 oranında boğumlanmış kromatin ile ayrılmış çekirdek bölgeleri olarak tanımlandı. Herhangi bir şüphe varsa, ayrı bir lob mevcut olarak kabul edilmedi. Nükleer bölümlerin sayısının belirsiz olduğu katlanmış nükleuslu hücreler dışlandı.



Şekil 3. Nötrofil lob ve segment görünümleri. Soldaki resim 2 segment, 3 loblu nötrofil; sağdaki resim 6 segment, 6 loblu nötrofil

B12 eksikliği gruplarının tanımlanması

Grup 1 (aşikâr B12 vitamin eksikliği olanlar): Bu gruptaki hastalar vitamin B12 eksikliği saptanmış ve anemisi olan hastalardır. Homosistein düzeyi normal veya yüksek olabilir. APA pozitif veya negatif olabilir.

Grup 2 (subklinik B12 eksikliği olup, sadece homosistein yüksek olanlar): Bu gruptaki hastalar vitamin B12 düzeyi düşük (< 126 pg/ml), anemileri olmayan ve homosistein düzeyi yüksek olan hastalardır.

Grup 3 (subklinik B12 eksikliği olup sadece APA (+) olanlar): Bu gruptaki hastalar vitamin B12 düzeyi < 126 pg/ml olan, anemileri olmayan ve sadece anti-pariyetal antikor pozitifliği mevcut olan hastalardır.

Grup 4 (subklinik B12 eksikliği olup homosistein yüksek ve APA (+) olanlar): Bu gruptaki hastalar vitamin B12 düzeyi < 126 pg/ml olan, anemileri olmayan, homosistein düzeyleri yüksek ve anti-pariyetal antikor pozitifliği mevcut olan hastalardır.

Grup 5 (diğer): Bu gruptaki hastalar B12 düzeyi < 126 pg/ml olup, hemoglobin ve homosistein düzeyi normal ve anti-pariyetal antikor negatif olan hastalardır.

Kontrol grubu: Vitamin B12 düzeyi > 250 pg/ml olan sağlıklı gönüllülerdir.

4. İSTATİKSEL ANALİZ

Kategorik tanımlayıcı veriler oran olarak sunuldu ve ki-kare testi ile karşılaştırıldı. Sayısal veriler ortanca veya ortalama (\pm standart sapma) olarak ifade edildi ve ANOVA testi veya Student t testi ile kıyaslandı. Post-hoc analiz ile gruplar arası kıyaslamalar yapıldı. Maksimum lob ve segment sayılarının değişik vitamin B12 eksiklik gruplarını belirlemedeki duyarlılık ve özgüllükleri ki-kare testi ile incelendi. Vitamin B12 eksikliğini belirlemek için en uygun lob ve segment eşik değerleri ROC analizi ile belirlendi.

Tüm istatistiksel analizler için, Statistical Packages for the Social Sciences versiyon 24.0 programı kullanıldı. İstatistiksel anlamlı düzeyi $p < 0.01$ olarak kabul edildi.

5. BULGULAR

Çalışmaya toplam 45 hasta ve 50 sağlıklı gönüllü alındı. Değişik hasta gruplarının ve kontrol vakalarının başlıca demografik ve laboratuvar sonuçları tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Değişik hasta gruplarının ve kontrol vakalarının başlıca demografik ve laboratuvar sonuçları

	Sayı	Kadın/ Erkek	Yaş	B12	Hcs	APA + (n)	Hb	BK	Tr	Folat
Grup 1	13	9 / 4	63 (34-81)	99 (59-125)	22 (7-196)	9	10 (6-12)	7 (9,8-10)	270 (159-561)	6 (3,6-22)
Grup 2	12	9 / 3	44 (19-74)	109 (65-122)	18.8 (15-44)	-	13.9 (12.5-16)	6.6 (5.4-8.1)	244 (163-362)	6 (3,9-9)
Grup 3	1	1 / -	37	88	10	1	14	10	226	11
Grup 4	3	- / 3	51 (49-68)	76 (65-88)	22 (17-25)	3	13.6 (13-16)	7,1 (5.8-8.4)	218 (99-299)	8 (7-12)
Grup 5	16	10 / 6	46 (19-68)	108 (72-121)	11 (3-13)	-	12.5 (12,5-15.7)	5.8 (4,2-5,8)	280 (193-521)	7.6 (5-15)
Kontrol	50	34 / 16	38,5 (20-73)	305 (255-670)	-	-	13.6 (13-16)	7.8 (4,3-8,8)	237 (150-400)	7.1 (4-16)
Toplam	95	63 / 32	-	-	-	13	-	-	-	-

Numerik değerler ortanca (minimum-maksimum) olarak ifade edilmiştir. Hcs: Homosistein, Hb: Hemoglobin, BK: Beyaz küre, Tr: Trombosit. Grup 1: Aşık B12 eksikliği, Grup 2: Subklinik eksiklik, sadece homosistein yüksek, Grup 3: Subklinik eksiklik, sadece APA pozitif, Subklinik eksiklik, homosistein yüksek ve APA pozitif, Grup 4: Subklinik eksiklik, homosistein yüksek ve APA pozitif, Grup 5: Subklinik eksikliği, homosistein ve APA normal.

