

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORAK HÜCRELİ ANEMİDE PLAZMA VE ERİTROSİT
ORTAMINDAKİ
DEĞİŞİMLERİN BİYOKİMYASAL PARAMETRELERLE
İNCELENMESİ

Dr. Yeşim ER ÖZTAŞ

Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2010

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORAK HÜCRELİ ANEMİDE PLAZMA VE ERİTROSİT
ORTAMINDAKİ
DEĞİŞİMLERİN BİYOKİMYASAL PARAMETRELERLE
İNCELENMESİ

Dr. Yeşim ER ÖZTAŞ

Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ

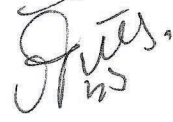
TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. NURİMAN ÖZGÜNEŞ

ANKARA
2010

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü' ne:

Bu çalışma, jürimiz tarafından Biyokimya Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Nuriman ÖZGÜNEŞ
Danışman: Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Pakize DOĞAN
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Ayşe BİLGİHAN
Gazi Üniversitesi



Üye: Doç.Dr. Filiz AKBIYIK
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. Halil YAMAN
GATA



ONAY:

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan S. Orer

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimleriyle çalışmalarına ışık tutan, hoşgörülü ama ilkeli tutumuyla yetişmemde sonsuz emeği geçen, sevgili hocam Prof. Dr. Nuriman Özgüneş'e saygı, sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Anabilim Dalı'mızın; en başta, bizlere her türlü desteği sağlayan bölüm başkanımız Prof. Dr. Ediz Demirpençe olmak üzere, tüm değerli öğretim üyelerine, saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım,

Değerli zamanlarını ayırarak tez izlem komitesinde yer alan, çalışmalarına değerli katkılarda bulunan, sevgili hocalarım Prof. Dr. Pakize Doğan ve Prof. Dr. Ayşe Bilgihan'a teşekkürü borç bilirim,

Örnek toplama sırasında, yakın desteğini gördüğüm; hastalarımızın takip ve tedavisini yürüten, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Hematoloji Ünitesi'nden değerli hematolog Doç. Dr. Selma Ünal'a ve ekibine teşekkür ederim.

Doç.Dr. Halil Yaman'a, Dr. İlknur Tokgöz'e, Dr. Suna Sabuncuoğlu'na, tez çalışmama olan katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Doç. Dr. Aslı Pınar'a, Doç. Dr. Burak Çimen'e, Dr. Başak Çeltikçi'ye, Arş. Gör. Dr. Adem Özkan'a, Arş. Gör. Dr. Andaç Uzdoğan'a yardımları için teşekkür ederim.

Deneylerimiz için kan örneği veren tüm sevgili çocuklara ve ailelerine teşekkür ederim.

Doktora eğitimim sırasında, özellikle yoğun tez dönemimde, sevgi, anlayış ve desteklerini eksik etmeyen canım aileme; eşim Dr. Emin Öztaş'a, oğlum Bilgehan'a ve kızım Tülin'e, teşekkürlerimi sunarım.

Sevmeyi, sabretmeyi, çalışkanlık ve cesareti; hayat deneyimi olarak aktaran sevgili anne ve babama en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (H.Ü.B.A.B. 07D09101006).

ÖZET

Er Öztaş, Y. Orak hücreli anemide plazma ve eritrosit ortamındaki değişimlerin biyokimyasal parametrelerle incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı Doktora Tezi, Ankara, 2010. Orak hücreli anemi (OHA) hemoglobin (Hb) β zinciri genindeki bir nokta mutasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan genellikle ölümcül seyreden kronik bir hastalıktır. Orak eritrositlerde, Hb otooksidasyonu ve serbest radikal oluşumunun artması yanında, membran lipitlerinde peroksidasyon ve proteinlerinde oksidatif değişimler gözlenmiştir. Bu konuda yapılan çalışmaların bulguları, OHA'da Hb mutasyonu ve membran hasarının ötesinde; eritrosit ve plazmanın protein, lipit ve iyonlarını kapsayan yaygın bir değişim ve harabiyetin var olduğunu düşündürmektedir. OHA'da artmış olan oksitleyici baskı bu harabiyetin başlatıcısı olabilir. Bu düşünceden yola çıkarak tez çalışmasında hem eritrosit hem de plazmada; protein, lipit ve iyonlardaki genel değişim incelendi. Bu amaçla OHA hastası, taşıyıcısı ve sağlıklı çocuklara ait plazma ve hemolizat örneklerinde protein, lipit ve iyon değişimleri ve oksitleyici baskı ilişkisi incelendi. Hastalar, taşıyıcı ve sağlıklılarla kıyaslandığında; plazma proteinlerinde hasar ve yapısal değişim; plazma kolesterol düzeylerinde düşüş, plazma demirinde artış saptandı. Eritrositte oksitleyici baskı varlığı, artmış bakır ve kalsiyum düzeyleri gösterildi. Stabil OHA hastalarının plazma ve eritrosit ortamının protein, lipit ve iyonlar yönünden taşıyıcı ve sağlıklı çocuklardan farklı olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Orak hücre, anemi, oksidatif stres, protein, lipit, iyon

Destekleyen Kurumlar: H.Ü.B.A.B. Tez Destekleme (07D09101006).

ABSTRACT

Er Öztaş, Y.The investigation of plasma and erythrocyte medium in sickle cell anemia by biochemical parameters. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Biochemistry, Ankara, 2010

Sickle cell anemia (SCA) arises due to a mutation in the β globin gene of hemoglobin (Hb). It is a disease of high mortality with a chronic course. Increased autoxidation of Hb and free radical formation, findings of peroxidation of membrane lipids and oxidative changes of its proteins were observed in sickle erythrocytes. The findings of the studies in this area imply a widespread change and damage comprising the proteins, lipids and ions of the erythrocyte and plasma beyond Hb mutation and membrane damage. The increased oxidative stress in SCA may be the trigger of this damage. Having this idea in mind, the general change in proteins, lipids and ions and their relation with the oxidative stress in both erythrocyte and plasma of SCA patients, carriers and healthy controls were studied. Plasma protein damage and structural alteration, low plasma cholesterol levels, high plasma iron levels were found in SCA patients compared to carriers and controls. Oxidative stress, increased copper and calcium levels were detected in the erythrocyte. It was concluded that plasma and erythrocyte medium of SCA patients were different from carriers and controls considering proteins, lipids and ions.

Key Words: Sickle cell, anemia, oxidative damage, protein, lipid, ion

Supported by H.U.B.A.B. Thesis Grant (07D09101006)

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER	x
TABLolar	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Normal Eritrositlerde Oksidasyon	2
1.2. Orak Hücre Anemisinde Oksidasyon	2
1.3. Orak Hücre Anemisinde Lipitlerdeki Değişim	3
1.4. Amaç	3
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Tarihsel Gelişim	6
2.2. Genetik	7
2.3. Hastalığın görülme sıklığı	7
2.4. Patofizyoloji	8
2.5. Klinik	20
2.6. Oksidatif hasara genel bakış	23
3. BİREYLER VE YÖNTEM	32
3.1. Gereçler	32

3.2. Bireyler	32
3.3. Kan örneklerinin alınması, plazma eldesi, eritrosit paketinin hazırlanması	33
3.4. Yöntemler	34
4. BULGULAR	41
4.1. I.Grup örnekler	41
4.2. II. Grup örnekler	46
5. TARTIŞMA	79
5.1. OHA'da oksitleyici baskı	79
5.2. OHA'da hemoliz düzeyleri	79
5.3. Protein Ortamı	80
5.4. Lipit ortamı	88
5.5.İyon ortamı	92
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	95
7. KAYNAKLAR	96

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALT	:	Alanin amino transferaz
AST	:	Aspartat amino transferaz
Ca	:	Kalsiyum
Cu	:	Bakır
DNPH	:	Dinitrofenilhidrazin
DTNB	:	Ditiyobisnitrobenzoik asit
Fe	:	Demir
FA	:	Folik Asit
GDO	:	Geri dönüşsüz oraklaşma
Hb	:	Hemoglobin
HbA	:	Erişkin Hemoglobin
HbF	:	Fetal Hemoglobin
HbS	:	Orak Hemoglobin
H ₂ O ₂	:	Hidrojen Peroksit
HCl	:	Hidroklorik Asit
LCAT	:	Lesitin kolesterol açıl transferaz
MDA	:	Malondialdehit
MetHb	:	Methemoglobin
NO	:	Nitrik Oksit
OHA	:	Orak Hücreli Anemi
Rpm	:	revolution perminute, dakikadaki devir sayısı
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
SD	:	Standart sapma
TG	:	Trigliserit
TK	:	Total Kolesterol
T-SH	:	Toplam 'Sülfidril grubu'
Zn	:	Çinko

ŞEKİLLER

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Deoksijenizasyonun polimerizasyon ve oraklaşma üzerindeki etkisi	9
2.2 Normal (A) ve orak (B) eritrositlerin damarlardaki dolaşımı	10
2.3 Hemoglobinin 3 boyutlu yapısı ve hem halkası	11
2.4 Hemoglobinin 3 boyutlu gösterimi	12
2.5 HbS polimer zinciri	13
2.6 Oksijenizasyon ve oraklaşma	14
2.7 Orak eritrositte artmış kalsiyum düzeyleriyle Gardos kanalının aktive olması	15
2.8 Orak eritrositlerin endotele adezyonundaki temel bileşenler	19
2.9. Orak hücreli anemi tedavisinde kullanılabilen bazı ilaçların etki bölgeleri	22
2.10 Polipeptit zincirinin serbest radikaller aracılığıyla kırılması	25
2.11 Demir ile katalizlenen protein oksidasyonu	26
2.12 Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyon ürünlerinin katılımı ile karbonil grubu oluşumu	27
2.13 Albümin proteinindeki oksidasyon	29
2.14 Malondialdehit oluşumu	30
2.15 Protein elektroforezinde proteinlerin fraksiyonlara dağılımı	31
4.1 Plazma total kolesterol düzeylerinin hasta, taşıyıcı ve sağlam gruplarındaki dağılımı	43
4.2 Plazma MDA düzeylerinin hasta, taşıyıcı ve sağlam gruplarındaki dağılımı	43
4.3 Hemolizat MDA düzeylerinin hasta, taşıyıcı ve sağlam gruplarındaki dağılımı	44
4.4 Plazma total kolesterol ve plazma MDA düzeyleri arasındaki ilişki	44
4.5 Plazma total kolesterol ve hemolizat MDA düzeyleri arasındaki ilişki	45
4.6 Plazma protein düzeylerinin hasta, taşıyıcı ve sağlam gruplarındaki dağılımı	47
4.7 Toplam bilirubin düzeylerinin hasta, taşıyıcı ve sağlam gruplarındaki dağılımı	48

4.8	Plazma toplam SH düzeylerinin hasta, taşıyıcı ve sağlam gruplardaki dağılımı	49
4.9	Plazma protein karbonil düzeylerinin hasta, taşıyıcı ve sağlam gruplardaki dağılımı	50
4.10	Hastalara ait MetHb yüzdeleri	51
4.11	Başlangıçtaki ortalama albümin yüzdesi	54
4.12	Üre muamelesi sonrası albümin yüzdelerinin dağılımı	54
4.13	Sağlam ve hastada albumin fraksiyonundaki değişim	55
4.14	Başlangıç Alfa1 fraksiyonlarının sağlam ve hastada dağılımı	56
4.15	Başlangıçtaki Alfa1 fraksiyonunun sağlam ve hastadaki dağılımı	56
4.16	Sağlam ve hastada üre muamelesi sonrası Alfa1 fraksiyonları yüzdesi	57
4.17	Sağlam ve hastada Alfa1 değişim yüzdesinin dağılımı	57
4.18	Sağlam ve hastalarda başlangıçtaki Alfa2 yüzdesinin dağılımı	58
4.19	Sağlam ve hastadaki üre muamelesi sonrası Alfa2 yüzdesinin dağılımı	58
4.20	Sağlam ve hastadaki Alfa2 yüzdesinin değişimi	58
4.21	Sağlam ve hastada başlangıçtaki Beta fraksiyonu yüzdesinin dağılımı	59
4.22	Sağlam ve hastada üre muamelesi sonrası Beta fraksiyonu yüzdesi dağılımı	59
4.23	Sağlam ve hastada Beta fraksiyonu değişim yüzdeleri	59
4.24	Sağlam ve hastada başlangıçtaki Gama fraksiyonu yüzdesinin dağılımı	60
4.25	Sağlam ve hastadaki üre muamelesi sonrası Gama fraksiyonu yüzdesinin dağılımı	60
4.26	Sağlam ve hastada Gama fraksiyonundaki değişim yüzdesinin dağılımı	60
4.27	Hemolizattaki Hb'nin hasta, taşıyıcı ve sağlam gruptaki dağılımı	63
4.28	Plazma total kolesterol düzeylerinin hasta, taşıyıcı ve sağlam grupta dağılımı	64
4.29	Plazma TG düzeylerinin hasta, taşıyıcı ve sağlam grupta dağılımı	65

4.30	Plazma fosfolipit düzeylerinin hasta, taşıyıcı ve sağlam grupta dağılımı	66
4.31	Hemolizat trigliserit düzeylerinin hasta, taşıyıcı ve sağlamlarda dağılımı	67
4.32	Hemolizat kolesterol düzeylerinin hasta, taşıyıcı ve sağlamlardaki dağılımı	67
4.33	Hastalara ait hemolizat, gost ve sitozol örneklerinin uygulandığı ince tabaka görüntüsü	68
4.34	Taşıyıcılara ait hemolizat, gost ve sitozol örneklerinin uygulandığı ince tabaka görüntüsü	69
4.35	Sağlamlara ait hemolizat, gost ve süpernatant örneklerinin uygulandığı ince tabaka görüntüsü	70
4.36	Hasta, taşıyıcı ve sağlamlara ait hemolizat ekstresi örneklerinin uygulandığı ince tabaka görüntüsü	71
4.37	Tüm vakalarda plazma demir ve plazma protein karbonil düzeyleri arasındaki ilişki	73
4.38	Hasta grubunda plazma demir ve plazma protein karbonil düzeyleri arasındaki ilişki	74
4.39	Plazma trigliserit ve hemolizat bakır düzeyleri arasındaki ilişki	75
4.40	Hemolizat bakır ve plazma protein karbonil düzeyleri arasındaki ilişki	75
4.41	Hemolizat kolesterol ve hemolizat bakır düzeyleri arasındaki ilişki	76
4.42	Hasta grubunda hemolizat çinko ve plazma protein karbonil düzeyleri ilişkisi	76
4.43	Plazma trigliserit ve plazma protein karbonil düzeyleri arasındaki ilişki	77
4.44	Hasta grubunda plazma fosfolipit ve TG düzeyleri arasındaki ilişki	77
4.45	Total bilirubin ve plazma protein karbonil düzeyleri arasındaki ilişki	78

TABLOLAR

<u>Tablo</u>		<u>Sayfa</u>
2.1	Orak hücreli aneminin fenotipik sınıflandırılması	7
2.2	Tipik bir ağırlı krizin evreleri	18
2.3	Orak hücreli anemi tedavisinde kullanılan ilaçlar ve etki mekanizmaları	23
2.4	Protein amino asit yan zincirlerinde ROS aracılı oksidasyon	27
4.1	I. Grup hastaların genel özellikleri	41
4.2	Hasta, taşıyıcı ve sağlıklı çocuklarda total protein düzeyleri	42
4.3	Hasta, taşıyıcı ve sağlam çocuklarda plazma total kolesterol, plazma ve hemolizat MDA düzeyleri	42
4.4	II. Grup hastaların genel özellikleri	46
4.5	OHA hastaları, taşıyıcıları ve sağlam çocuklarda ortalama plazma bilirubin, protein karbonil ve toplam SH düzeyleri	48
4.6	Protein elektroforezi yapılan hasta ve sağlam çocuklara ait ortalama protein düzeyleri	52
4.7	Hasta ve sağlam grupta başlangıçtaki protein fraksiyonlarının ortalaması	52
4.8	Hasta ve sağlam grupta üre ile muamele sonrası protein fraksiyonlarının ortalaması	53
4.9	Hasta ve sağlam gruptaki her bir fraksiyona ait % değişimlerin ortalaması	53
4.10	Sağlam grupta protein fraksiyonları ve diğer parametreler arasındaki anlamlı korelasyonlar	61
4.11	Hasta grupta protein fraksiyonları ve diğer parametreler arasındaki anlamlı korelasyonlar	62
4.12	Hasta, taşıyıcı ve sağlam grupta plazma ve hemolizat lipitlerinin ortalama düzeyleri	65
4.13	Hasta, taşıyıcı ve sağlam gruba ait plazma ve hemolizat çinko, bakır, demir, kalsiyum düzeyleri	72
4.14	Plazma demir düzeylerinin diğer parametrelerle korelasyonları	73
4.15	Hemolizat bakır düzeylerinin diğer parametrelerle korelasyonu	74

1. GİRİŞ

Orak hücreli anemi (OHA), eritrosit proteinlerinin %99'unu oluşturan hemoglobin molekülündeki bir amino asit değişikliğiyle ortaya çıkan genetik bir hastalıktır. Kalıtımı otozomal resesiftir. Orak şeklini alan eritrositler, kronik hemolitik anemi ve tekrarlayan ağrı, hastalığın en tipik bulgularıdır. Hastalığın sistemik etkileriyle enfeksiyonlara hassasiyet artar, büyüme ve gelişme yavaşlar.

Hemoglobin (Hb) beta zinciri genindeki nokta mutasyon sonucunda asidik bir aminoasit olan glutamat yerine hidrofobik bir aminoasit olan valin geçmiştir. Bu yapısal değişiklik Hb molekülünün yük dengesini değiştirdiği gibi fonksiyonel özelliklerini de pek çok açıdan etkiler ve değiştirir. Oksijen basıncının düştüğü, asidoz veya dehidratasyon geliştiği hallerde, eritrosit içindeki orak Hb (HbS) molekülleri polimerize olarak hücre içinde çözünürlüğünü kaybeder. Eritrosit içinde uzun Hb polimer lifleri oluşur, hücre orak benzeri şekil alır. Oraklaşma hali çoğu zaman geri dönüşümlüken, bazı eritrositlerde kalıcı şekil değişikliği görülür. Hb polimerizasyonu kadar hücre membranının hasarlanması ve kaybı da hücrenin şekil bozukluğunda etkilidir. HbS molekülü, eritrositin kendisine hasar vererek erken hemolize neden olduğu gibi, HbS polimerizasyonu sonrası oraklaşan hücreler, küçük damarlarda kümelenme ve tıkanıklığa yol açar.

OHA'da damar tıkanıklığına bağlı gelişen iskemi, beyin, böbrek, akciğer gibi organlarda hasara ve fonksiyon kaybına yol açmaktadır. Diğer yandan sıklıkla uygulanan transfüzyonlar bu hastaların doku ve organlarında demir birikimine yol açmakta, bu açıdan da organlar etkilenmekte ve fonksiyonları bozulmaktadır.