Grup 1, 2, 3, 4, 5 ve kontrol grubunda sırasıyla 13, 12, 1, 3, 16 ve 50 birey vardı. Hasta ve kontrollerin cinsiyet dağılımları benzerdi. Kontrol vakaları daha genç bireylerden oluşmuştu (hasta ortalama 49.4±16.9 yıl ve kontrol ortalama 39.3 ± 13 yıl, p=0.05). B12 eksikliği 1, 2 ve 5. gruplarında eşlik eden demir eksikliği sırasıyla 9, 3, 7 vakada vardı. Grup 3 ve grup 4'te eşlik eden demir eksikliği yoktu. Hastalarda ve kontrol grubunda folik asit eksikliği saptanmadı. Tüm gruplarda beyaz küre sayıları ve trombosit sayılarının normal aralıkta olduğu görüldü. Değişik hasta grupları ve kontrol grubuna dâhil bireylerin nötrofil lob ve segment özellikleri ise tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Gruplara göre Nötrofil lob ve segment dağılımları

Grup	Nötrofil lob Ortanca (min – maks)	Nötrofil lob Ortalama±standart sapma	Nötrofil segment Ortanca (min – maks)	Nötrofil segment Ortalama±standart sapma
Grup 1 nötrofiller (n=260)	3,0 (2-6)	3,44 (± 0,8)	2,0 (0-5)	2,18 (±1,1)
Grup 2 nötrofiller (n=240)	3,0 (2-6)	3,3 (± 0,9)	2,0 (0-5)	2,04 (± 1,2)
Grup 3 nötrofiller (n=20)	3,0 (2-5)	3,2 (± 0,8)	3,0 (0-5)	2,95 (±1,1)
Grup 4 nötrofiller (n=60)	3,0 (2-8)	3,3 (± 1)	2,0 (0-4)	2,0 (± 1,1)
Grup 5 nötrofiller (n=320)	3,0 (2-6)	3,2 (± 0,8)	2,0 (0-5)	2,4 (± 0,9)
Kontrol nötrofiller (n=1000)	3,0 (0-5)	2,8 (± 0,7)	2,0 (0-5)	2,4 (± 0,8)

Lob ve segment değerleri ortanca (minimum-maksimum) ve ortalama (±standart sapma) olarak ifade edilmiştir.

Grup 1: Aşık B12 eksikliği, **Grup 2:** Subklinik eksiklik, sadece homosistein yüksek, **Grup 3:** Subklinik eksiklik, sadece APA pozitif, **Grup 4:** Subklinik eksiklik, homosistein yüksek ve APA pozitif, **Grup 5:** Subklinik eksikliği, homosistein ve APA normal.

Ortalama lob sayıları aşikar B12 eksikliği ($3,44 \pm 0,8$), subklinik eksiklik ($3,3 \pm 0,9$), kontrol grubu ($2,8 \pm 0,7$) sırasına göre azalırken, segment sayıları ortalama veya ortanca değerleri böyle bir eğilim göstermiyordu.

Aşikar B12 eksikliği saptanan hastaların (grup 1) toplam 260 nötrofil değerlendirildiğinde bunlarda en sık 3 loblu ve 3 segmentli nötrofil olduğu görüldü. %10'unda 5 ve 6 loblu nötrofil saptandı yine bu nötrofillerin segment sayısına bakıldığında yalnızca %1,2 oranında 5 segmentli nötrofil olduğu izlendi.

Subklinik B12 eksikliği olup sadece homosistein düzeyi yüksek saptanan hasta grubunun (grup 2) toplam 240 nötrofil değerlendirildiğinde bunlarda en sık 3 loblu ve en sık 2 segmentli nötrofil olduğu izlendi. % 10 unda lob sayısı 5 veya 6 olarak bulundu (ortalama: $3,3 \pm 0,9$). Segment sayısına bakıldığında %0,9 oranında 5 segmentli nötrofil olduğu izlendi.

Subklinik B12 eksikliği olup sadece anti-parietal antikor pozitifliği saptanan hastanın (grup 3) toplam 20 nötrofil değerlendirildiğinde bunların %10 unda lob sayısı 5 ve %10 oranında segment sayısı 5 olduğu görüldü.