OHA hastalığının, eritrositte dehidratasyon, hemoliz, artmış adezyon, koagülasyon başlatıcı aktivite, inflamasyon ve endotelial hücre bozukluğu gibi bileşenleri olduğu anlaşılmıştır. Bu genetik hastalığın ortaya çıkardığı biyokimyasal değişimlerin etraflıca incelenmesi ile hastalığın tedavisi ve hastaların hayat kalitesinin artırılması için yeni yaklaşımlar geliştirilmektedir.

Ülkemizde daha çok Akdeniz bölgesinde yoğunlaşmış bir hasta popülasyonu var iken, dünya genelinde OHA hastaları Afrika kıtası, Ortadoğu ve Akdeniz ülkelerine dağılmıştır. Bu coğrafyadan özellikle Amerika'ya yapılan göçler, hastalığı, bu kıta için de önemli bir sağlık sorunu haline getirmiştir. İngiltere ve Almanya'da

da OHA hastalığı taşıyan göçmen sayısındaki artış, bu ülkeleri de OHA ile ilgili çalışmalara yönlendirmiştir.

1.1. Normal Eritrositlerde Oksidasyon

Eritrositler her zaman oksijen tehdidi altında olan hücrelerdir. Çünkü bu baskıyı tetikleyen elemanlarla donanmışlardır. Eritrositler devamlı bir oksijen akışı altındadır, bir oksidasyon tetikleyicisi olan demir (Fe^{+2}) iyonu bulundurulur ve doymamış yağ asitleri içeren bir zarla çevrilidirler. Ancak normal şartlarda, Fe^{+2} iyonu “hem grubu” cebi içinde izole edilmiştir. Ayrıca antioksidasyon yönünde çalışan enzimler, oluşan az miktardaki oksidasyonun hasara yol açmasını engellemektedirler.

1.2. Orak Hücre Anemisinde Oksidasyon

1.2.1. HbS Otooksidasyonu

HbS'in, hemoglobin A (HbA)'ya göre otooksidasyonun artmış olduğu ilk kez Hebbel tarafından göstermiştir (1). Orak hücre Hb'inin otooksidasyon hızının normalin yaklaşık iki katına kadar çıktığı rapor edilmiştir (1). Bu durumda süperoksit oluşumu da hızlanmış demektir. Saflaştırılmış HbS ve orak biçimli eritrositlerle (2) yapılan çalışmalar benzer sonuçlar vermiş ve süperoksit oluşumunun normale göre yaklaşık iki katına çıktığını göstermiştir. HbS'deki mutasyonun, otooksidasyonu neden artırdığı tam olarak bilinmemektedir.

1.2.2. Lipit Peroksidasyonu

OHA'da çok fazla miktarda lipit peroksidasyonu oluşumu gözlenmiştir (3). Orak eritrosit membranının peroksidasyon yolu ile hasara uğradığı düşünülmektedir (4). Orak hücre membranında oluşan hasar potasyum iyonuna karşı geçirgenliğin artması (5), membran asimetrisinin değişmesi (6), eritrosit deformabilitesinde azalma (7), hücre dehidrasyonu (8-9) ve hücre parçalanması ile gösterilmiştir (4).

1.2.3. Orak Hücrede Oksidasyonu Tetikleyen Etkenler

Fe^{+2} ve özellikle bakır (Cu^{+2}) iyonları Hb oksidasyonunu tetikleyici elemanlardır (10-12). OHA'da eritrositlerdeki Fe^{+2} ve Cu^{+2} miktarı konusundaki

bulgular çelişkilidir. Orak biçimli eritrositlerde bu iyonların miktarının arttığı (12-14), aynı olduğu veya azaldığı rapor edilmiştir (15-16).

Ayrıca OHA'da Fe^{+2} iyonu deposu normalden farklı olarak membranla yüzyüze gelmektedir. Membran üzerinde hem grubuna bağlı olan (17) ve olmayan (18) Fe^{+2} iyonu gösterilmiştir. Bu da membran üzerindeki oksitleyici baskıyı çok artıran bir faktördür.

1.3. Orak Hücre Anemisinde Lipitlerdeki Değişim

OHA'da eritrosit lipitlerini inceleyen az sayıda çalışma vardır. Bir çalışmada orak eritrositlerinde total lipidin istatistiksel olarak arttığı, fosfolipit ve kolesterol değerlerinin normalden düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak önemli olmadığı bildirilmiştir (19). Bir başka çalışmada tersinmez olarak oraklaşmış hücrelerin fosfolipit ve kolesterol içerikleri incelenmiş ve her ikisinin de %10 dolayında düştüğü gösterilmiştir (20). Retikülositlerde oraklaşmanın etkisi ile lipit sentezinin %69 oranında arttığı, bu artışın en fazla fosfolipitlerde ve trigliseritlerde gözlemlendiği bildirilmiştir (21).

Orak hücre ile ilgili lipit çalışmaları daha çok eritrosit membranı üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalar orak eritrosit membranında fosfolipit organizasyonu (22-23) ve içeriğinin (24-25) değiştiğini göstermiştir. OHA'da plazma fosfolipidlerinin ve kolesterol esterlerinin yağ asidi içeriğinin de normalden farklı olduğu rapor edilmiştir (26).

OHA'da lipit çalışmaları plazma lipitleri üzerinde yoğunlaşmıştır ancak bulgular çelişkilidir. Bütün çalışmalarda plazma total kolesterol düzeylerinin düşüklüğü ortak sonuçtur (27-29). İncelenen diğer lipit fraksiyonları (Trigliserit, düşük ve yüksek yoğunluklu kolesterol, fosfolipit) konusunda çelişkili bulgular vardır (27-28, 30-33).

1.4. Amaç

OHA patofizyolojisi mutant bir gen ürünü olan HbS ile açıklanamayacak kadar karmaşık görülmektedir. Mutant gen ürünü ile yukarıda anlatılan bozukluklar arasındaki ilişki mekanizması henüz aydınlatılamamıştır. HbS'nin otooksidasyon eğilimi de demirin orak hücrede daha etkin konumda olduğunun anlaşılmasına rağmen) tam olarak açıklanamamaktadır.

OHA çalışmaları daha çok eritrosit membranı ve Hb üzerinde yoğunlaşmıştır. Giriş bölümünde anlatılan bulgular, bu hastalıktaki problemin Hb molekülü ve eritrosit membranı ile kısıtlanamayacak, bütün hücre ortamını ve hatta plazmayı da içine alan geniş bir alanı kapsadığını düşündürmektedir. Bu düşünceden hareketle hücre ortamının bütünündeki değişimleri yansıtacak olan hemolizat esas alınarak çalışılması planlanmıştır. Ayrıca bu hastalıkta plazmada önemli değişiklikler olmasına rağmen “eritrosit-plazma” paralel çalışmalarının azlığı göz önüne alınarak hemolizat yanında plazmadaki değişimler de incelenmiştir.

Plazma proteinlerindeki genel oksidasyon toplam sülfidril grubu (T-SH) tayini ile değerlendirilmiştir. “Sülfidril grubu” (-SH) içeriği proteinin üç boyutlu yapısındaki değişimin (harabiyetin) iyi bir göstergesidir. Plazma SH gruplarının %80’i proteinden geldiği için protein harabiyeti konusunda önemli bilgiler verebilir. Ayrıca proteindeki değişimin (harabiyetin) bir diğer göstergesi olan “karbonil grubu” içeriği de ölçülmüştür. Bilgilerimize göre OHA’da karbonil grubu içeriğiyle ilgili iki çalışma vardır. Yine oksidatif strese bağlı plazma proteinlerinde yapısal bir değişiklik olup olmadığının anlaşılması için denatüran ortamda plazma protein elektroforezi yapılmıştır.

Orak hücre lipitleri konusundaki çalışmalar da azdır ve daha çok eritrosit membranına yöneliktir. Giriş bölümünde belirtildiği gibi OHA hastalarının plazmalarındaki lipit değişimini inceleyen yayınlarda çeşitli sonuçlar bildirilmiştir. Bu çalışmada hemolizat ve plazmadaki lipit değişiminin paralel olarak çalışılması planlanmıştır. Bunun için hemolizatta trigliserit ve kolesterol içeriği ve plazma lipitlerindeki (kolesterol, trigliserit, fosfolipit) değişim kantitatif olarak ölçülerek, kendi aralarında veya diğer bulgularla bir korelasyonun olup olmadığı incelenmiştir. Ayrıca hemolizat lipitlerinin durumunu kalitatif olarak görebilmek için total lipit ekstraktları ince tabaka ile incelenmiştir.

Oksidasyonun orak hücredeki birçok hasarın temelindeki olay olduğu düşünülmektedir, ancak bu konuda kesin veriler yoktur. Bulgularımızla oksidasyon arasındaki bağlantıyı araştırabilmek için oksidasyon göstergesi olarak en çok tercih edilen yöntem olan malondialdehit (MDA) ölçümü yapılmıştır. Ayrıca orak hücre oksidasyonundaki temel basamağın hemikrom oluşumu olduğu düşünülmekte, bu olayın da methemoglobin (MetHb) oluşumu ile başladığı bilinmektedir (34-35). Bu

nedenle oksidasyonun ikinci göstergesi olarak (ek olarak Hb'in otooksidasyonunun göstergesi olduğu için) MetHb miktarı da ölçülmüştür.

Hücre ortamındaki metabolik olaylarda önemli bir etken de elementlerdir. Bu çalışmada oksidasyonu tetikleyebilen Cu^{+2} ve Fe^{+2} yanında, orak hücrede konsantrasyonu çok yükselen ve birçok metabolik olayı tetikleyen kalsiyum (Ca^{+2}) iyonunun (36-37) ve ayrıca bazı çalışmalarda OHA hastalarının plazmalarında düştüğü gözlenen (38) ve Cu^{+2} ile yakın ilgisi olan çinko (Zn^{+2}) iyonunu hemolizat ve plazmada paralel olarak ölçülmüş ve diğer bulgularla bağlantıları araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihsel Gelişim

Afrikalılar çok eski yıllardan bu yana OHA hastalığını farklı kabilelerde “tekrarlayan ağrıyı” ya karşılık gelen değişik adlarla tarif etmişlerdir. Ganalı bir ailenin 1670 yıllarına giden soy ağacında hastalıklı bireyler tanımlanmıştır (39). 1904 yılında, Dr. James Herrick, kanında ‘uzamış ve orak şekilli eritrositler’ görülen ilk OHA vakasını bildirmiştir (40). 1915’de bildirilen 3. orak hücre vakasının, ebeveynlerinden birinin kanında da anormal orak hücreler gösterilmiş, hastalığın kalıtsal olabileceği düşünülmüştür (41). 1927’de Hahn ve Gillespie oksijen yokluğunda oraklaşma olduğunu ve tekrar oksijen verilmesiyle eritrositlerin normal şeklini kazandığını bildirmiş ve bozukluğu eritrositlere değil, hücre içindeki Hb’e bağlamıştır (42). 1939’da Diggs ve Bibb orak hücre morfolojisini detaylı bir biçimde tanımlamış, oksijenlenmeye rağmen geri dönüşsüz oraklaşmış hücrelerin varolduğunu belirtmişlerdir (43).

1940’da Ham ve Castle ‘bozuk eritrostasiz siklüsü’ hipotezini ortaya atarak deoksijenizasyon, asidik pH ve orak eritrosit viskozitesi etkileşimine ait bulguları birleştirmeyi amaçlamıştır (44). 1946 ‘da tıp fakültesi öğrencisi olan Sherman normal eritrositlerin değil, sadece orak eritrositlerin, oksijensiz bırakıldığında ‘ışığın çift kırınımı’ özelliğini gösterdiğini keşfetmiş, böylece oksijen azlığının Hb yapısını değiştirdiğini ileri sürmüştür (45). Bu, orak Hb’in, oksijensiz ortamda düzenli bir yapı kazandığına da ilk kanıttır. 1948’da Pauling ve arkadaşları Hb S’in elektroforetik mobilitesinin normal Hb’den (Hb A) farklı olduğunu göstermiş (46) ve bunu globin zincirindeki yük değişimine bağlamıştır. Böylece OHA, bir proteindeki bozukluktan kaynaklandığı anlaşılan ‘ilk moleküler hastalık’ olmuştur.

1950’de Harris deoksijene Hb S solusyonlarında geri dönüşümlü katı-jel değişimini tanımlayarak katı Hb S polimerlerinin patolojideki rolünü açıklamıştır (47). Perutz ve Mithicson deoksijene Hb S’in solusyonda çözünürlüğünü kaybettiğini bildirmiştir (48). 1956 ‘da Vernon Ingram ve J.A. Hunt HbS dizisini belirleyerek altıncı pozisyondaki glutamik asitin valinle yer değiştirdiğini ve her bir Hb molekülü başına iki negatif yükün kaybedildiğini bularak HbS’in elektroforez ve çözünürlük bozukluklarını açıklığa kavuşmuştur (49). 1959 ‘da Perutz, Hb’in 3 boyutlu yapısını tanımlamıştır (50). 1984 yılında lösemili bir çocuğa yapılan kemik iliği nakli

sonrasında eşlik eden OHA de tamamen iyileşmiş, orak hücre hastalığının tedavisine yönelik kemik iliği nakli çalışmaları hız kazanmıştır (51). 1995 yılında Dr. Samuel Charache'ın yürüttüğü 'Çok Merkezli, Hidroksiüre' nin OHA' da Kullanımı' araştırmasıyla hidroksiüre orak hücre hastalığının komplikasyonlarını önleyebilen ilk ve tek ilaç olarak duyurulmuştur (52).

2.2. Genetik

Orak hücre hastalarında sadece HbS bandı görülür. Hastalığı olmayan, taşıyıcı, anne babada hem HbA hem de HbS bandı bulunur. Taşıyıcılar hastalık belirtilerini göstermez, ancak tetkik ve taramalar sırasında tesadüfen anlaşılır. Taşıyıcılık formu SA, homozigot formu SS, birleşik formları ise S-Beta, S-Alfa, S-C, S-D şeklindedir. Genotipik olarak farklı OHA formları olsa da bunlardan özellikle HbSS ve Hb S-Beta (HbS β) olguları aynı şekilde takip edilmektedir. Bu hastalardaki Hb fenotipi değişimleri için Ohene-Fempong sınıflaması Tablo 2.1'de sunulmuştur (53).

Tablo 2.1. Orak hücreli aneminin fenotipik sınıflandırılması

Ohene-Fempong sınıflaması	Tanımlayıcı isim	Erişkin elektroforez patterni	Yenidoğan elektroforez patterni
Orak Hücre Hastalığı-SS	Homozigot orak hücre hastalığı (orak hücreli anemi)	Hb S (77-97) HbF (1-20) HbA2 (2-3,5)	Hb F (85-90) HbS (10-15)
Orak Hücre Hastalığı-S β +talasemi	Orak- β + talasemi	HbS (60-88) HbA1 (9-30) HbF (5-20) HbA2 (4-7)	HbF (85-90) HbS (5-11) HbA1 (4-7)

HbS:Orak hemoglobin

HbF: Fetal hemoglobin

HbA2: Normal erişkin hemoglobin

HbA1: Minör erişkin hemoglobin

2.3. Hastalığın görülme sıklığı

Dünyada en yaygın kalıtsal kan hastalıklarının başında OHA ve talasemiler gelmektedir. Hastalığın merkezi Afrika olsa da, ticaret yolları ve köle ticaretinin etkisi ile orak hücre geni dünyanın değişik yerlerine dağılmıştır. Afrika kökenli Amerikan yenidoğanlarda orak hücre hastalığı taşıyıcılığı %8-10 olup her yıl OHA'lı

4000-5000 bebek doğmaktadır. Batı Afrika’da taşıyıcılık sıklığı %25-30 olup her yıl yaklaşık olarak 120000 bebek OHA ile dünyaya gelmektedir (54). Ayrıca, Karayipler, Orta ve Güney Amerika, Akdeniz Bölgesi (Türkiye, Yunanistan), Orta Doğu ve Hindistan bölgesinde de OHA görülme sıklığı önemlidir.

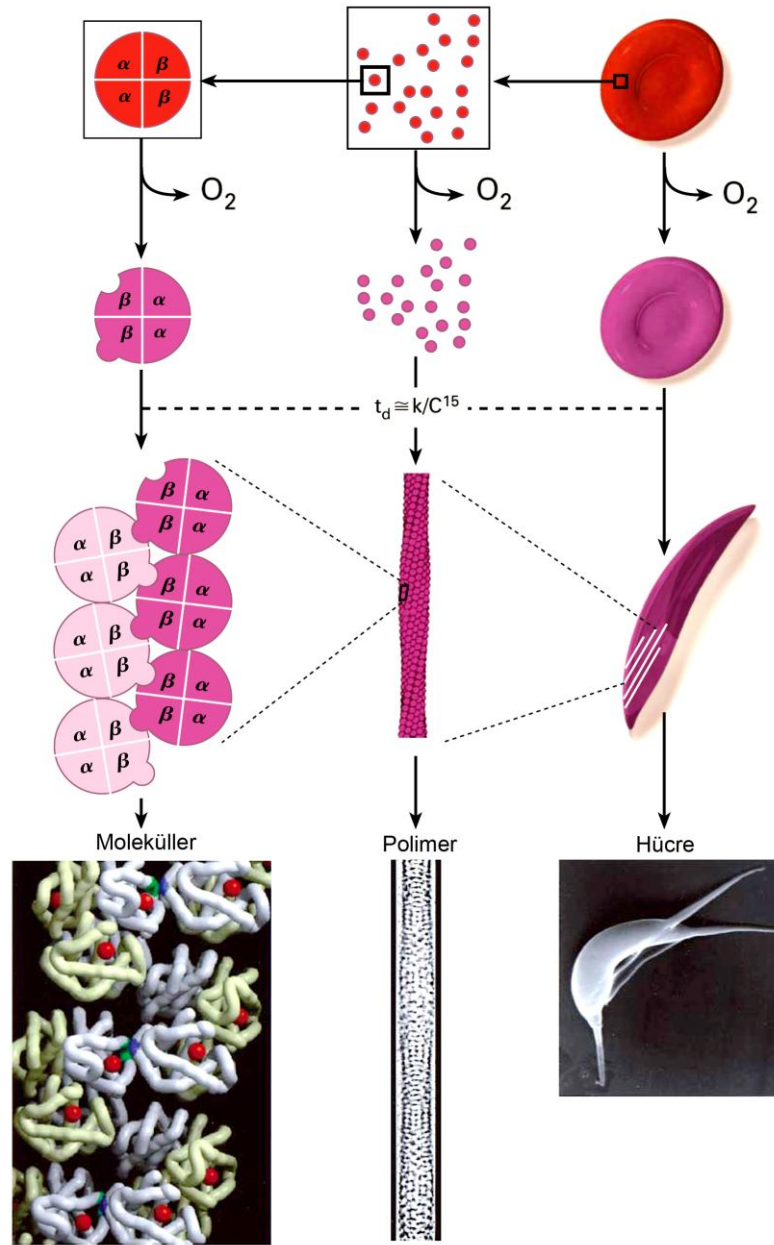
Ülkemizde hemoglobinopatiler ile ilgili ilk çalışmalar, M. Aksoy tarafından 1950’li yıllarda Çukurova bölgesinde yapılmıştır (55). Özellikle güney illerimizde OHA hastası ve taşıyıcısı sayısı yüksektir (56). Mersin OHA taşıyıcılığının ve hastalığın yaygın olduğu bir ilimizdir (57). Mersin ilinde evlilik öncesi tarama sonuçlarına göre HbS taşıyıcılığı %1,3 bulunmuştur (58). Özellikle aile içi evlilikler hastalığın ortaya çıkışında önemli bir etmendir.

2.4. Patofizyoloji

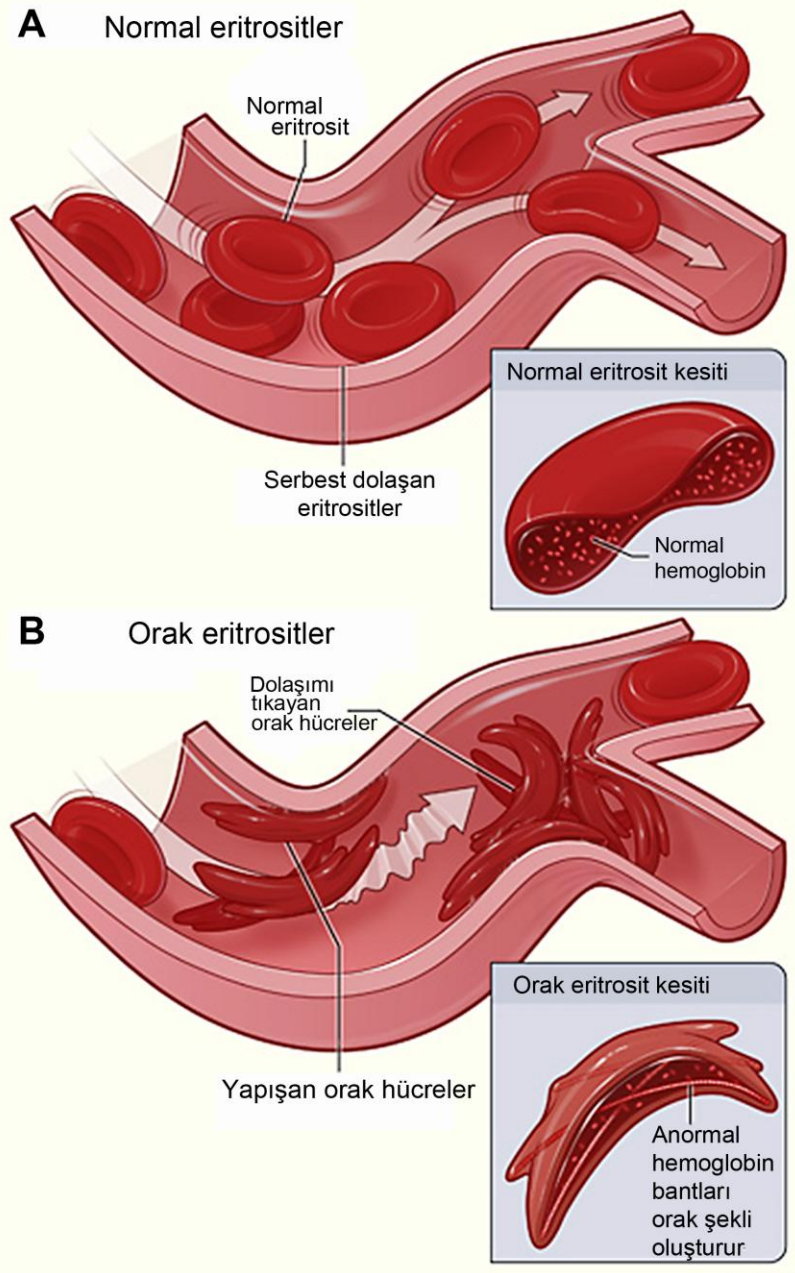
Orak hücre patofizyolojisi aşağıdaki olaylar zinciriyle açıklanmıştır:

1. β globin geninin altıncı kodonundaki A→G nükleotit değişimine bağlı olarak, polipeptit zincirinde 6. sıradaki glutamik asit yerine valin geçer.
2. Dış yüzeyde yer alan hidrofilik bir aminoasitin hidrofobik bir amino asitle yer değiştirmesi proteinin çözünürlük özelliklerini değiştirir.
3. Oksijensiz kalındığında eritrosit içinde çözünürlüğü azalan HbS proteinini polimerize olur (Şekil 2.1),
4. Eritrositlerde şekil bozukluğu ve oraklaşma görülür,
5. Orak eritrositler küçük damarlarda kümelenerek tıkanıklığa yol açar (Şekil 2.2) (59),

Polimerizasyon orak hücre hastalığının değişmez özelliği iken (60) hastalığın patofizyolojisini tam anlamıyla açıklayabilmek için fizikokimya, moleküler biyoloji, hücre biyolojisi, biyokimya, koagülasyon ve genetik bilimleriyle elde edilecek verileri birleştirecek bütünleşmiş bir bakış açısına ihtiyaç vardır (4, 8).



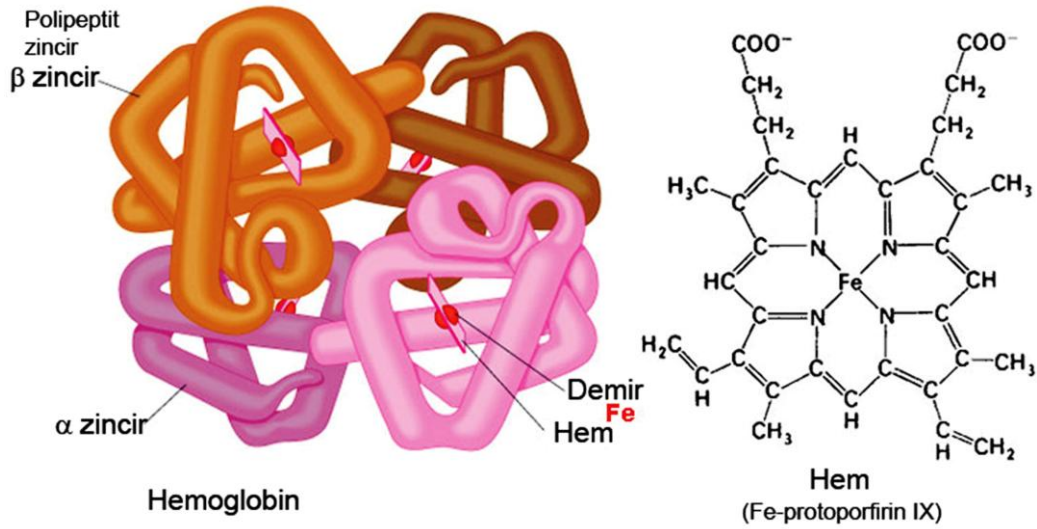
Şekil 2.1. Deoksijenizasyonun polimerizasyon ve oraklaşma üzerindeki etkisi (61).



Şekil 2.2. Normal (A) ve orak (B) eritrositlerin damarlardaki dolaşımı (59).

2.4.1. Hemoglobin

İnsan Hb molekülleri α - ve β -globinlerin dimerlerinin eşlenerek tetramer yapısında ve fonksiyonel bir birim olarak oluşturduğu proteinlerdir. $\alpha_2 \beta_2$ molekülü erişkindeki esas Hb'dir (Şekil 2.3). Memelilerdeki esas fonksiyonu akciğerlerdeki oksijeni (O_2) dokulara taşımaktır. Bunun yanında Hb önemli biyolojik rolleri olan; karbondioksit (CO_2), karbon monoksit (CO), ve nitrik oksit (NO) gazları ile de etkileşmektedir (62).



Şekil 2.3. Hemoglobinin 3 boyutlu yapısı ve hem halkası (62).

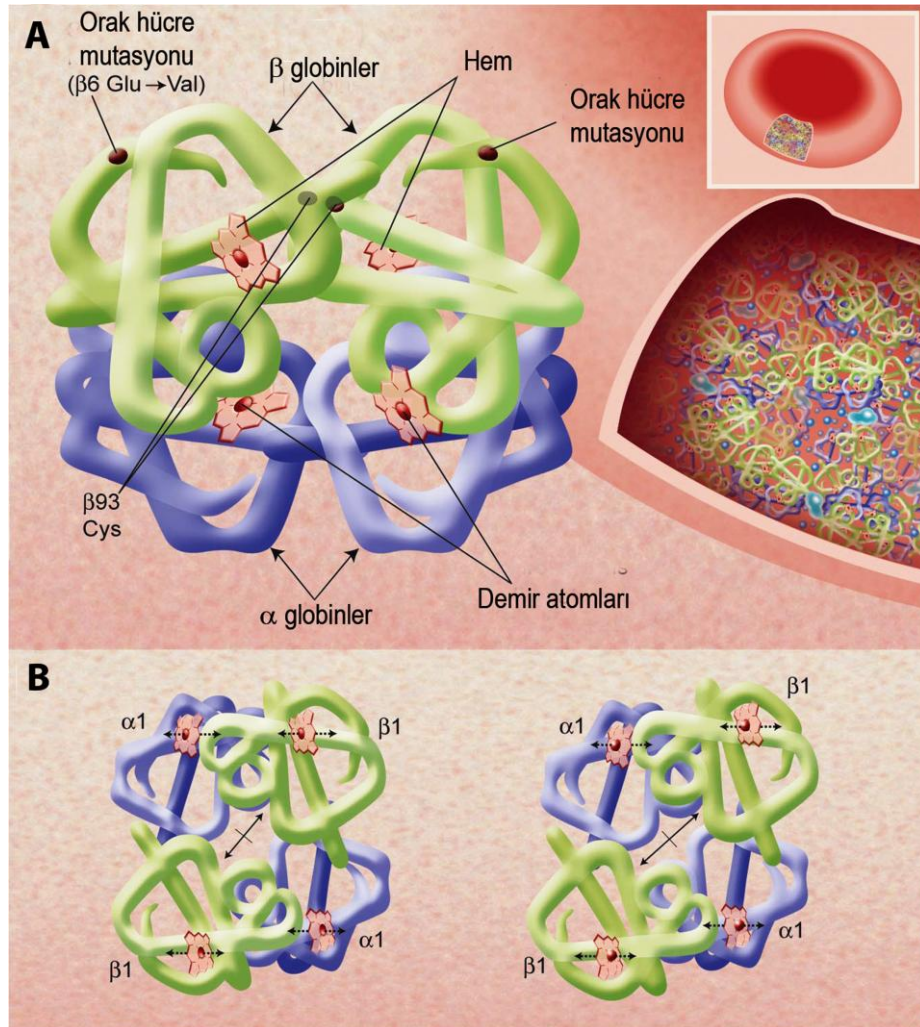
Globin proteininin amino asitleri α -heliks peptidinin, α zincirinde 7 ve β zincirinde 8 alan içeren karakteristik bir biçimde katlanması ile Hb proteinin fonksiyonel özellikleri ortaya çıkar. Hb tetramerine ait dört polipeptidin her birinde kovalan olmayan etkileşimlerle bağlanmış demir-protopofirin IX molekülü olan bir hem prostetik grubu vardır ki böylece demir atomu sulu ortamdan saklanmış olur. Bu ortamdaki demir atomları başlıca fizyolojik ferröz (Fe^{2+}) halindedir. Koordinasyonları bir düzlemdeki dört nitrojen atomu; 'F' heliksin 8. pozisyonundaki histidin amino asidinin imidazol nitrojen atomuna ve porfirin düzlemine göre histidinin karşısına gelen tarafa da gaz atomu bağlanır. Gaz atomlarının bu dört demir atomuna geridönüştü bağlanması ile O_2 , CO ve NO'nun taşınımı gerçekleşir. CO_2 demir atomlarına bağlanarak değil de Hb'nin amino ucundaki amino asitlerle zayıf karbamino kompleksi oluşturarak ve kanda çözünmüş olarak taşınır. CO toksik bir gaz olmasının yanında vücutta 'hem' molekülünün hem oksijenazla yıkımı sırasında oluşur. NO'nun β zincirinin 93. pozisyonundaki sistein amino asidine bağlanarak S-nitrozil Hb oluşturduğu anlaşılmış, S-nitrozil Hb'nin de düşük oksijen konsantrasyonlarında NO'yu salmasının da dokularda vazodilatasyon ile kan akışını ve oksijen salınımını artıran bir mekanizma olabileceği düşünülmüştür.

Sağlıklı erişkinlere ait eritrositlerde Hb'in %97'si HbA ($\alpha_2\beta_2$), %2'si HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) ve %1'i fetal Hb ($\alpha_2\gamma_2$) olan HbF'tir. A globin gen lokusu kromozom 16'da ve

β globin gen lokusu kromozom 11’de yer alır. Yetişkin insanda Hb sentezi normal olarak kemik iliğindeki olgunlaşmamış eritrositlerde meydana gelir.

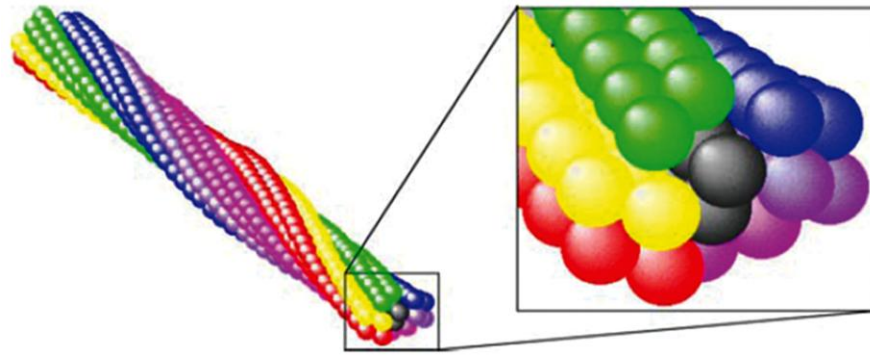
2.4.2. Orak Hemoglobin ve polimerizasyon

HbS proteini oksijen bağladığında HbA ile benzer çözünürlük gösterdiği halde; 6. pozisyonundaki glutamik asit yerine valin geçmesiyle HbS tetramerinin yüzeyi daha hidrofobik hale gelir. Küçük bir genetik değişiklik moleküler stabiliteyi önemli ölçüde etkiler. Oksijenini bırakan, deoksi HbS molekülünün çözünürlüğü azalır, buna karşılık viskozitesi artar, deoksi HbS tetramerleri kendi aralarında etkileşerek polimer lifçikleri oluşturur, bunlar da lifler halinde biraraya gelir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Hemoglobinin 3 boyutlu gösterimi, A; HbS mutasyonunun yerleşimi B; oksi ve deoksi formdaki Hb (62).

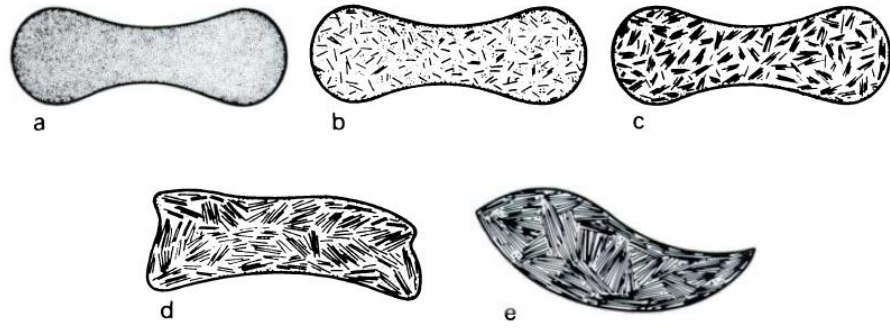
Temel polimer yapısında iki sarmallı lifçik yer alıp bunlardan yedi tanesi birleşerek lif yapısını oluşturur. Tetramerin iki $\beta 6\text{val}$ 'inden bir tanesi komşu HbS tetramerindeki F heliks hidrofobik cebinde yer alan $\beta 85\text{phe}$ ve $\beta 88\text{leu}$ amino asitleri ile etkileşime girerek polimerizasyonu başlatmaktadır (60). Eritrositteki HbS konsantrasyonu 30 g/dL'ye ulaştığı zaman yarı katı jel formu oluşur. HbS polarize ışıktaki incelendiğinde küçük mekik şeklinde cisimler içerir. Bu sıvı kristallere taktoid de denir. HbS'in sıvı ve katı fazları arasındaki dengeyi tayin eden dört değişken; oksijen konsantrasyonu, HbS konsantrasyonu, ısı ve HbS dışındaki Hb'lerin varlığıdır. Bunların en önemlisi oksijen konsantrasyonudur. Deoksijenizasyon HbS molekülünü oksijensiz bırakarak süpersatüre eder, HbS tetramerleri kümelenir ve HbS polimeri oluşur (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. HbS polimer zinciri 7 ikili sarmaldan oluşur. Her top bir molekül Hb'i temsil eder. Aynı ikili sarmalda ait olan moleküller aynı renkte boyanmıştır (60).

2. 4. 3. Hücresel Oraklaşma

Orak hücre süspansiyonu oksijensiz bırakıldığında viskozitesinde dramatik bir artış gözlenir. Viskozite değişimi polimer miktarıyla paraleldir. Saniyeler içinde gerçekleşen HbS polimerizasyonu ile deforme olan eritrositler, oksijenizasyonla eski şeklini kazanır (Şekil 2.6). Deoksijenizasyonun süre ve şiddetine bağlı olarak Hb tetramerleri farklı biçimlerde polimerize olmakta ve granüler veya orak biçimli eritrositlere rastlanmaktadır.



Şekil.2.6. Oksijenizasyon ve oraklaşma. Oksijenizasyon a; %100, b; %75 c; %50 d; %25 ve e; %0 (59).

Genellikle yeniden oksijenlenme ile orak eritrositler eski biçimini kazanırken, bazı hücrelerin dolaşımında orak şekillerini korudukları bilinmektedir. Hücrelerin geri dönüşsüz oraklaşmasındaki mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Bu hücrelerde HbF içeriğinin daha az olduğu bilinmektedir (63). Bu hücrelerin deforme olabilme özellikleri çok azaldığından dolaşımında kalış süreleri de kısalmıştır (64). Her bir hasta için dönüşsüz oraklaşmış hücre sayısı genellikle sabittir ve esas olarak kansızlık derecesiyle ilişkilidir. Bu hücre sayısı hastanın krizleriyle ilişkili olmadığı gibi örneğin akut ağrı atağı gibi durumların da bir belirleyicisi değildir. Periferik yaymada geri dönüşsüz oraklaşmış hücrelerin (GDO) saptanması orak hücre sendromlarının tanısının konulmasında çok önemlidir; tüm orak hücre hastalığı genotiplerinde GDO görülürken, orak hücre taşıyıcılarında GDO görülmez.