Subklinik B12 eksikliği olup homosistein yüksek ve antiparietal antikor pozitif saptanan hasta grubunda (grup 4) toplam 60 nötrofil değerlendirildi. Bunlarda en sık 3 loblu ve en sık 2 segmentli nötrofil görüldü. Nötrofillerin %10'unda lob sayısı 5 ve üstü olarak belirlendi. Bu hasta grubunda 5 ve üzeri segment sayısında nötrofil izlenmedi.

B12 değeri $<126\text{pg/ml}$, hemoglobin ve homosistein normal ve APA negatif olan hasta grubunda (grup 5) toplam 320 nötrofil değerlendirildi. Bunlarda en sık 3 loblu ve 2 segmentli nötrofil saptandı. Nötrofillerin %7'sinde lob sayısı 5 veya üstü olarak sayıldı. Bu hasta grubunda %0,9 oranında 5 segment sayılı nötrofil olduğu görüldü.

Kontrol grubunda ise toplam 1000 nötrofil değerlendirildi. Bunlarda en sık 3 loblu ve 2 segmentli nötrofil sayıldı (ortalama: $2,8 \pm 0,7$).Sadece 3 adet nötrofilde lob sayısı 5 ve 1 adet nötrofilde segment sayısı 5 olarak sayıldı.

Tablo 4. Lob sayıları açısından grupların kıyaslandığı ANOVA testi

		Sum of Squares	df	Ortalama Square	F	sig
Lob_sayısı	Gruplar arası	128,895	5	25,779	38,940	,000
	Gruplar içinde	1253,852	1894	,662		
	Total	1382,747	1899			

Tablo 5. Lob sayıları açısından grupların kıyaslandığı ANOVA testinin post-hoc analizi

	Aşikar B12 eksikliği (p)	Subklinik B12 eksikliği Hcs Yüksek (p)	Subklinik B12 eksikliği APA + (p)	Subklinik B12 eksikliği Hcs yüksek APA +(p)	Diğer (p)	Kontrol (p)
Aşikar B12 eksikliği (p)	-	0,71	0,79	0,87	0,02	0,00
Subklinik B12 eksikliği Hcs Yüksek (p)	0,71	-	0,98	1,00	0,62	0,00
Subklinik B12 eksikliği APA + (p)	0,79	0,98	-	0,99	1,00	0,29
Subklinik B12 eksikliği Hcs yüksek ,APA+ (p)	0,87	1,00	0,99	-	0,93	0,00
Diğer (p)	0,02	0,65	1,00	0,93	-	0,00
Kontrol (p)	0,00	0,00	0,29	0,00	0,00	-

Grup1:Aşikar B12 eksikliği **Grup2:**Subklinik B12 eksikliği Hcs Yüksek **Grup3:**Subklinik B12 eksikliği APA+ **Grup4:**Subklinik B12 eksikliği Hcs yüksek APA+ **Grup5:**Diğer **Grup6:**Kontrol

Gruplar lob sayısı açısından karşılaştırıldığında aşikâr B12 eksikliği ile kontrol grubu arasında (p: 0,00) istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü. Subklinik B12 eksikliği saptanıp sadece homosistein yüksekliği saptanan grubun yine sadece kontrol grubuyla arasında istatistiksel anlamlı fark bulundu (p:0,00).

Subklinik B12 eksikliği saptanıp sadece APA(+) saptanan grupta (Grup 3) ise diğer gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı. Grup 3'ün kontrol grubuyla arasında anlamlı fark olmamasının nedeni sadece bir hasta (20 nötrofil) içermesi olabilir. Grup 4 ve grup 5'e bakıldığında ise yine sadece kontrol grubuyla aralarında istatistiksel anlamlı fark olduğu görüldü (p:0,00).

Hasta ve kontrol arasında segment farklılıklarına bakıldığında vitamin B12 eksikliğini saptamada segment sayısının > 4 olması en iyi sensitivite (%20) ve özgüllük (%97) sahip olarak tespit edildi (p:0,005)