2.4.4. Orak Hücrede Dehidratasyon ve Sonuçları

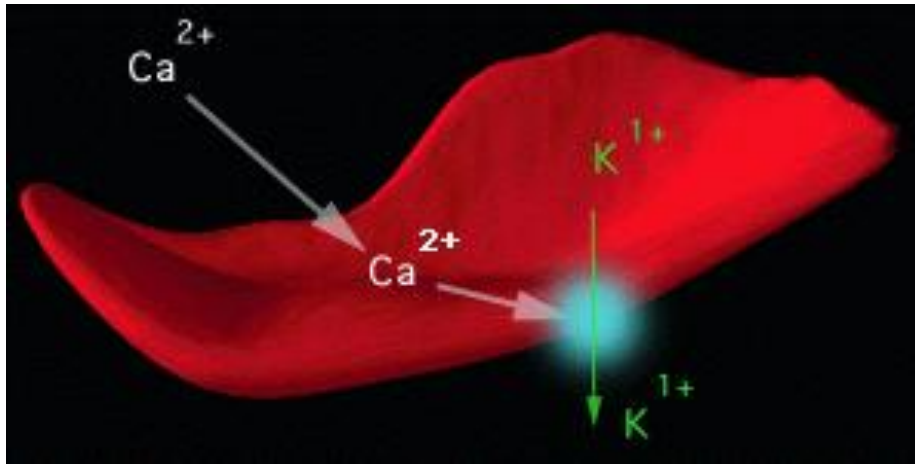
Orak hücrelerin normalden farklı bir katyon içeriği olduğu ilk kez 1937’de Erickson ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (65). Orak hücre hastalarının kanlarında sodyum yüksekliği ve potasyum düşüklüğü saptanmış, ancak bu değerlerin hastalar arasında önemli varyasyon gösterdiği de belirtilmiştir. Orak eritrositler yoğunluklarına göre ayrılıp incelendiğinde katyon homeostazisine ait anormalliklerin varlığı daha iyi anlaşılmıştır.

Diğer yandan orak hücre hastalığında hemoliz nedeniyle ortalama eritrosit ömrü kısalmış, periferik kanda retikülosit sayısı artmıştır. Ortalama retikülosit sayımı

%4-24 arasında olup yaklaşık %10 civarındadır. Böylece bazı pompa sistemlerinde saptanan aktivite artışının hücrelerin genç olması ile ilişkili olabileceği de düşünülmüştür.

Orak eritrositlerde aktivite değişikliği gösterdiği düşünülen taşıma sistemleri aşağıdadır:

- Na^+ , K^+ pompası
- Na^+ , K^+ , 2Cl^- kotransportu
- K^+ , Cl^- kotransportu
- Na^+ , H^+ değiştiricisi
- Ca^{2+} taşıyıcısı
- Ca^{2+} bağımlı K^+ kanalı (Gardos Yolu) (şekil 2.7)



şekil 2.7. Orak eritrositte artmış kalsiyum düzeyleriyle Gardos kanalının aktive olması (65).

Ca^{2+} bağımlı K^+ kanalı ve K^+ , Cl^- kotransportu bunların içinde en etkili olanlarıdır. Orak hücre membranında bozulmuş transport fonksiyonu sonucunda hücre K^+ ve su kaybeder, hücre yoğunluğu artar. Bu yoğun (dens) hücrelerde eritrosit Hb konsantrasyonu 50 g/dL 'ye ulaşabilir. Bu durumda SS Hb'lerin polimerizasyonu hızlanırken GDO eritrosit oluşumu kolaylaşır. Özellikle GDO eritrositlerde hücre içi Ca^{2+} düzeyi yüksektir.

2.4.5. OHA'da bakır, çinko, demir ve kalsiyum iyonlarının durumu

OHA hastalarında antioksidan özellikleri iyi bilinen Zn iyonunun, plazma, eritrosit, saç gibi dokularda eksildiği bildirilmiş (66-67), yine idrarla Zn kaybedildiği gösterilmiştir (38). Bir çalışmada çocukluk çağı OHA hastalarının %44'ünde Zn eksikliği saptanmıştır (68). Ancak OHA hastalarının kontrolle benzer Zn düzeylerine sahip olduğunu bildiren çalışmalar da vardır (69). Antioksidan sisteme önemli katkıda bulunan Zn'nun redoks aktivitesi olmadığı için, bağlandığı proteini dayanıklı hale getirir. Çinkonun membranlara bağlanarak antioksidan olarak etki gösterdiği bilinmektedir (70).

Zn düzeylerindeki değişim sıklıkla Cu dengesini de etkilemektedir (71-72). Zn eksikliği görülen dokularda Cu düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (73). OHA hastalarında plazma Cu düzeylerini artmış (74-75) veya benzer bulan çalışmalar vardır (67, 76).

OHA' daki bir diğer önemli iyon da Hb yapısında yer alan Fe' dir. OHA hastalarında kronik hemoliz nedeniyle idrarla Fe kaybı artmakta (77) ancak tedavi amaçlı uygulanan transfüzyonlar neticesinde Fe birikimi de gözlenebilmektedir (78). Fe, Cu ile birlikte oksidasyonu tetiklemesi bakımından önemlidir. Orak eritrositlerde Fe miktarının kontrole kıyasla arttığı (13), aynı kaldığı veya azaldığı rapor edilmiştir (15).

Orak eritrositlerde özellikle oksijensizlik sırasında Ca^{2+} iyonu derişiminin arttığı gösterilmiştir (79). Yüksek total Ca düzeyi sitoplazmik veziküllere doğru bir kompartmentalizasyonla (yer tutma) ilgilidir. Plazma membranından türeyen bu veziküller, Ca^{2+} - ATPaz'ı da içeren integral membran proteinlerini de kapsar. Ca hücre içinde birçok metabolik olayı başlatabilmektedir (37). OHA hastalarında plazma Ca düzeyleriyle ilgili az sayıda çalışma vardır (80-82).

2.4.6. OHA'da oksidatif hasar

OHA hastalığı tablosundaki oksidatif hasarın üç bileşeni vardır:

1. Eritrositteki HbS oksidasyonuna bağlı gelişen peroksidasyon ve serbest radikal oluşumu
2. Damar tıkanıklığı sonrası gelişen reperfüzyon hasarından kaynaklanan serbest radikaller
3. Eritrosit içinde ve dolaşımda azalmış antioksidan kapasite

Orak Hb'in elektroforetik mobilitesi ve çözünürlüğü normalden farklı olduğu gibi yapısı da kararsızdır (17, 83). Bu durumda MetHb bozunumu ve hem salınımı artmıştır (84). Diğer yandan fizyolojik Hb oksijenlenmesi ve oksijensizleşmesi sürecinde devamlı MetHb ve oksijen radikalleri üretilmektedir (85).

Orak hücredeki bu oksidatif stres, indirgeyici savunma mekanizmasını bozarak, diğer oksidatif ajanların hasar vermesini kolaylaştırır. Orak eritrositlerdeki serbest hem, hücreyi oksidasyondan koruyan bazı enzimleri inhibe ederken; heksoz monofosfat yolu aktivitesi ve glutatyon içeriği azalmıştır (86). Orak hücrelerdeki bu metabolik hasar yeterince anlaşılmadıysa da hastalık patolojisine katkısının büyük olduğu düşünülmektedir.

Band 3 ve diğer bir transmembran protein olan glikoforinin membran dağılımındaki düzensizlik, orak hücrelerde membran iskeletinin bozulduğunu gösterir (9). Bant 3'ün sitoplazmik kısmında hemikrom agregatlarının birikmesi ile bant 3 moleküllerinin membranda bir araya toplandığı; immünglobülin G ve komplemanın band 3'ün hücre dışı bölgelerine bağlanması ile orak hücrenin makrofajca tanınması ve endotele yapışmasının kolaylaştığı gözlenmiştir (87). Membran iskeleti proteinlerinden biri olan spektrinin orak hücre membranıyla birleşmemesi, iskeleti oluşturan proteinlerin anormalliğinin bir sonucudur. Membran iskeleti proteinleri olan ankirin, spektrin, band 3 ve band 4,1'de oksidatif hasar geliştiğine dair direkt kanıtlar vardır (88).

Orak hücrede membran lipidlerinin oksidatif hasara uğradığı da gösterilmiştir (3). Kural olarak biyolojik zarlarda aşırı lipid peroksidasyonu ile akışkanlık kaybı, membran potansiyelinde düşme, H^+ ve diğer iyonlara geçirgenlikte artış ve takibinde hücrenin parçalanmasıyla hücre içeriğinin ve organellerin dışarıya çıkışı gerçekleşir.

2.4.7. İnflamasyon ve adherans

OHA'da kronik hemoliz sonucu açığa çıkan hücre içeriği de plazmanın kimyasal bileşimini değiştirmekte ve inflamatuvar bir ortam hazırlamaktadır (89). Sitokinlerin ve plazma faktörlerinin OHA patolojisinde önemli bir rolü olduğu ve özellikle plateletlerin bu sitokin salınımına aracılık ettiği anlaşılmıştır (90). OHA'da platelet kökenli CD40 ligand düzeyleri artmış iken krizlerde daha da artış olmuştur (91). CD40 ligand tümör nekrozis faktör ailesinden olup OHA'daki kronik inflamasyonun potansiyel medyatörü olarak düşünülmüştür. OHA'da kronik

inflamasyon bulguları olmakla beraber, hasta krize girdiğinde akut inflamasyon bulguları alevlenir (Tablo 2.2) (53).

Tablo 2.2. Tipik bir ağırlı krizin evreleri

Prodromal evre (1-2 gün)	Başlangıç evresi (2-3 gün)	Pik evresi (2-7 gün)	Yatışma evresi (1-2 gün)
Dens eritrositler↑	Lökosit sayımı ↑ Dens eritrositler ↑ RDW↑ LDH↑ CRP↑ ESR↑	Fibrinojen↑ ESR↑ Eritrosit deformabilitesi↓ Hemoglobin ↓	Fibrinojen↑ ESR↑ Eritrosit deformabilitesi↑ Trombosit↑
Eritrosit deformabilitesi↓	Fibrinojen↑ Trombosit↓ Eritrosit deformabilitesi↓		Lökosit sayımı ↓ Dens eritrositler ↓ RDW↓ CRP↓

RDW: Eritrosit dağılım genişliği, LDH: Laktat dehidrogenaz, CRP: C reaktif protein
ESR: Eritrosit sedimentasyon hızı

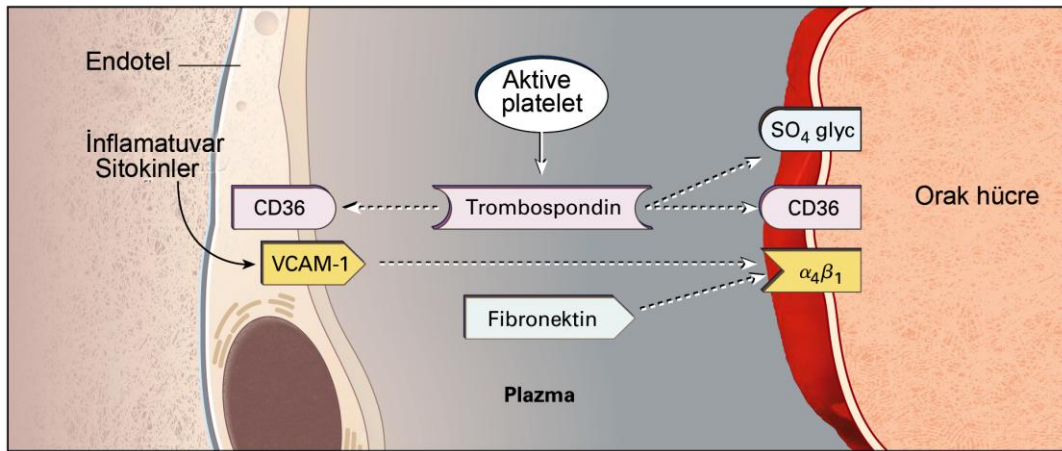
Orak hücreler damar endotel hücre kültürüne belirgin yapışma göstermiş, bu gözlem OHA patofizyolojisinin aydınlatılmasında yeni bir yol açmıştır (92).

Orak hücre hastalığında gelişen damar tıkanıklığının derecesi orak hücrelerin yapışkanlığıyla doğrudan ilişkilidir. Eks vivo çalışmalarda vazooklüzyonun başlangıcında orak hücrelerin vasküler endotele yapıştığı gösterilmiştir (93). Genellikle en düşük yoğunluklu, retikülositten zengin orak hücre fraksiyonu en fazla yapışkanlık gösterir (94). OHA'da adezyonu (yapışmayı) etkileyen faktörler aşağıdaki gibi belirlenmiştir (4).

1. Orak hücre alt popülasyonu (alt tipi)
2. Endotel hücresinin kaynağı (kökeni, tipi)
3. Sitoadhezif (hücreye adezyon kuvvet gösteren) ligandlar
4. Hücre membran reseptörleri.

Orak eritrositlerin uyarılmamış endotele yapışmasında yüksek molekül ağırlıklı von Willebrand Faktör, glikoprotein Ib, integrin, trombospondin, CD36, sülfatlanmış glikanlar, fibronektin, laminin ve CD44 gibi çeşitli moleküller aracılık etmektedir. Bu moleküler çeşitlilik orak eritrositlerin endotele yapışmasında karmaşık mekanizmaların işlediğini ortaya koymaktadır. Endotel aktivasyonu veya

hasarı olduğunda, orak eritrositlerin adezyon mekanizmasına plateletler ve polimorfonükleer lökositler de katılmaktadır (90). Adezyon olayındaki temel bileşenler Şekil 2.8’de gösterilmiştir. Yine artmış tümör nekrozis faktör α düzeyleri orak hücre adezyonuyla ilişkili görülmüştür (95). Diğer yandan endotel hücrelerinin oksijensiz kalması, iskemi-reperfüzyon hasarının gelişmesi, mevcut immün yetmezlikle kronikleşen inflamasyon, adezyon moleküllerinin artışı ile belirginleşen orak hücre adezyonu tablosu da vazooklüzyonu desteklemektedir.



Şekil 2.8. Orak eritrositlerin endotele adezyonundaki temel bileşenler (95).

2.4.8. Proteomik araştırmalar

Orak eritrosit membran proteinlerinin proteom analizinin yapıldığı bir çalışmada (96) özellikle aktin aksesuar proteinler, lipid raft bileşenleri, oksijen radikal temizleyici, protein tamirinde görevli proteinler ve protein yapım-yıkım (turnover) bileşenlerinin ekspresyonu kontrole göre artmıştır. Hidroksiüre tedavisinin orak eritrosit proteomuna etkisinin incelendiği yeni bir çalışmada; ilaç tedavisiyle eritrosit şekil ve fleksibilitesini düzenlemekle görevli membran iskeleti proteinlerinde artış olduğu gözlenmiştir (97). Miktarı düşen proteinlerse protein tamir ve yıkımında görevli olanlardır.

2.5. Klinik

2.5.1. Tanı

Hemoglobin çalışmaları ile tanıya gidilir. Alkali pH'da yapılan elektroforezde HbS, Hb A, Hb A2 ve HbF birbirlerinden net olarak ayrılırlar. HbS, HbA ile HbA2 arasında yer almaktadır. Ayrıca HPLC ile Hb fraksiyonlarının ayrılması ile HbS yüzdesinin belirlenmesi de yaygın olarak kullanıma girmiştir. Moleküler tanı yöntemleri olan PCR-Restriksiyon Endonükleaz kesimi ile tanı kesinleştirilebilir.

2.5.2. Klinik Tablo

Orak hücre hastalarında anemi bulguları olmakla birlikte ağırlı kriz dönemleri dışında genellikle belirti vermezler. Erkek hastaların ortalama yaşam süresi 42, kadınlar içinse 48 yıldır. Fakat bu yaş sınırları hastalığın komplikasyonları ile değişkenlik gösterebilir. Hastalarda büyüme ve gelişim geri, ergenlik gecikmiştir. Kronik ve ilerleyici kemik ve eklem hasarı dikkat çeker.

Santral sinir sistemi ağır felçlerin yanı sıra, sessiz infarktların etkisi altındadır. Kronik anemi, pulmoner arterlerde tekrarlayan hafif tıkanıklıklar ve miyokarddaki hemosideroz, kardiyovasküler sistemi stres altına sokan faktörlerdir. Tekrarlayan infarktlar ve enfeksiyonlara bağlı kronik akciğer hastalığı ortaya çıkar; akciğer fonksiyonları ortadan ağıra giden düzeyde bozuktur.

Dalak OHA'de en sık tutulan organlardan biridir (98). Önce splenomegali daha sonra da otosplenektomi ve dolayısıyla da enfeksiyonlara duyarlılık gelişir. Bir yaşında başlayan karaciğer büyümesi hayat boyu devam eder. Hastalarda gözlenen karaciğer hasarı çok faktörlü olup demir birikimi (hemosideroz) ve viral enfeksiyonun bir sonucu olarak ortaya çıkar (99). Hepatik fonksiyon bozukluğu görülebilir, erişkinde difüz nodüler siroz ortaya çıkabilir. Artmış hem katabolizmasına bağlı, pigmenter safra taşları sıktır.

Böbreklerde klinik belirti vermeyen küçük kortikal infarktlar görülür. Tübül epiteline hemosiderin birikimi, glomerüler arterlerde dilatasyon ve konjesyon saptanmıştır. Hipostenuri ve hematüri sık görülen belirtilerdir.

Orak eritrositlerin göz damarlarında yol açtığı stazis ve oklüzyon çeşitli oküler lezyonlara neden olur. Geri dönüşümsüz hasarlar sıktır. Tekrarlayan ayak

ülserleri erişkin döneme ait bir problem olarak ortaya çıkar, sekonder enfeksiyon gelişimi sıklıdır.

2.5.3. Laboratuvar bulguları

Hemoglobin düzeyleri 5-9 gr/dL arasında değişir. Periferik kan yaymasında görülen oraklaşmış hücreler, homozigot OHA'nın tanısıl bulgularındandır. Retikülosit sayısı %5-15 arasında değişir, çekirdekli eritrositler, polikromatofili gözükür, bunlar hızlanmış eritropoez bulgularıdır. OHA'da eritrosit ömrü kısalmmışken (yaklaşık on gün) eritrosit üretimi 4-5 kat artmmıştır. Total lökosit sayısı artabilir (12000-20000 /mm³). Periferik yaymada nötrofil hâkimiyeti görülür. Trombosit sayısı yüksek, sedimentasyon hızı düşüktür. Karaciğer fonksiyon testlerinde bozulma, hiperbilirubinemi ve hipergamaglobinemi görülebilir. Karaciğerde eritroid hiperplazi bulunur. OHA'lı hastalarda hemostatik sistemin sıklıkla etkilendiği tesbit edilmiştir.

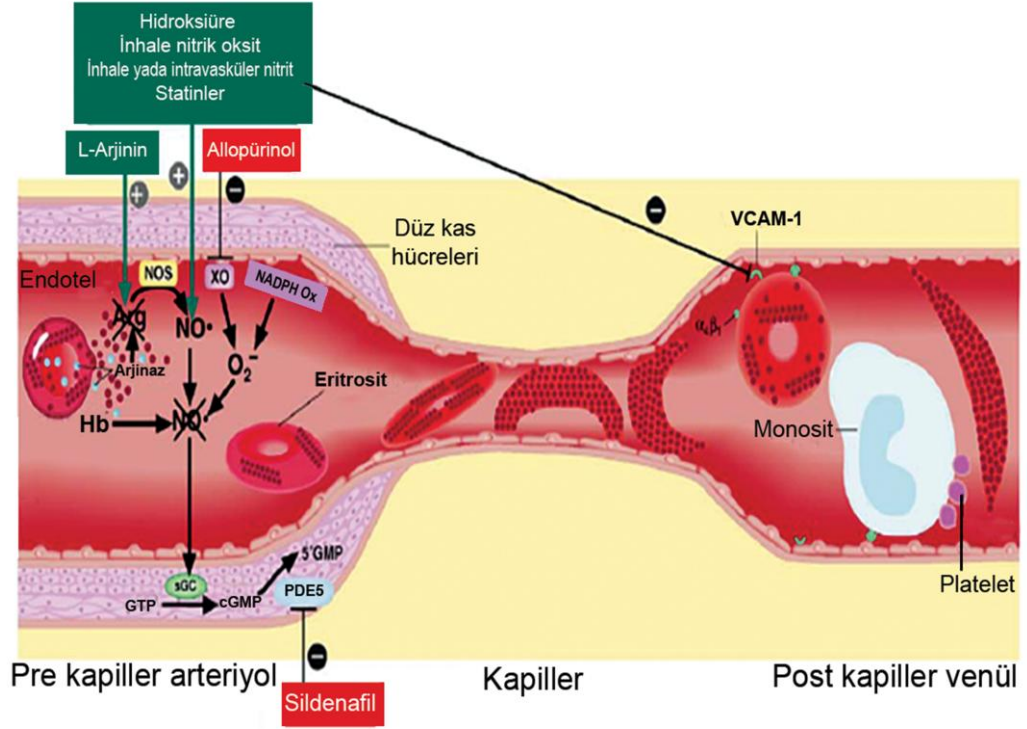
2.5.4. Tedavi

HbF yapımını artıran ilaçların başında hidroksiüre gelmektedir. Hidroksiüre HbF sentezini artırarak eritrosit kök hücrelerin farklılaşmalarına etki eder ve eritrosit yaşam süresini etkileyerek oraklaşmayı azaltır. Bu ilaç ağrı krizlerini, hastanede kalış sürelerini, akciğer ve nörolojik olayları azaltmada başarılı olmuştur fakat hastaların bir kısmında ilacın kullanımına yanıt alınmayabilir. Önemli bir yan etkisi yoktur. Hidroksiüre tedavisinin sık transfüzyon ihtiyacını azaltarak yaşam kalitesini artırdığı gösterilmiştir (100).

Orak hücrelerin küçük damarlarda tutulmasını ve endotele yapışmasını azaltmak amacıyla von Willebrand karşıtı faktör, eritrositlerin endotele yapışmasını engelleyen antikorlar, integrin karşıtı moleküller ve ayrıca sulfasalazin, flocor gibi endotel aktivasyon engelleyicilerinin tedavide etkinliği araştırılmaktadır.

NO eksikliğinin oraklaşmada rolü olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda NO ön maddesi olan L-arginin tedavisinin özellikle pulmoner hipertansiyon tedavisinde yarar sağladığı gösterilmiştir (şekil 2.9). NO ve L-arginin, hidroksiüre ile beraber kullanıldığında birbirlerinin etkilerini artırdığı gözlenmiştir. Bununla beraber orak hücre hastalarında Zn desteğinin oksidatif stresi, enfeksiyon

insidansını ve sitokin üretimini azalttığı tesbit edildiğinden, hastalara düzenli Zn desteği sağlanmalıdır (101).



Şekil 2.9. Orak hücreli anemi tedavisinde kullanılan bazı ilaçların etki bölgeleri (101).

OHA tedavisinde kullanımı denenmiş çeşitli ilaçlar Tablo 2.3' de özetlenmiştir.

Tablo 2.3. Orak Hücreli Anemi tedavisinde kullanılan ilaçlar ve etki mekanizmaları (102).

İlaç Grubu	Mekanizma	İlaç
Eritrosit rehidratasyonu	Gardos kanalı inhibisyonu KCl kotransport inhibisyonu	Klotrimazol Mg Pidolat
Antiadezyon	Eritrosit endotel adezyonu Endotel aktivasyonu	Antiadezyon antikorları Sulfasalazin
HbF yapımı	Ribonükleotid redüktaz Histon deasetilaz DNA hipometilasyon Stres eritropoezi	Hidroksiüre Kısa zincirli yağ asitleri 2-deoksi-5-azaktadin Eritropoietin
Antioksidatif tedavi	Membran demir şelasyonu Glutasyon metabolizması	Deferipron Glutamin N-asetilsistein
Antitrombotik tedavi	Trombini azaltma Trombosit aktivasyonu inhibisyonu	Heparin n-3 yağ asitleri
Vazodilatasyon	Antioksidasyon Adezyonu ve polimerizasyonu azaltma Anti-adezyon, anti-inflamasyon	Nitrik oksit Arjinin Floklor
Transfüzyon tedavisi	Orak eritrositleri azaltmak	Aferezis, basit transfüzyon
Transplantasyon	Hematopoietik kök hücre	Allojenik, nonmyeloablatif
Gen tedavisi	Direk gen replasmanı	β -globin geni viral transferi
Antiinflamatuvar tedavi	HMGCöA redüktaz inhibisyonu Apo A1 mimetik	Statinler

2.6. Oksidatif hasara genel bakış

2.6.1. Protein oksidasyonu, protein karbonil grubu oluşumu

Reaktif oksijen türleri (ROS); atmosferde kirletici olarak bulunur, normal metabolizmada yan ürün olarak veya radyasyona ve bazı kimyasallara maruziyetle ortaya çıkabilir. Bunlar; hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorit iyonu (OCl^-), hidroksil radikali ($OH\cdot$), hidroperoksil radikali ($HO_2\cdot$), ve süperoksit anyonu ($O_2\cdot^-$) dur.

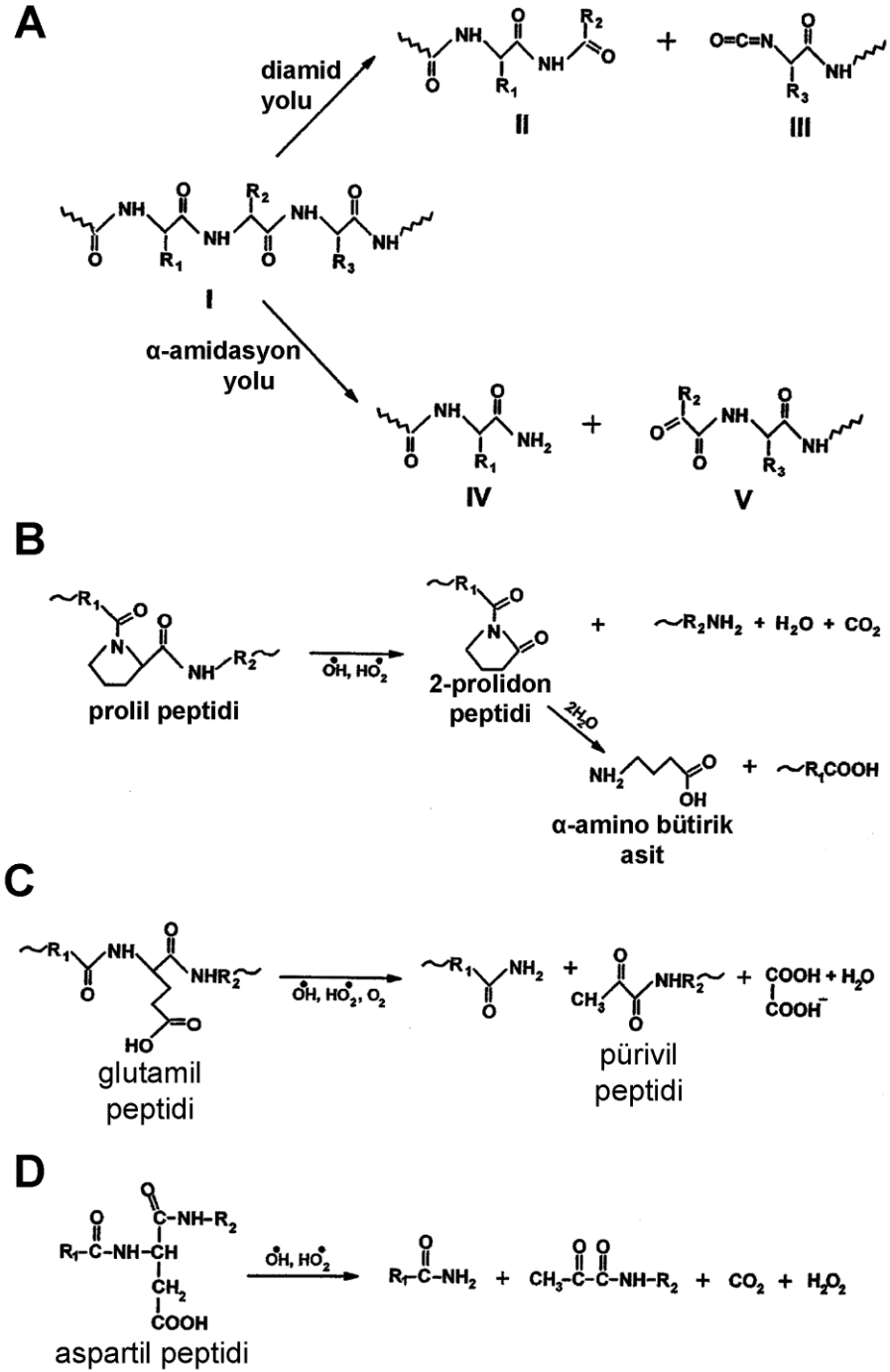
Serbest haldeki veya protein yapısında yer alan amino asitler ROS tarafından oksitlenmeye yatkın olan yapılardır. Protein oksidasyonu ile oluşan hasar, proteinin fonksiyonunu etkilemediği sürece fark edilmez. Fonksiyon etkilendiğinde hastalık ortaya çıkar. Diğer yandan fonksiyon etkilenmese bile, oksitlenmiş proteinlerin bağışıklık sistemi tarafından yabancı olarak algılanması ile de hastalıklar ortaya çıkabilir.

ROS ürünlerinin oluşum mekanizması; amino asit, peptit ve proteinleri iyonize edici radyasyonla oluşan $\text{OH}\cdot$ veya $\text{OH}\cdot$ ve $\text{O}_2\cdot^-$ karışımına maruz bırakarak anlaşılmıştır (103-104). Bu deneyler sonucunda; amino asitlerin veya peptitlerin α -C'undan veya aromatik amino asitlerin yan zincirlerinden $\cdot\text{OH}$ etkisi ile bir H atomu çıkması sonucu, C merkezli radikal olduğu gösterilmiştir. Bu radikal de; O_2 ve ROS varlığında, peroksi radikali, alkil peroksit, alkoksil radikali oluşturarak peptit zinciri oksitlenmektedir. Radyasyonla oluşturulan $\cdot\text{OH}$ ve $\text{HO}_2\cdot$ radikalleri, organizmada H_2O_2 ' den Cu ve Fe etkisi ile oluşabilmektedir.

Proteinlerin oksidasyonu sırasında, alifatik ve aromatik amino asit yan zincirleri hidroksillenebilmekte, sülfidril grupları nitrozillenebilmekte ve disülfid oluşturabilmekte, metiyoninler sülfoksit oluşturabilmekte, aromatik ve primer amino grupları klorlanabilmekte ve bazı amino asit kalıntıları karbonil türevlerine (aldehit ve keton) çevrilebilmektedir. Ayrıca protein çapraz bağları oluşabilmektedir (105).

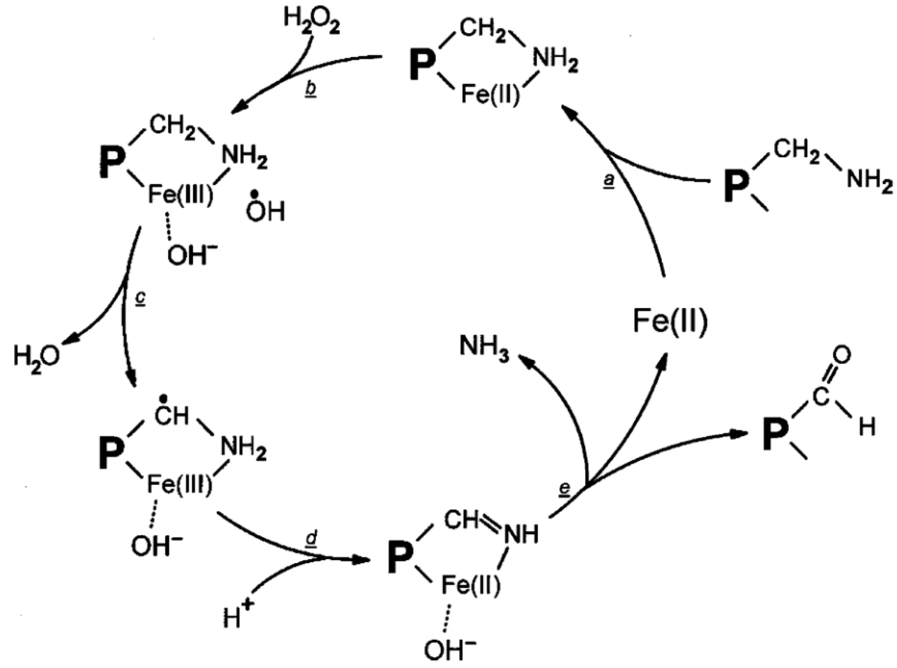
Oksidasyon işlemi sonucunda polipeptit zincirinde aşağıdaki tepkimelerle (Şekil 2.10) karbonil grubu ile beraber kırıklar oluşabilmektedir:

Poliipeptit zincirinin oksidatif yolla parçalanması



Şekil 2.10. Poliipeptit zincirinin serbest radikaller aracılığıyla kırılması. **A-**Diamid ve α -amidasyon yolları üzerinden kırılma **B-** Prolil birimlerinin oksidasyonu ile kırılma **C-** Glutamil birimlerinin oksidasyonu ile kırılma **D-**Aspartil birimlerinin oksidasyonu ile kırılma (105).

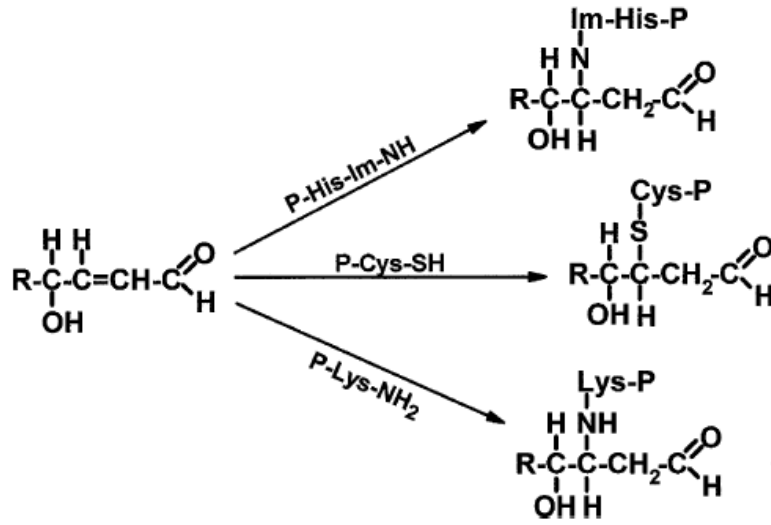
Karbonil grubu oluşumuna yol açan bir diğer oksidasyon türü metalle katalizlenen oksidasyondur (106), bu tip oksidasyonun serbest hale geçen demirden dolayı OHA'da önemli bir etkisi olabilir. Lizin yan zincirinin hedef olduğu Fe^{+2} ile katalizlenen bir oksidasyonu Şekil 2.11'de gösterilmiştir.



Şekil 2.11. Demir ile katalizlenen protein oksidasyonu (106).

Sonuçta; proteindeki lizin, arjinin, prolin ve treonin amino asitlerinin yan zincirleri karbonile dönüşür, histidinden 2-okzo-histidin oluşur.

Proteinler, ROS ile doğrudan etkileşmeden, çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyon ürünlerinin katılımı ile de aşağıdaki şekilde (Şekil 2.12) karbonil grupları oluşturabilirler (107).



Şekil 2.12. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyon ürünlerinin katılımı ile karbonil grubu oluşumu (107).

ROS tarafından etkilenerek yeni karbonil grupları oluşturan amino asit yan zincirleri ve oluşan ürünler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 2.4).