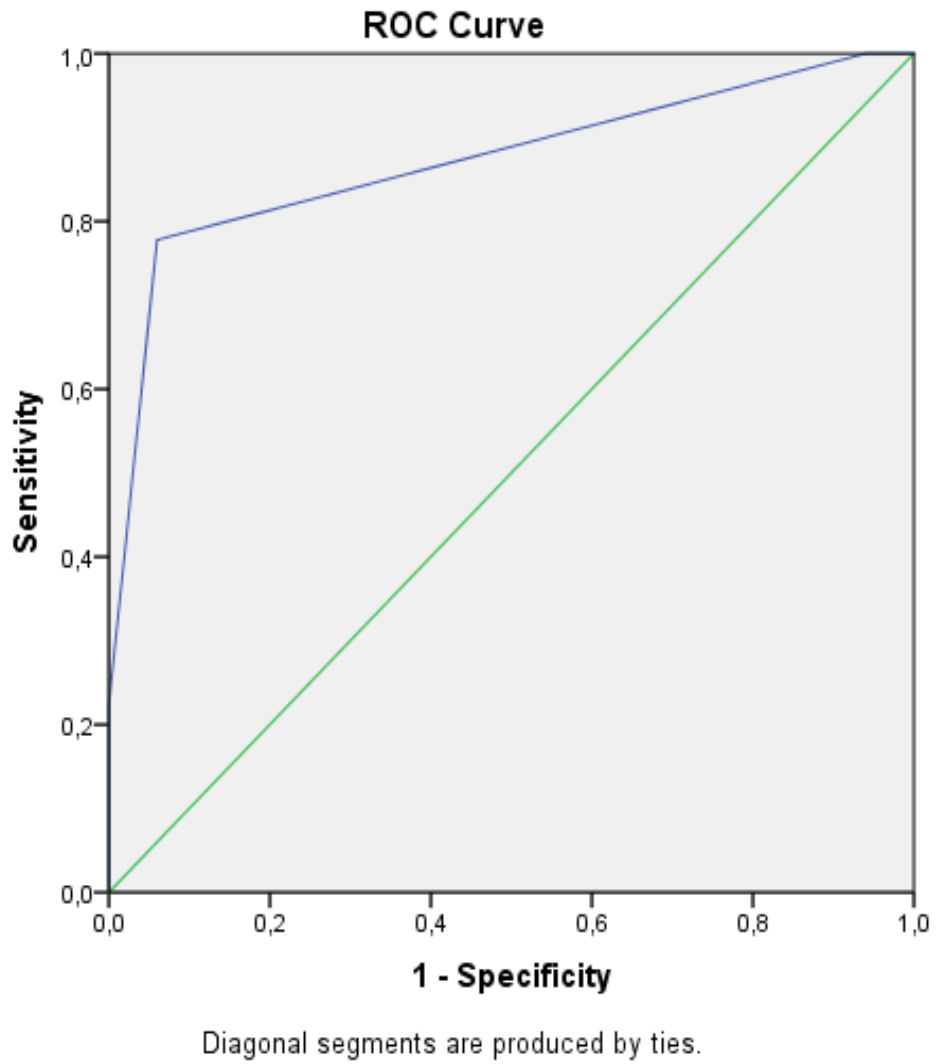
Tablo 6. Hasta – kontrol segment sayısı >4

	Segment > 4		Total
	Hayır	Evet	
Hasta	36	9	45
Kontrol	49	1	50
Total	85	10	95

Hasta ve kontrol arasında lob farklılıklarına bakıldığında ise vitamin B12 eksikliğini saptamada yine lob sayısının > 4 olması en iyi sensitivite (%75) ve spesifiteye (%94) sahip olduğu görüldü (p:0,00) .

Tablo 7. Hasta – kontrol lob sayısı > 4

	Lob > 4		Total
	Hayır	Evet	
Hasta	11	34	45
Kontrol	47	3	50
Total	58	37	95



Şekil 4. Nötrofil loblarının B12 eksikliği saptamada özgüllük ve duyarlılığı

En doğru lob eşik değerini bulmak için ROC analizi yapıldığında > 4 eşik değeri en uygun duyarlılık (% 77,8) ve 1-özgüllük (% 6) değerine sahip olduğu görüldü.

6. TARTIŞMA

Nötrofiller, doğal immün yanıtın en önemli efektör hücrelerinden biridir. İnsanda, nötrofiller periferik kanda tüm lökositlerin yaklaşık% 60-70'ini oluşturur. Hücre büyüklüğü 10–15 mikron arasında değişir. Çekirdek/sitoplazma oranı çekirdek lehinedir. Çekirdekler birbirine ince kromatin iplikçikleri ile bağlanan 2–4 segmentten meydana gelir (48). Literatürde nötrofil lob ve segment aynı anlamda kullanılmaktadır ancak çalışmamızda yeni bir tanımlama yapıldı. Segment her iki lobun ince bir kromatin ağ ile ayrıldığına sayıldı, loblar ise en az 2/3 oranında boğumlanmış kromatin ile ayrılmış çekirdek bölgeleri olarak tanımlandı.