Tablo 2.4. Protein amino asit yan zincirlerinde ROS aracılı oksidasyon

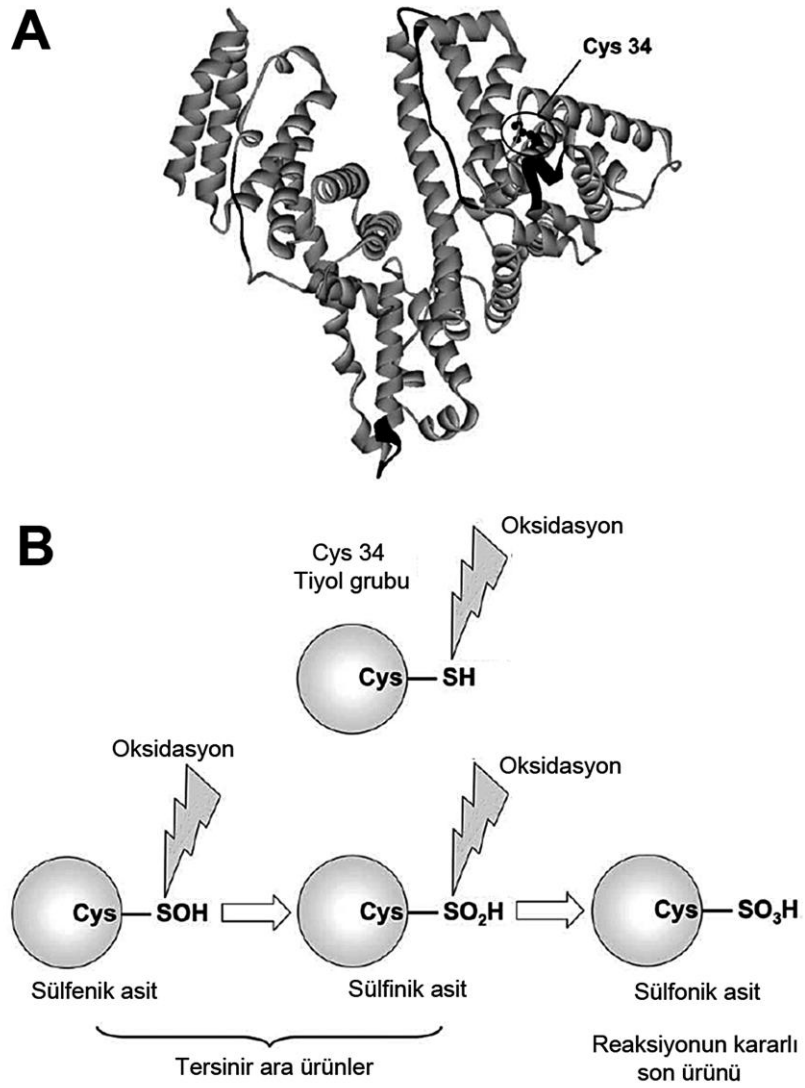
Amino asit	Ürünler	Kaynaklar
Arjinin	Glutamik-semialdehit	(108)
Lizin	2-Amino-adipik-semialdehit	(108)
Prolin	Glutamik-semialdehit	(108)
	2-pirolidon	(109)
	4,5-hidroksiprolin	(110)
	piroglutamik asit	
Sistein	Sistein disülfidleri, Sulfenik asit	(103)
Treonin	2-amino-3-keto bütirik asit	(111)
Lösin	3-,4-,5-hidroksilösin	(103)
Histidin	2-okzo-histidin	(109)

2.6.2. Protein sülfidril grubu oksidasyonu

Genellikle sistein ve metiyonin en duyarlı amino asitlerdir. Diğer oksidasyon mekanizmalarından farklı olarak hücrelerin oksidasyonu geri döndürecek mekanizmaları vardır. Bunlar metiyonin sülfoksit redüktaz, glutatyon veya tiyoredoksin redoks sistemleridir.

Eritrosit membranı hücre iskeleti proteinleri ile sıkı bir ilişki içindedir. Bu ilişkide protein SH grubunun önemi SHI-reaktif ajanların etkisi (112-113) ile gösterilmiştir OHA'da SH grubu değişimi membran proteinlerinde (114) ve Hb'de (115-117) incelenmiş ve normalden farklı olduğu görülmüştür.

Plazmadaki SH grupları esas itibariyle protein kaynaklıdır (118). Protein SH grupları oksidasyon zincirini kırma özelliğine sahip önemli antioksidanlardır. Protein yapısında olup vücutta oldukça fazla miktarda bulunan (40-60 mg/ml) albuminin güçlü bir ekstraselüler antioksidan olduğu gösterilmiştir (12). Albüminde SH grubu oksidasyonu ile oluşan ürünler şekilde gösterilmiştir (Şekil 2.13). Plazma protein SH grupları düzeyi oksidatif hasara karşı hassas olup koroner arter hastalığı (119), diabetes mellitus (120) gibi oksidatif hasarın olduğu hastalıklarda düşmektedir.



Şekil 2.13. Albümin proteinindeki oksidasyon (118).

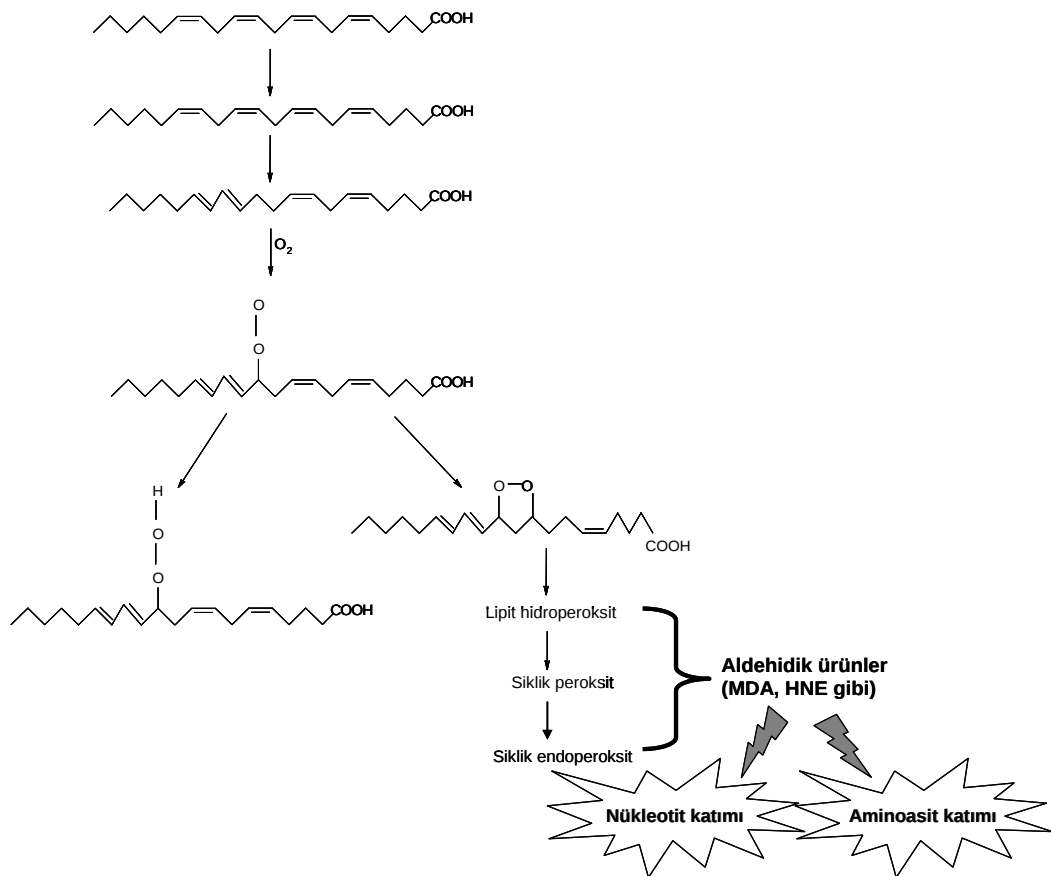
2.6.3. Lipit peroksidasyonu, Malondialdehit oluşumu

Serbest radikal etkisi ile yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidi zincirinin radikal niteliği kazanmasına neden olmaktadır. Oluşan lipit radikali dayanıksız bir bileşik olup, bir dizi değişikliğe uğramaktadır. Öncelikle, molekül içi çift bağ aktarılması (rezonans) ile dien konjugatları oluşmaktadır. Daha sonra, lipit radikalının moleküler oksijen ile reaksiyona girmesi ile lipit peroksit radikali meydana gelmektedir. Bu lipit peroksit radikalleri de zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin

oluşmasını sağlamakta, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit-hidroperoksitlere dönüşmektedir (121).

Otooksidasyon ürünlerinden lipit-hidroperoksitler süperoksit iyonu atakları veya lipoksijenaz aktivitesi ile parçalanarak yeni radikaller üretmeye başlar. İkincil oksidasyon ürünleri olarak tanımlanan bu yapıların şekillenmesi geçiş metalleri iyonlarının katalizi ile olmaktadır. Lipit peroksidasyonu, lipid-hidroperoksitlerin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesi ile sonlanır (122).

Malondialdehit (MDA), non-enzimatik oksidatif lipit peroksitlerinin parçalanması sonucu oluşan toksik etkili son ürünlerden birisidir. İki den fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin otooksidasyonunda veya eikozanoid sentezinde serbestleşen siklik endoperoksitler MDA'nın asıl kaynağını oluşturmaktadır (Şekil 2.14) (123). MDA miktarının ölçümü, lipit peroksit düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır.

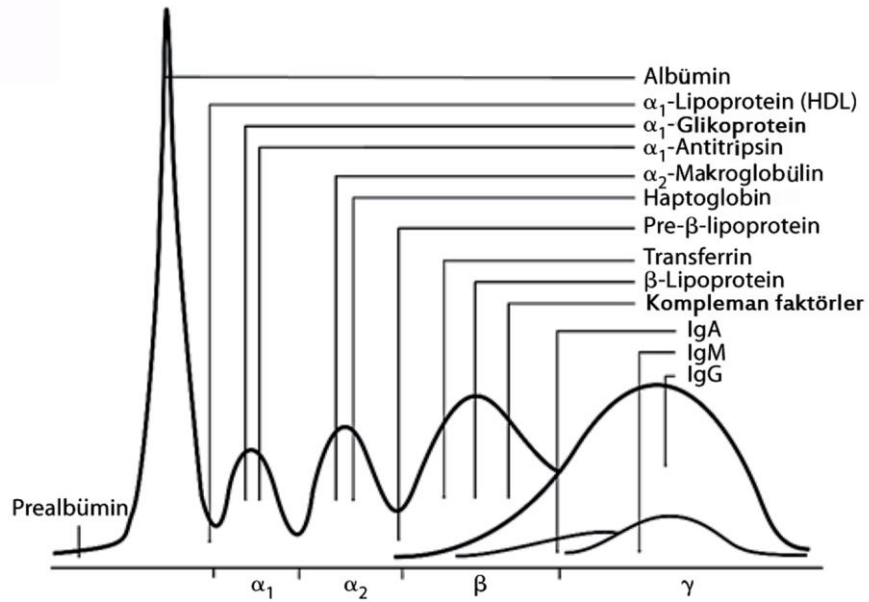


Şekil 2.14. Malondialdehit oluşumu (123).

Lipit peroksidasyonunun; hücre zarının lipit yapısındaki değişiklikler nedeni ile hücre zarı işlevinin bozulması, oluşan serbest radikallerin enzimler ve diğer hücre bileşenleri üzerine etkisi, son ürünler olan aldehitlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden olduğu düşünülmektedir. Her üç olayın da eşit derecede etkili olduğu veya birlikte ya da birbirlerinin ardınca etkili oldukları ileri sürülmektedir. Bununla birlikte, aldehit yapılı bileşiklerin uzun yaşam süreli ve zarları geçebilme özelliğinde olması, hedef organlardaki, lipit peroksidasyonu etkilerinden, bu bileşiklerin sorumlu olabileceğini düşündürmektedir (124).

2.7. Plazma proteinleri ve protein elektroforezi

Plazma protein elektroforezi ile agaroz jelde yürütülen plazma proteinleri; boyut ve elektrik yüküne göre beş ayrı fraksiyona ayrılır. Bunlar albümin, α_1 , α_2 , β , ve γ fraksiyonlarıdır. Albümin plazma proteinlerinin esas bileşenidir, karaciğerde üretilir. Elektroforez grafik çıktısında anoda yakındır, solda yer alır, en büyük piki oluşturur (Şekil 2.15). Globülinler toplam protein içeriğinde daha küçük bir yere sahiptir, dört ardışık pik katoda doğru yerleşim gösterir, γ piki katoda en yakın olanıdır.



Şekil 2.15. Protein elektroforezinde proteinlerin fraksiyonlara dağılımı (125).

3. BİREYLER VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan kimyasal bileşikler

Tris(hidroksimetil)aminometan, metanol, trikloroasetik asit, hidroklorik asit, etanol, etil asetat, üre, aseton, trikloroasetik asit çözeltisi, n-hekzan, kloroform, asetik asit, dietil eter, sodyum klorür, di-sodyum hidrojen fosfat, potasyum fosfat monobazik, tiyobarbitürik asit, n-butanol, sülfürik asit, tetramethoxypropane, bütile edilmiş hidroksitoluen, albümin bovin fraksiyon, hidrojen peroksit, potasyum hidroksit, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Almanya); 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoik asit), l-a-fosfatidil inozitol, l-a-fosfatidil kolin, Drabkin reaktifi, etilendiamintetraasetik asit, Hb standart, Brij35 (Sigma, ABD); 2,4-dinitrofenilhidrazin Fluka'dan; $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (BHD, İngiltere), kalsiyum standardı (Perkin Elmer) kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Sıcak su banyosu (BM 302 Nüve), vorteks (Cenco instrument whirlmix), vorteks (MS2 minishaker, IKA), spektrofotometre (UV-1601 Shimadzu), ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (Torrey-Pines Scientific), mikrofüj (Heraeus Biofuge A), buzdolabı (Arçelik), derin dondurucu (Arçelik), pHmetre (Consort C 830), soğutmalı süpersantrifüj (Supra21K), klinik santrifüj (Nüve), hassas terazi (Mettler Toledo), fırın (Elektro Metal Kollektif Şirketi), atomik absorpsiyon spektrofotometri cihazı (Analyst-800, Perkin Elmer), yüksek basınçlı sıvı kromatografi cihazı (Agilent, 1200 Series), elektroforez (Hydrasys instrument, SEBIA), distile su cihazı (Nano Pure Infinity), buz makinesi (Fiocchetti).

3.2. Bireyler

Hasta, taşıyıcı ve sağlam kan örnekleri; Haziran 2008 ve Mayıs 2009 tarihlerinde 2 ayrı grup halinde toplanmıştır. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden etik kurul izni alınmıştır (18.06.2007, 06/06). Grupların özellikleri aşağıdaki gibidir.

3.2.1. I. grup (Haziran 2008)

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalığı Bölümü, Hematoloji kliniğinde düzenli takip edilen, genel durumu stabil, iki ay ve daha uzun süredir kriz geçirmemiş ve transfüzyon almamış, orak hücre hastası ($n=15$) ve orak hücre taşıyıcısı ($n=13$) çocuklar çalışmaya dahil edildi. OHA ve taşıyıcılık tanısı elektroforez ve HPLC ile konulmuştur, ayrıca genotiplendirme yapılmıştır. Sağlıklı çocuklar ($n=10$), akut veya kronik herhangi bir sağlık problemi olmayan, büyüme ve gelişimi normal, benzer yaş grubundaki çocuklardan seçilmiştir

3.2.2. II. grup (Mayıs 2009)

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalığı Bölümü, Hematoloji kliniğinde düzenli takip edilen, genel durumu stabil ve üç ay veya daha uzun süredir kriz geçirmemiş, transfüzyon almamış, hastalar ($n=15$) çalışmaya dahil edildi. Taşıyıcı çocuklar ($n=10$), kardeş veya akrabalarından oluşmaktaydı. OHA ve taşıyıcılık tanısı elektroforez ve HPLC ile konulmuştur, ayrıca genotiplendirme yapılmıştır. Sağlıklı çocuklar ($n=10$), akut veya kronik herhangi bir sağlık problemi olmayan, büyüme ve gelişimi normal, benzer yaş grubundaki çocuklardan seçilmiştir.

3.3. Kan örneklerinin alınması, plazma eldesi, eritrosit paketinin hazırlanması

Hastalardan, 12 saat açlık sonrası, 10 ml kan EDTA' lı tüplere alındı. Kan örnekleri klinik santrifüjde 3000 rpm' de 10 dk çevrildikten sonra, plazma pastör pipetiyle ayrıldı, ependorf tüplere bölünerek -20 °C' ye kaldırıldı. Lökosit tabakası ortamdan uzaklaştırıldı. Elde edilen eritrosit çökeleği 1:1 oranında serum fizyolojik içinde süspanse edildi. Bu süspansiyon ortamda kalan plazma ve lökositleri uzaklaştırmak amacıyla, 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Aynı işlem iki kez tekrarlandı ve eritrosit paketi elde edildi. Paket ependorf tüplere bölünerek -20 °C' ye kaldırıldı. Örnekler Mersin'den Ankara'ya kuru buz içinde nakledildi. -20 °C' ye aktararak çalışma gününe kadar saklandı.

3.4. Yöntemler

3.4.1. Total Protein Tayini (Biüret Yöntemi)

Bu yöntem, alkali koşullar altında Cu^{2+} iyonlarının amonyum, aminoasitler, peptidler, proteinler ve biüretler gibi amonyumlu bileşiklerle mavi-mor renkli kompleks oluşturması esasına dayanır (126). Protein ve peptitlerde, iki peptid bağı oluşumuna katılan 4 azot atomu ile biüret ayırıcından gelen Cu^{2+} 'nin renkli bileşik oluşturması esastır. Oluşan bu kompleksin absorbansı 550 nm'de ölçülür.

Biüret reaktifi, 9 gr Na-K tartarat 400 ml 0,2 N NaOH'de çözüldükten sonra 3 gr CuSO_4 ve 5 gr KI eklenip son hacim su ile 1000 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. Albümin standardı, 10 mg/ml olacak şekilde, bovin serum albumin kullanılarak distile su içinde hazırlandı. Deneye başlamadan önce plazma örnekleri 10 kez seyreltildi. 200 μl örnek veya standarda 1 ml Biüret reaktifi eklendi, 20 dk. oda ısısında bekletildi. Reaktif körü yanında, örnek körü de hazırlandı. Absorbans 550 nm'de ölçüldü.

3.4.2. Hemoglobin tayini

Alkali potasyum ferrisiyanit varlığında Hb ve türevlerinin oksitlenerek MetHb'e dönüşmesi esasına dayanır. MetHb potasyum siyanitle reaksiyona girerek siyanmetHb oluşturur (127). Bu bileşik 540 nm'de maksimum absorbans verir.

Sodyum bikarbonat, potasyum ferrisiyanit ve potasyum siyanit içeren Drabkin reaktifi hazır olarak alındı. Firmanın talimatlarına uygun olarak hazırlandı. Oda ısısında, karanlıkta, amber şişede saklandı. Drabkin çözeltisinin pH'sı 7,2 civarında olup, açık sarı renkli berrak bir çözeltidir. 540 nm'de suya karşı absorbansı sıfırdır. Çözeltiye eklenen deterjan, eritrosit stromasından ve protein presipitatlarından kaynaklanabilecek bulanıklığı önler.

Siyanmethemoglobin standart çözeltisi, 180 mg/ml Hb olacak şekilde Drabkin çözeltisinde hazırlandı, 2-8 °C' de karanlıkta saklandı. Bundan da 60 ve 120 mg/ml'lik standartlar hazırlandı. Deneyde 5 ml Drabkin çözeltisine 20 μl örnek veya standart eklenerek, 15 dk bekletildi. Absorbans 540 nm'de Drabkin çözeltisine karşı (kör) ölçüldü.

3.4.3. Malondialdehit tayini

MDA düzeyleri Draper ve Templar'ın metotları esas alınarak uyarlanan yöntemle çalışıldı (128). Organik çözücüyle ekstre edilen pembe renkli MDA-TBA katım ürününün flöresans özelliğinden yararlanarak basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) flöresans detektör sisteminde saptandı.