Periferik kandaki nötrofillerin hipersegmentasyonu uzun zamandır (Arreth,1907) megaloblastik aneminin karakteristik bir özelliği olarak kabul edilmiştir ve insanlarda deneysel olarak diyet folat eksikliği indüklendiğinde, aneminin gelişmesinden önce genellikle ortaya çıkmıştır (53). Nötrofil hipersegmentasyonu, 100 granülositte, 1 tane 6 loblu veya ≥ 5 tane 5 loblu nötrofil görülmesi olarak tanımlanmıştır. Nötrofil hipersegmentasyonu bozulmuş DNA senteziyle ilgilidir (22). Nötrofilde hipersegmentasyonun görülebildiği başlıca durumlar; vitamin B12 eksikliği, folat eksikliği, hidroküre, metotreksat vb. hücre döngüsünü etkileyen kemotöropatik ilaç kullanımınıdır.

Vitamin B12, folik asit ile birlikte DNA sentezinde önemli bir koenzim ve kofaktör olarak görev yapar ve normal hematopoezin sürdürülmesi için gereklidir. Vitamin B12 düzeyi <200 pg/ml eksiklik olarak tanımlanır (7). Bununla birlikte klinik bulguların görülebildiği durumlarda vitamin B12 değerleri normal veya alt sınırlarda bulunabilir. B12 vitamini testinin doğruluğuna ilişkin endişelerden dolayı, çoğu şüpheli eksiklik durumunda, sıklıkla ara ürün olan metilmalonik asit ve homosistein ayrıca vitamin B12 aktif formu olan holotranskobalamin ölçümü kullanılabilir (38). Her ne kadar günümüzde çoğu klinisyen laboratuvar ölçümlerini kullansa da vitamin B12 eksikliğini saptanmasında periferik yayma uzun yıllardır kullanılmaktadır. Laboratuvar ve klinik veriler B12 eksikliği düşündürmediğinde dahi periferik yaymadaki hücresel değişiklikler B12 eksikliğine tanı konulmasında yardımcı olabilmektedir.

Hipersegmentasyonun aşikâr B12 eksikliği tanısındaki önemi tarihsel olarak teyit edilmiştir. Ancak günümüzde B12 eksikliği ile ilgili senaryo belirgin olarak değişmiştir. Artık hastaların çoğu anemi ve/veya nörolojik bozukluk gelişmeden, subklinik eksiklik aşamasında belirlenebilmektedir. Bu şekilde subklinik eksiklik olan hastalarda nötrofil hipersegmentasyonu ve lobasyonunun tanısal değeri literatürde yeterince üstünde durulmuş konular değildir. Biz bu çalışmada subklinik eksiklik olan hastalarda segment sayısının yeterince duyarlı ve ayırt ettirici olmadığını belirledik. Buna karşılık lob sayısı aşikâr eksiklik, subklinik eksiklik, kontrol grubu sırasına doğru gittikçe azalıyordu. 4'ün üstünde lob varlığının B12 eksikliği için en uygun duyarlılık ve özgüllük taşıdığını saptadık.

Yapılan bir çalışmada hipersegmentasyonun değişmez bir bulgu olup olmadığını belirlemek için, megaloblastik anemisi olan 357 hastanın vaka kayıtlarını kemik iliği ve periferik kan yaymaları incelenmiştir (53). 357 hastanın 351'inde (% 98.3), periferik yaymada, 100 hücre başına altı veya daha fazla segmentte en az bir PMN olduğu bulunmuştur. Anemi şiddeti ile hipersegmentasyon varlığı arasında ilişki bulunamamış ve hipersegmentasyon anemisi olmayan 15 hastanın hepsinde saptanmıştır (53). Bizim çalışmamızda aşikâr B12 eksikliği vakalarında hipersegmentasyonun duyarlı bir bulgu olarak saptamayışımızın nedeni bu hastaların çoğunda eşlik eden ve belki de aneminin temel nedeni olan demir eksikliği bulunması olabilir.

Yaşlı popülasyonunda B12 eksikliğinde görülen klinik ve laboratuvar bulguları araştıran bir çalışmada serum vitamin B12 düzeyleri, erkek ve kadınlarda medyan yaşı 77 olan, 56-84 yaş aralığında 378 hastada taranmıştır (54). Hastaların toplam 26'sında düşük B12 serum seviyeleri saptanmıştır. Hastaların diyeti gözden geçirilmiş alım eksikliğine rastlanmamıştır. Çalışmaya katılan düşük B12 düzeyi olan yaşlı hastalarda megaloblastik anemi saptanmamış, hematokrit ve MCV'sinin normal sınırlar içinde olduğu görülmüştür. Periferik yaymaları incelenmiş ve nötrofil segment sayımı yapılmıştır. Hipersegmente nötrofil görülmemiş ve ortalama segment sayımı normal sınırlarda saptanmıştır (54). Bu çalışmada hastalar bizim çalışmamızdaki grup 5'te tanımlanan subklinik B12 eksikliği olup homosistein ve APA (-) saptanan hastalara benzer özelliktedir. Dolayısıyla segment sayısı açısından sonuçlar bizim çalışmamızla uyumludur. Bu çalışmada lob sayımıyla segment sayımı

eş anlamlı kullanılmıştır. Biz lob sayısı artışını subklinik B12 eksikliğinde de belirledik.

Periferik yaymada hipersegmentasyon izlenen fakat makrositoz bulguları olmayan, B12 vitamini ve folat eksikliği olmayan 150 hastanın incelendiği bir çalışmada hipersegmente nötrofil varlığı demir eksikliği anemisinde ve aynı zamanda normositik normokromik anemide de görülmüştür (55). Megaloblastozda görülen ve nötrofilin hipersegmentasyonu ile sonuçlanan morfolojik değişiklikler için kabul edilen mekanizma, kobalamin veya folat eksikliğiyle ilişkili bozulmuş DNA senteziyle ilişkilidir. Bu çalışmada ise nötrofil hipersegmentasyonunun B12 vitamini folat eksikliği anemilerine özgü olmadığını ve sıklıkla demir eksikliğinde de gözlendiğini göstermektedir (55). Demir eksikliği anemisi ile nötrofil hipersegmentasyonunu arasındaki ilişkiyi araştıran bir diğer çalışmada ise demir eksikliği anemisi olan 102 hasta ve 21 sağlıklı kontrol grubu alınmıştır (56). Demir eksikliği anemisi için tüm rutin testler yapılmış, serum folat ve kobalamin düzeyleri normal olarak ölçülmüş. Hipersegmentasyon anemik hastaların% 30.4'ünde ve kontrollerin %9.5'inde saptanmış ($p < 0.05$)(56). Bu sonuçlar nötrofil hipersegmentasyonunun demir eksikliği anemisi olan hastalarda da görülebildiğini öngörmektedir. Ağır demir eksikliği folat veya vitamin B12'nin hücresel düzeyde kullanımını bozabilir(57). Demirin nötrofil DNA sentezini etkileyip etkilemediği kesin olarak bilinmemektedir

Günümüzde bazı literatür verilerine bakıldığında her ne kadar mekanizması tam olarak anlaşılmasa da demir eksikliğinin de hipersegmentasyona yol açabileceği bilinmektedir. Çalışmamızda aşikâr B12 eksikliği olan grupta, B12 vitamin eksikliğine eşlik eden eş zamanlı demir eksikliği de mevcuttu. Hastaların anemisinin B12 eksikliğinden veya demir eksikliğinden ötürü olabileceği durumu çalışmamızda kısıtlılık oluşturdu. Bu durum hastaların aşikâr B12 eksikliği değerlendirmesini de olumsuz etkilemiş olabilir. Çalışmamızda bazı gruplarda hasta sayısının az olması (grup 3'te 1 hasta) yine özellikle segment değerlendirilmesi açısından kısıtlılık oluşturmuştur.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda toplam 45 hasta ve 50 sağlıklı gönüllünün periferik yaymaları incelendi. Aşık B12 eksikliği olan hastaların en fazla lobasyon oranına sahip olduğu görüldü ve bu oran subklinik B12 eksikliği, kontrol grubuna doğru gittikçe azalıyordu. Segmente bakıldığında ise en fazla segment oranına subklinik B12 eksikliği saptanan homosistein yüksek APA + olan grupta saptandı. Segment sayımında lobasyon da olduğu gibi aşık B12 eksikliğinden başlayarak subklinik B12 eksik gruplar ve kontrol grubu sırasıyla eşlik eden benzer korelasyon izlenmedi. Üstelik segment sayısı kullanılması B12 eksikliği tanısı için düşük duyarlılık (%20) düzeyi gösteriyordu. 4 lob eşik değer kabul edildiğinde, bunun üstünde lob sayısı varlığının B12 eksikliği saptamada en uygun duyarlılık (%75) ve özgüllüğe (%94) haiz olduğu belirlendi.

Vitamin B12 eksikliği araştırılırken hastanın klinik değerlendirilmesi ve laboratuvar testleri ile birlikte periferik yayma incelemesinin de yapılması klinisyene fayda sağlayacaktır. Günümüzde subklinik dönemde vitamin B12 eksikliğinin çok sık teşhis edilmesi nedeniyle hipersegmentasyon ve hiperlobasyona yeni tanım getirilmesi gerekmektedir. Literatür incelendiğinde vitamin B12 eksikliğinde nötrofil lobasyon ve segmentasyondaki değişimlerin güncel olarak üzerinde durulmadığı görüldü. Subklinik dönemdeki hastalarda nötrofil segment ve lob değişimlerinin izlenmesi açısından prospektif daha geniş çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