250 µl plazma ve eritrosit hemolizati (50 µl paket + 200 µl dH₂O) üzerine 650 µl %5' lik TCA ve 100 µl metanol içinde çözünmüş 500 ppm bütile edilmiş hidroksi toluen eklenip, vortekslendi. Payreks tüpler içindeki örnekler daha sonra 30 dk kaynar su banyosunda bekletildi. Süre sonunda su banyosundan alınıp buz içinde soğutulan örnekler 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Üst fazın 500 µl' si üzerine 500 µl doymuş tiyobarbitürik asit çözeltisi eklendi ve vortekslemeyi takiben örnekler kaynar su banyosunda 30 dk daha inkübe edildi. Daha sonra 500 µl örnek 1000 µl butanol ile 30 saniye vortekslenerek n-butanol içine ekstre edildi. Faz ayrımını kolaylaştırmak için 1500 devir/dk' da 5 dk santrifüj edildi. Üstteki MDA-TBA katım ürününü içeren n-butanol fazı 14000 rpm' de 15 dk santrifüj edilmeyi takiben HPLC kolonuna enjekte edildi.

HPLC sistemine ait bilgiler:

Kolon: 250x4,6 mm boyutlarında, "chromospher" C18 kolon

Detektör: Agilent 1200 serisi markalı floresans detektörlü HPLC sistemi (eksitasyon dalga boyu 532 nm, emisyon dalga boyu 553 nm'ye ayarlanarak kullanıldı).

Hareketli faz: %65 metanol ve %35 oranında 50 mM KOH - 50 mM KH₂PO₄ karışımıyla pH' sı 7.0 fosfat tamponundan oluşan karışım

Akış hızı: 0,6 ml/dk

Enjeksiyon hacmi:100 µl

Analiz süresi: 8 dk

3.4.4. Protein karbonil tayini

Plazma protein karbonil düzeylerinin ölçümünde, Levine'in yöntemi kullanıldı (129). Bu yöntem 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile protein yapısında bulunan karbonil gruplarının oluşturdukları dinitrofenilhidrazonların renk şiddetinin 360 nm dalga boyunda ölçülmesine dayanır. 0,1-1 mg protein içeriği için iyi sonuçlar verir.

50 µl plazmaya 100 µl 2 N DNPH eklendi. Oda ısısında, karanlıkta 1 saat bekletildi, her 10 dk' da tüpler vortekslendi. Bu sürenin sonunda tüplere 150 µl %20 TCA eklendi. 13000 rpm' de 3 dk santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet, 150 µl etanol:etil asetat (1:1, [v/v]) 'la 3 kez yıkanarak süpernatant atıldı, lipid kalıntıları ve serbest DNPH uzaklaştırıldı. Pelet 1 ml 1 M NaOH içinde 37 °C'de 15 dakika bekletilerek çözüldü. Numunenin absorbansı NaOH körüne karşı 360 nm' de okundu. $\epsilon_{\text{max}} = 22000/\text{M.cm}$ değeri kullanılarak sonuçlar mol karbonil /mg protein olarak verildi.

3.4.5. Total SH tayini

Serbest tiyol gruplarının bazik ortamda DTNB ile sarı renkli bir bileşik oluşturması ve bu bileşiğin renginin 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Sedlak ve Lindsay'den modifiye edilen yöntem kullanılmıştır (130).

0,01 M DTNB hazırlığı için 99 mg DTNB 25 ml metanol içinde çözüldü, amber şişede saklandı. 200 µl örneğe, 600 µl Tris tamponu (0,2 M, pH=8,2), 40 µl DTNB ve 3160 µl metanol eklendi. Reaktif köründe plazma yerine 200 µl dH₂O, örnek körüne de DTNB yerine 40 µl dH₂O eklendi. Tüplerin kapakları kapatılıp, alt üst edildi, ara sıra çalkalanarak 15 dk bekletildi. Oda sıcaklığında 3000 g'de 10 dk santrifüj edildi. 412 nm dalga boyunda absorbans okundu. Hesaplamalarda $\epsilon_{\text{max}}=13600/\text{M.cm}$ değeri kullanıldı.

3.4.6. Plazma protein elektroforezi

6 hasta ve 5 sağlama ait plazma örnekleri kullanıldı. Üre muamelesi olarak; 50 µl plazma örneğine, son konsantrasyon 3M olacak şekilde, %0,9 NaCl'de çözülmüş üre eklendi, 24 saat 30 °C' de inkübe edildi. Muamele yapılmayan örneklerle de aynı hacimde %0,9 NaCl eklendi.

Üreli ve üresiz olarak inkübe edilen plazma örnekleri, yarı otomatik protein elektroforezi cihazında, hazır ticari jel (Hydragel 15) kullanılarak yürütüldü. İşlemler esnasında üretici firmanın talimatlarına uyuldu. Yürütme sonrası jeller kit içinde yer alan reaktiflerle boyandı, cihazın jel işlem kısmında boyadan arındırıldı ve kurutuldu. Jel fraksiyonlarının değerlendirilmesi cihazdaki yazılım tarafından gerçekleştirildi.

3.4.7. Total kolesterol tayini

Enzimatik, kolorimetrik yöntemle SPINREACT kolesterol (CHOD-PAP) kiti kullanılarak belirlendi. Yöntem, kolesterol ve esterlerinin deterjanlar tarafından lipoproteinlerden ayrılması, kolesterol esteraz tarafından esterlerin hidrolize edilmesi ve kolesterol oksidaz aracılığıyla kolesterolün enzimatik oksidasyonu sonucu H_2O_2 oluşturulması esasına dayanır. H_2O_2 de 4-aminofenazon ve fenol ile kinomin renkli bileşimini oluşturur. Kırmızı renkli kinomin miktarı, kolesterol konsantrasyonu ile orantılıdır.

Çalışma solüsyonu reaktif 1 ve 2'nin karıştırılmasıyla hazırlandı. Reaktif 1, 90 mmol/L pipes (pH 6,9) ve 26 mmol/L fenol içerir. Reaktif 2, 1250 U/L peroksidaz, 300 U/L kolesterol esteraz, 300 U/L kolesterol oksidaz ve 0.4 mmol/L 4-aminofenazon içerir. Deneylerde kullanılan standart kolesterol solüsyonu 200 mg/dL konsantrasyondadır. 10 µl örneğe ve standarda 1 ml çalışma solüsyonu eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk beklendikten sonra absorbans köre karşı 505 nm'de okundu.

3.4.8. Trigliserit tayini

Enzimatik, kolorimetrik yöntemle SPINREACT TG (GPO-POD) kiti kullanılarak belirlendi. Bu yöntemde TG'ler, lipoprotein lipaz ile hidrolize olur, gliserol ve yağ asitleri açığa çıkar. Serbest kalan gliserol, gliserol kinaz ve gliserol-3-fosfat oksidazla reaksiyona girer ve dihidroksiasetonfosfat ve H_2O_2 üretir. H_2O_2 konsantrasyonu Trinder reaksiyonu vasıtasıyla, 4-aminofenazon ve p-klorofenol kullanılarak, kinomin oluşumu üzerinden tespit edilir.

Çalışma solüsyonu reaktif 1 ve 2'nin karıştırılmasıyla hazırlandı. Reaktif 1 50 mmol/L GOOD tamponu (pH 7,5), 2 mmol/L p-klorofenol içerir. Reaktif 2'de 150000 U/L lipoprotein lipaz, 500 U/L gliserol kinaz, 2500 U/L gliserol-3-oksidad, 440 U/L peroksidaz, 0,1 mmol/L 4-aminofenazon, 0,1 mmol/L ATP içerir. Standart konsantrasyonu 200 mg/dL'dir. 10 µl örneğe ve standarda 1 ml çalışma solüsyonu eklendi. 10 dk beklendikten sonra absorbans köre karşı 505 nm'de okundu.

3.4.9. Plazmada fosfolipit tayini

Plazma lipit ekstresinin eldesi için 150 µl plazmaya 5 ml Ethanol: Dietileter (1:2) eklendi, ara ara vortekslenerek 15 dakikada ekstraksiyon tamamlandı. 2500 devirde 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant ayrıldı, hacmi ölçüldü. 2 ml süpernatant 50 ml'lik cam tüpe aktarıldı, 50 °C 'de uçuruldu. Uçurma tamamlandıktan sonra 500 µl H₂SO₄ eklenerek 150 °C'de 3,5 saat yakıldı. 2 damla H₂O₂ eklendikten sonra yakma işlemi 1,5 saat sürdürüldü. Fosfat tayini kit kullanılarak gerçekleştirildi.

Plazmadan elde edilen lipit ekstresinde fosfat tayini yapılarak, fosfolipit hesabına gidildi. Fosfat tayini için Spinreact Fosfor (Phosphomolybdate, UV) kiti kullanıldı. Yöntem inorganik fosforun (Pi) amonyum molibdat ve sülfirik asitle fosfo-inorganik molibdat bileşiğini oluşturmaya dayanır. Bileşik absorbansı ultraviyolede maksimumdur ve bunun oluşumu 340 nm'de takip edilir.

Reaktif, 210 mM sülfirik asit, 0,40 mM amonyum molibdat ve deterjan içerir. Standart 5 mg/dL (1,8 mmol/L) fosfor solüsyonu bulundurur. 10 µl örneğe ve standarda 1 ml reaktif eklendikten sonra oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Köre karşı 340 nm'de absorbans ölçüldü. Fosfolipit hesabı, fosfolipitlerin ağırlıkça %2,2'sinin Pi olduğu kabullenmesine göre yapıldı.

3.4.10. Hemolizat lipit ekstresinin elde edilmesi

"Folch" yöntemi (131) esas alınarak eritrosit paketi önce 1: 1 sonra 1: 5 oranında distile su ile seyreltilerek hemolizat elde edildi. 1 ml hemolizat 50 ml'lik cam kapaklı mezüre aktarıldı, üzerine 1 ml dH₂O eklenerek 50°C'de 30 dakika bekletildi. Daha sonra 10 ml kloroform: metanol (2: 1) eklendi, tüp kuvvetlice çalkalandı. 50°C' de 1 saat süresince, ara sıra çalkalanarak, ekstraksiyon gerçekleştirildi. Karışım 2000 devir/dk' da 10 dk santrifüj edildi. Alttaki kloroform fazı alınarak trigliserit ve kolesterol tayini gerçekleştirildi. Ayrıca hemolizat 18000 rpm' de, 20 dk süreyle santrifüj edilerek göst ve sitozol elde edildi. Bunlardan da yukarıda belirtildiği biçimde lipit ekstraksiyonu yapıldı.

3.4.11. İnce tabaka kromatografisi

Deneylerde 20x20 cm boyutlarında, 0,20 mm kalınlığında ticari Silika jel 60 (ALUGRAM® SIL G, Machery Nagel) tabakaları kullanıldı. Örnek olarak; hemolizat, gost ve sitozolden elde edilen lipid ekstraktları kullanıldı. Polar olmayan lipidlerin ayırımında yürütme çözeltisi olarak, hegzan/dietileter/asetik asit (90:10:1[v/v/v]) kullanıldı. Polar lipidlerin ayırımında yürütme çözeltisi olarak, kloroform/ metanol/ asetik asit/ dH₂O (60:50:1:4 [v/v/v/v]) kullanıldı. Noktalar 150°C fırında, karbonizasyonla belirlendi.

3.4.12. Çinko, Bakır, Demir, Kalsiyum tayini

Plazma ve hemolizatta Cu, Fe, Zn ve Ca düzeyleri alev atomizörlü ve döteryum lambalı Atomik Absorpsiyon Spektrofotometri cihazıyla ölçüldü. Kullanılan pipetler ve diğer cam malzeme en az 1 saat sulfokromik asit karışımında (konsantre sülfirik asit çözeltisinde doyurulmuş potasyum dikromat) bekletilerek deiyonize su ile yıkandı. Stok standart çözeltiler elementlerin nitrat tuzları, ve deiyonize su ile 1000 mg/L olacak şekilde hazırlandı. Ca için standart çözelti Perkin Elmer Pure, Atomic Spectroscopy Standard, (1000 µg L⁻¹) kullanılarak hazırlandı. Plazma ölçümlerinde 15 kez seyreltme, sadece Ca için 30 kat seyreltme uygulandı. Hemolizat ölçümlerinde ise 10 kez seyreltme, sadece Fe için 70 kez seyreltme uygulandı. Cu (II) için 324,8 nm, Ca (II) için 422,7 nm, Zn (II) için 213,9 nm ve Fe (III) için 248,3 nm dalga boyları ile ölçüm yapıldı. Plazmada Ca düzeyi, hemolizatta ise Fe düzeyi mg/dL olarak, diğer tüm iyon düzeyleri ise µg/dL olarak ifade edildi.

3.4.13. Total bilirubin tayini

Total bilirubin ölçümü otoanalizörde Roche Diagnostics (Bil-T, Bilirubin DPD, Cobas) kiti kullanılarak yapıldı. İndirekt bilirubinin deterjanla salınması sonrasında, total bilirubin 2,5-diklorofenil diazonyum tetrafloroborat (DPD) ile kuvvetli asidik (pH=1-2) ortamda azobilirubin bileşiğini oluşturması esasına dayanır. Oluşan rengin şiddeti bilirubin konsantrasyonuyla doğru orantılıdır, 546 nm'de absorbans okunur (132). Reaktif 1, 100 mmol/L HCl ve Reaktif 2, 100 mmol/L HCl ile 3 mmol/L DPD içerir.

3.4.14. Methemoglobin düzeyi tayini

Potasyum siyanid (KCN) ve Potasyum Ferrisiyanid ($K_3Fe(CN)_6$) kullanılarak spektrofotometrik yöntemle (133) yapıldı. Örnek olarak EDTA'lı taze tam kan kullanıldı.

3.4.15. İstatistiksel Değerlendirme

Bulgular SPSS paket programıyla (SPSS 15.0 for Windows) değerlendirildi. Sonuçlar aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak ifade edildi. Grupların karşılaştırılmasında nonparametrik testler kullanıldı. İki grubun ortalamasını karşılaştırırken “Mann Whitney U” testi, ikiden çok grubun karşılaştırılmasında “Kruskal Wallis” varyans analizi kullanıldı. Değişkenler arasındaki korelasyonlar “Spearman” korelasyon katsayısıyla ifade edildi. $P<0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. I.Grup örnekler (2008 yılı)

Hastaların yaş, cinsiyet, tanı, Hb, ferritin, ALT ve AST düzeyleri, aldıkları tedaviler, en son bakılan HbS ve HbF yüzdeleri (dosyalarında kaydedilmiş olan) Tablo 4.1' de sunulmuştur.

Tablo 4.1. I. Grup hastaların genel özellikleri

Hasta	Yaş	Cins	Tanı	Hb (g/dL)	Ferritin (ng/ml)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Tedavi			HbS (%)	HbF (%)
								HÜ	Zn	FA		
SS	11	E	SS	8,7	616	24	48	+	-	+	85,5	6,4
İCO	12	E	SB		96	12	34	+	-	-	70,8	23
NŞ	4	K	SS	9,1	878	34	28	+	-	+	64	2,8
ZGÜ	15	K	SS	8,9	272	87	78	+	-	+	72	4,8
YSA	13	K	SS	9,2	640	35	36	+	-	+	86	9
EA	4	E	SB	7,2	108	5		-	-	+	72	22,2
KA	3	E	SB	9,4	1415	24	48	+	+	-	72	2,6
ZA	4	K	SB	9,3	3020	24	32	+	+	+	46,7	3,8
MNU	13	K	SS	9,2	388	17	27	-	-	+	88	6,4
DE	9	K	SB	8	76	10	32	+	-	+	64	28
EN	4	E	SS	9,4	321	38	24	+	+	+	88	3
AT	12	E	SB	7,8	34	19	49	+	-	+	64	9,6
HİB	9	E	SS	13,4	58	12	27	-	-	+	42,3	0,5
OÖ	7	E	SS	7,4	488	29	22	+	+	+	88	44
NT	8	K	SS	9,4	38	14	26	-	-	+	60	20

Çalışma kapsamına alınan OHA hastalarının yaş ortalaması $8,8 \pm 4,2$, taşıyıcıların $7,8 \pm 4,0$ ve sağlıklıların $10,9 \pm 3,0$ bulundu. Gruplar yaş bakımından istatistiksel olarak fark göstermedi.

OHA hastası, taşıyıcısı ve sağlam çocukların plazmalarının total protein, düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Hasta, taşıyıcı ve sağlıklı çocuklarda total protein düzeyleri

	Hasta (n=15)	Taşıyıcı (n=13)	Sağlam (n=10)	p*
Total protein(g/dL)	7,5 ± 1	7,2 ± 0,4	6,9 ± 0,9	0,199

Ortalama ± SD

*Kruskal Wallis varyans analizi

OHA hastası, taşıyıcısı ve sağlıklı çocuklara ait ortalama kolesterol düzeyleri Tablo 4.3’de sunulmuştur. Ortalama kolesterol düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark vardı (p=0,002) ve bu fark hastalara ait kolesterol düzeylerinin, taşıyıcılardan (p=0,007) ve sağlamlardan (p=0,001) daha düşük olmasından kaynaklanmaktaydı. Taşıyıcı ve sağlam çocuklara ait kolesterol düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmadı (p=0,349).