8. KAYNAKLAR

1. O'Leary F, Samman S. Vitamin B12 in health and disease. *Nutrients*. 2010;2(3):299-316.
2. Carmel R, Green R, Rosenblatt DS, Watkins D. Update on cobalamin, folate, and homocysteine. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2003:62-81.
3. Ingram C, Davidoff A, Marais E, Sherman G, Mendelow B. Evaluation of DNA analysis for evidence of apoptosis in megaloblastic anaemia. *British journal of haematology*. 1997;96(3):576-83.
4. Ankar A, Bhimji SS. Vitamin B12 Deficiency (Cobalamin). *StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing*; 2018.
5. Oh R, Brown DL. Vitamin B12 deficiency. *American family physician*. 2003;67(5):979-86.
6. Tran PN, Tran MH. Cobalamin deficiency presenting with thrombotic microangiopathy (TMA) features: A systematic review. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*. 2018;57(1):102-6.
7. Stabler SP. Clinical practice. Vitamin B12 deficiency. *The New England journal of medicine*. 2013;368(2):149-60.
8. Reynolds EH. The neurology of folic acid deficiency. *Handbook of clinical neurology*. 2014;120:927-43.
9. Green R, Datta Mitra A. Megaloblastic Anemias: Nutritional and Other Causes. *The Medical clinics of North America*. 2017;101(2):297-317.
10. Shipton MJ, Thachil J. Vitamin B12 deficiency - A 21st century perspective. *Clinical medicine (London, England)*. 2015;15(2):145-50.
11. Kimyası G. Vitaminler ve Mineraller. Saldamlı İ, editor 2017. 441 p.
12. Scott JM. Bioavailability of vitamin B12. *European journal of clinical nutrition*. 1997;51 Suppl 1:S49-53.
13. Kräutler B. Vitamin B12: chemistry and biochemistry. Portland Press Limited; 2005.
14. Üstdal M KL, Testereci H, Kuş S, Paşaoğlu H, Türköz Y,. *Biyokimya 1 Baskı* Ankara, Pelikan Yayıncılık. 2005:841-98.
15. Dharmarajan TS, Norkus EP. Approaches to vitamin B12 deficiency. Early treatment may prevent devastating complications. *Postgraduate medicine*. 2001;110(1):99-105; quiz 6.
16. Stabler SP, Allen RH. Vitamin B12 deficiency as a worldwide problem. *Annual review of nutrition*. 2004;24:299-326.

17. Institute of Medicine Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference I, its Panel on Folate OBV, Choline. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. Washington (DC): National Academies Press (US) National Academy of Sciences.; 1998.
18. Intakes IoMSCotSEoDR. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline: National Academies Press (US); 1998.
19. Kapadia CR. Vitamin B12 in health and disease: part I--inherited disorders of function, absorption, and transport. *The Gastroenterologist*. 1995;3(4):329-44.
20. Green R. Vitamin B12 deficiency from the perspective of a practicing hematologist. *Blood*. 2017;129(19):2603-11.
21. Devalia V, Hamilton MS, Molloy AM. Guidelines for the diagnosis and treatment of cobalamin and folate disorders. *Br J Haematol*. 2014;166(4):496-513.
22. Takahashi-Iñiguez T, García-Hernandez E, Arreguín-Espinosa R, Flores ME. Role of vitamin B12 on methylmalonyl-CoA mutase activity. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2012;13(6):423-37.
23. Tefferi A, Pruthi RK, editors. *The biochemical basis of cobalamin deficiency*. Mayo Clinic proceedings; 1994: Elsevier.
24. Koury MJ, Ponka P. New insights into erythropoiesis: the roles of folate, vitamin B12, and iron. *Annu Rev Nutr*. 2004;24:105-31.
25. Scott JM. Folate and vitamin B 12. *Proceedings of the Nutrition Society*. 1999;58(2):441-8.
26. Koury MJ, Horne DW. Apoptosis mediates and thymidine prevents erythroblast destruction in folate deficiency anemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(9):4067-71.
27. Çağatay Ü GB. Megaloblastik Anemiler,Harrison İç Hastalıkları Prensipleri. 15. Baskıdan Çeviri. İstanbul Nobel Tıp Kitabevleri. 2004:674-80.
28. Gröber U, Kisters K, Schmidt J. Neuroenhancement with vitamin B12—underestimated neurological significance. *Nutrients*. 2013;5(12):5031-45.
29. Leal NA. *B12 Metabolism in Humans*: University of Florida; 2004.
30. Hvas AM, Nexø E. Diagnosis and treatment of vitamin B12 deficiency--an update. *Haematologica*. 2006;91(11):1506-12.
31. B12 Vitamini Eksikliği Tanı Ve Tedavi Kılavuzu Türk Hematoloji Derneği Ulusal Tedavi Kılavuzu 2011:5,6.
32. Carmel R. Pernicious anemia. The expected findings of very low serum cobalamin levels, anemia, and macrocytosis are often lacking. *Archives of internal medicine*. 1988;148(8):1712-4.

33. Tangney CC, Tang Y, Evans DA, Morris MC. Biochemical indicators of vitamin B12 and folate insufficiency and cognitive decline. *Neurology*. 2009;72(4):361-7.
34. Hemmer B, Glocker FX, Schumacher M, Deuschl G, Lucking CH. Subacute combined degeneration: clinical, electrophysiological, and magnetic resonance imaging findings. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1998;65(6):822-7.
35. Tayem L, Litaïem N, Jones M, Zegloui F. Reversible Facial Hyperpigmentation Associated With Vitamin B12 Deficiency. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*. 2017;32(2):275-6.
36. Murphy G, Dawsey SM, Engels EA, Ricker W, Parsons R, Etemadi A, et al. Cancer Risk After Pernicious Anemia in the US Elderly Population. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2015;13(13):2282-9.e1-4.
37. Lindenbaum J, Healton EB, Savage DG, Brust JC, Garrett TJ, Podell ER, et al. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. *The New England journal of medicine*. 1988;318(26):1720-8.
38. Stabler SP, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J. Clinical spectrum and diagnosis of cobalamin deficiency. *Blood*. 1990;76(5):871-81.
39. Lindenbaum J, Savage DG, Stabler SP, Allen RH. Diagnosis of cobalamin deficiency: II. Relative sensitivities of serum cobalamin, methylmalonic acid, and total homocysteine concentrations. *American journal of hematology*. 1990;34(2):99-107.
40. Oberley MJ, Yang DT. Laboratory testing for cobalamin deficiency in megaloblastic anemia. *American journal of hematology*. 2013;88(6):522-6.
41. Pongchaidecha M, Srikusalanukul V, Chattananon A, Tanjariyaporn S. Effect of metformin on plasma homocysteine, vitamin B12 and folic acid: a cross-sectional study in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*. 2004;87(7):780-7.
42. Carmel R. Holotranscobalamin: not ready for prime time. *Clinical chemistry*. 2012;58(3):643-5; author reply 5-6.
43. Nexo E, Hoffmann-Lucke E. Holotranscobalamin, a marker of vitamin B-12 status: analytical aspects and clinical utility. *The American journal of clinical nutrition*. 2011;94(1):359s-65s.
44. Stabler SP. Screening the older population for cobalamin (vitamin B12) deficiency. *Journal of the American Geriatrics Society*. 1995;43(11):1290-7.
45. Carmel R. How I treat cobalamin (vitamin B12) deficiency. *Blood*. 2008;112(6):2214-21.
46. Hoffbrand AV. Megaloblastic anemias. *Harrison's Principles of Internal Medicine 18 Edition*. 2012;1:870-1.

47. Hellebrekers P, Vrisekoop N, Koenderman L. Neutrophil phenotypes in health and disease. *European journal of clinical investigation*. 2018:e12943.
48. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(3):159.
49. Hellebrekers P, Hietbrink F, Vrisekoop N, Leenen LP, Koenderman L. Neutrophil functional heterogeneity: identification of competitive phagocytosis. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1498.
50. Arneth J. Die neutrophilen weissen Blutkörperchen bei Infektions-Krankheiten: Fischer; 1904.
51. Westerman DA, Evans D, Metz J. Neutrophil hypersegmentation in iron deficiency anaemia: a case-control study. *Br J Haematol*. 1999;107(3):512-5.
52. Carmel R. Subtle cobalamin deficiency. *Annals of internal medicine*. 1996;124(3):338-40.
53. Lindenbaum J, Nath BJ. Megaloblastic anaemia and neutrophil hypersegmentation. *British journal of haematology*. 1980;44(3):511-3.
54. Marcus DL, Shadick N, Crantz J, Gray M, Hernandez F, Freedman ML. Low serum B12 levels in a hematologically normal elderly subpopulation. *J Am Geriatr Soc*. 1987;35(7):635-8.
55. Rao B, Lokeshwari V, Prasaad PR. HYPERSEGMENTATION OF NEUTROPHILS–STILL A HALL MARK OF MACROCYTIC ANEMIA?: A PROSPECTIVE STUDY. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENTIFIC RESEARCH*. 2018;7(4).
56. Duzgun S, Yildirmak Y, Çetinkaya F. Neutrophil hypersegmentation and thrombocytosis in children with iron deficiency anemia. *TURKISH JOURNAL OF PEDIATRICS*. 2005;47(3):251.
57. Roberts PD, St John DJ, Sinha R, Stewart JS, Baird IM, Coghill NF, et al. Apparent folate deficiency in iron-deficiency anaemia. *Br J Haematol*. 1971;20(2):165-76.