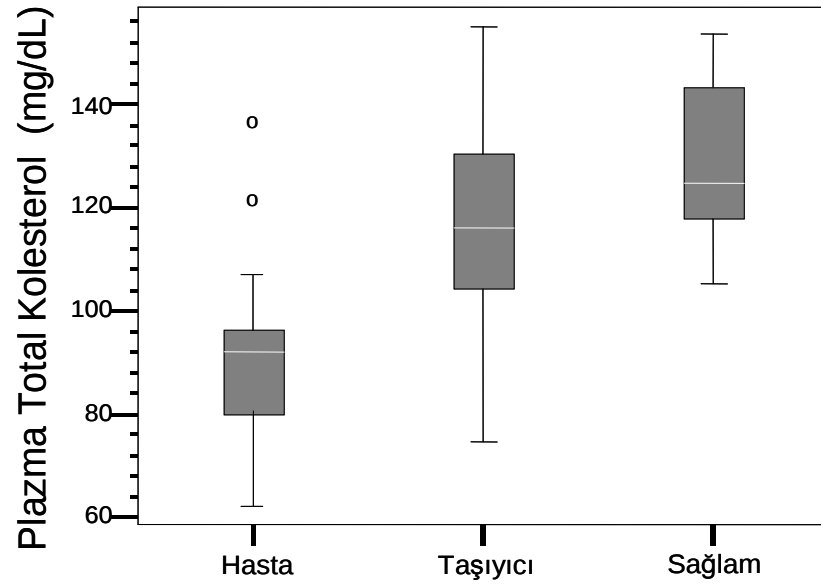
Tablo 4.3. Hasta, taşıyıcı ve sağlam çocuklarda plazma total kolesterol, plazma ve hemolizat MDA düzeyleri

	Hasta (n=13)	Taşıyıcı (n=11)	Sağlam (n=10)	p*
Total kolesterol (mg/dL)				
Plazma	91,82±18,93	118,39±23,62	126,60±16,36	0,002
MDA (nmol/L)				
Plazma	25,36±1,62	18,93±0,67	19,64±0,80	<0,001
Hemolizat	89,61±24,94	56,35±10,10	56,81±9,25	<0,001

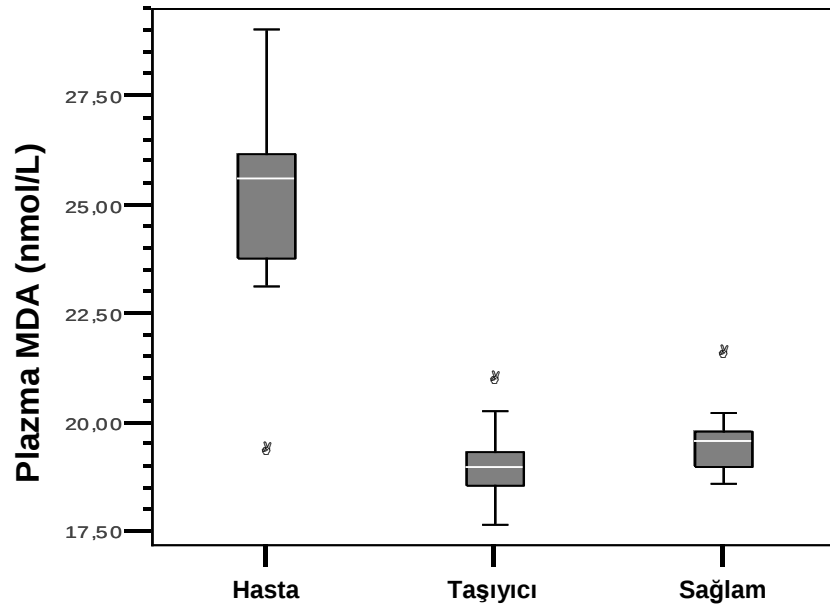
Ortalama ± SD

*Kruskal Wallis varyans analizi

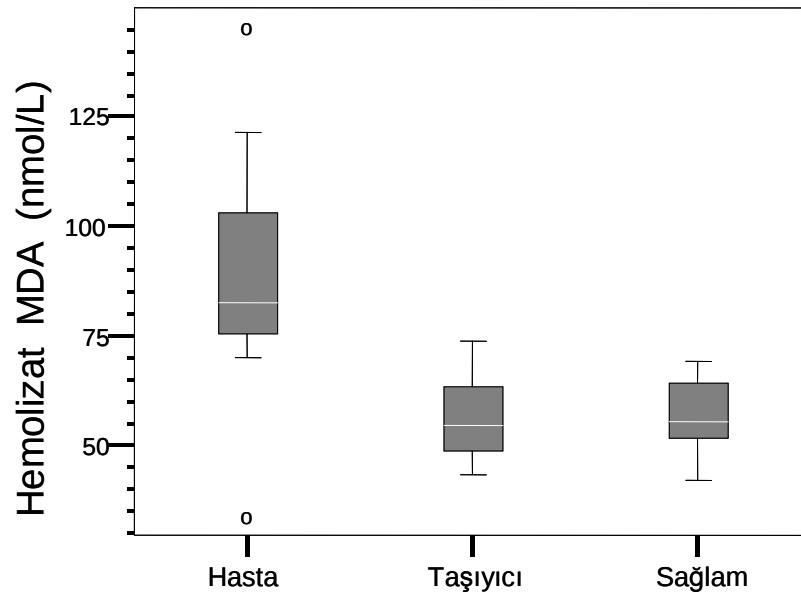
OHA hastası, taşıyıcısı ve sağlam çocuklara ait total kolesterol ve MDA düzeylerinin dağılımı Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’de sunulmuştur.



Şekil 4.1. Plazma total kolesterol düzeylerinin hasta, taşıyıcı ve sağlam gruplardaki dağılımı.

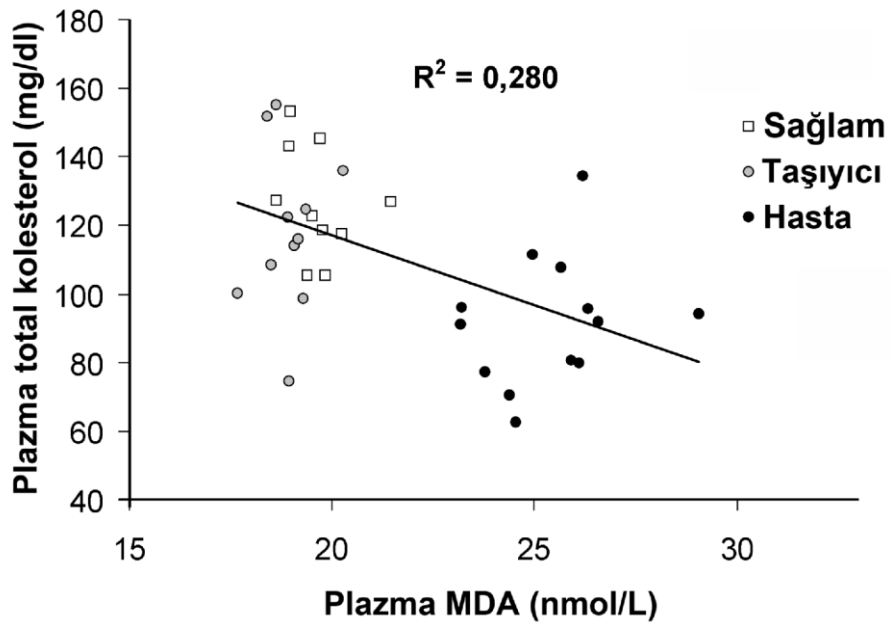


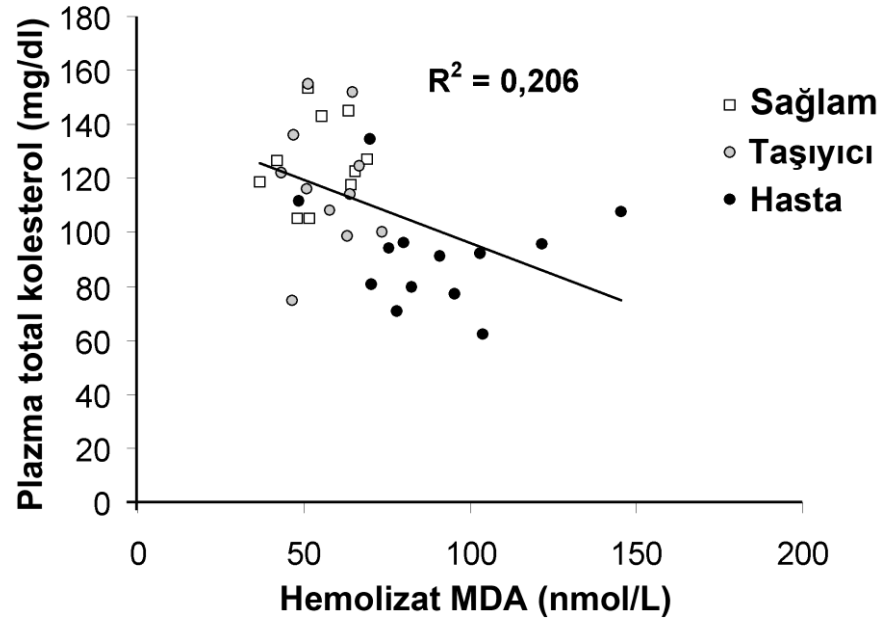
Şekil 4.2. Plazma MDA düzeylerinin hasta, taşıyıcı ve sağlam gruplarındaki dağılımı.



Şekil 4.3. Hemolizet MDA düzeylerinin hasta, taşıyıcı ve sağlam gruplarındaki dağılımı.

Tüm olgular dikkate alındığında total kolesterol ve plazma MDA düzeyleri arasında negatif korelasyon ($r=-0,501$ $p=0,003$) saptandı (Şekil 4.4). Total kolesterol ve hemolizet MDA arasında da negatif korelasyon bulundu (Şekil 4.5).





Şekil 4.5. Plazma total kolesterol ve hemolizat MDA düzeyleri arasındaki ilişki.

4.2. II. Grup örnekler (2009 yılı)

Hastaların yaş, cinsiyet, tanı, Hb, ferritin, ALT ve AST düzeyleri, aldıkları tedaviler, en son bakılan HbS ve HbF yüzdeleri (dosyalarında bulunan)Tablo 4.4’de sunulmuştur.

Tablo 4.4. II. Grup hastaların genel özellikleri

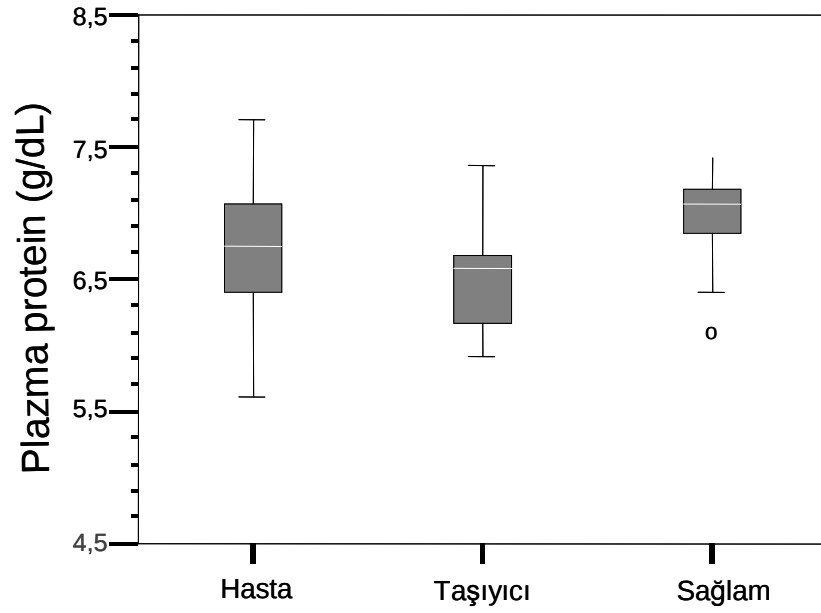
Hasta	Yaş	Cins	Tanı	Hb (g/dL)	Ferritin (ng/mL)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Tedavi			Hb S (%)	Hb F (%)
								HÜ	Zn	FA		
PSG	14	K	SS	8,9	761	37,7	42,18	+	-	+	55	17
NA	10	K	SS	8,1	910	15	23	+	-	+	54	8,9
İCO	13	E	SB	8,7	40	14	35	+	-	+		
AT	12	E	SB	7,8	38	55	5	+	-	+		
NT	8	K	SS	9,5				-	-	+		
BCO	14	E	SS	6,4	128	31	76	+	+	+	84,6	10,2
İK	4	K	SS	8,9	149	12	39		-	+		
DE	10	K	SB					+	-	+		
AÇ	12	E	SS	7,8	16			-	-	+	57,3	9,3
MK	3	K	SS	9,4	116	15	34	-	+	+	70	23,7
VE	15	E	SB	9	2379	20	29	+	+	+	84,3	14,4
ES	9	K	SS	8,2	541	22	33	+	+	+	66,4	10
DS	8	E	SB	9	3724	108	79	+	-	-	42	3,5
CK	9	E	SB	8,6	294	45	25	+	-	+	55,2	12,5
AYK	7	E	SS	8,4	432	12	34	+	-	+	83,1	10,7

Çalışma kapsamına alınan 15 OHA hastasının yaş ortalaması $9,8 \pm 3,6$, taşıyıcıların $12,3 \pm 5$ ve sağlamların $10,8 \pm 3,7$ bulundu. Gruplar yaş bakımından istatistiksel olarak fark göstermedi.

4.2.1. Protein çalışmaları

Total protein düzeyleri

Plazma total protein düzeyleri OHA hastalarında $6,7 \pm 0,6$ g/dL, taşıyıcılarda $6,6 \pm 0,4$ g/dL ve sağlam çocuklarda $7,0 \pm 0,4$ g/dL bulundu (Tablo 4.5), gruplar arasında fark yoktu (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Plazma protein düzeylerinin hasta, taşıyıcı ve sağlam gruplarındaki dağılımı.

Bilirubin (Hemoglobin yıkım ürünü) düzeyleri

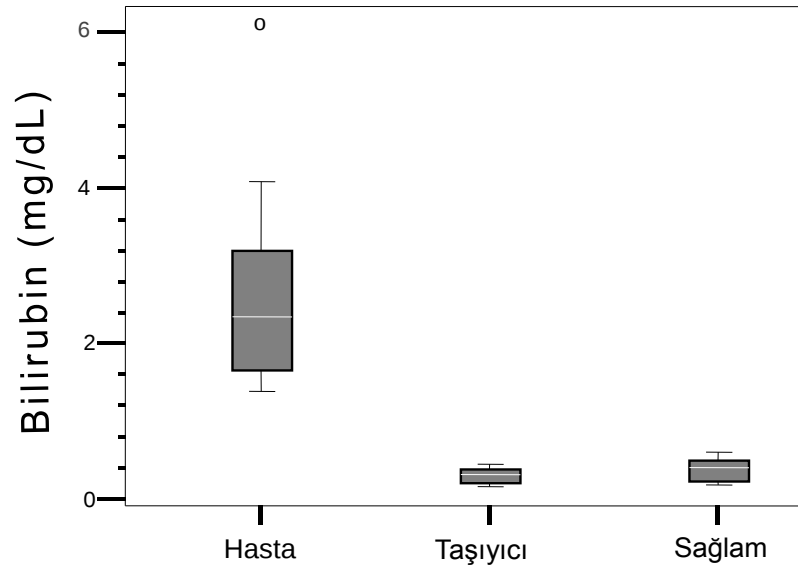
OHA hastalarında ortalama bilirubin düzeyleri $2,64 \pm 1,28$ mg/dL iken taşıyıcılarda $0,30 \pm 0,10$ mg/dL ve sağlamlarda $0,37 \pm 0,14$ mg/dL bulundu (Tablo 4.5). Hastaların bilirubin düzeyleri, taşıyıcı ve sağlamlara göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0,001$) (Şekil 4.7). Taşıyıcı ve sağlam arasında fark bulunmadı.

Tablo 4.5. OHA hastaları, taşıyıcıları ve sağlam çocuklarda ortalama plazma bilirubin, protein karbonil ve toplam SH düzeyleri

	Hasta (n=15)	Taşıyıcı (n=10)	Sağlam (n=10)	p*
Total Protein (g/dL)	$6,7 \pm 0,6$	$6,6 \pm 0,4$	$7,0 \pm 0,4$	0,145
Bilirubin (mg/dL)	$2,64 \pm 1,28$	$0,3 \pm 0,1$	$0,37 \pm 0,14$	$< 0,0010$
Total SH (nmol/L)	$417,4 \pm 77,9$	$457,5 \pm 106,3$	$522,6 \pm 77,2$	0,034
Protein Karbonil (nmol/mg prt)	$0,93 \pm 0,15$	$0,74 \pm 0,08$	$0,82 \pm 0,05$	0,001

Ortalama $\pm$ SD

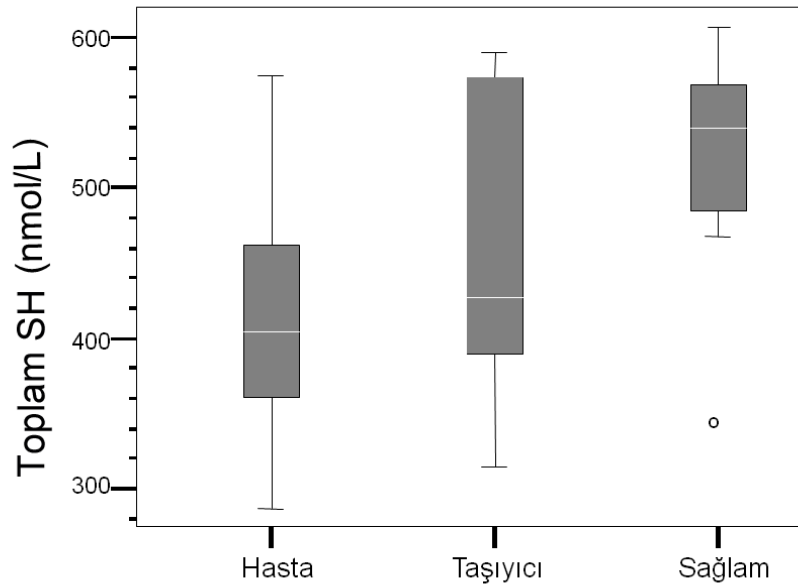
*Kruskal Wallis varyans analizi



Şekil 4.7. Toplam bilirubin düzeylerinin hasta, taşıyıcı ve sağlam gruplarındaki dağılımı.

Toplam SH düzeyleri

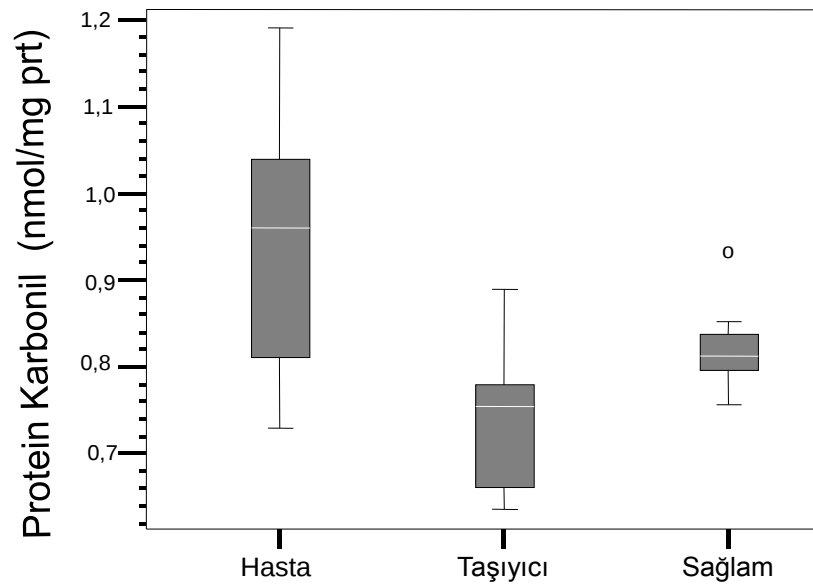
Plazmada çalışılan toplam SH grubu düzeyleri hasta çocuklarda $417,4 \pm 77,9$ nmol/L, taşıyıcılarda $457,5 \pm 106,2$ nmol/L ve sağlamlarda $522,6 \pm 77,2$ nmol/L bulundu (Tablo 4.5). Hastalara ait toplam SH düzeyleri sağlamlardan anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0,003$) (Şekil 4.8). Ortalama toplam SH düzeyleri için hasta-taşıyıcı ve taşıyıcı-sağlam grupları arasında farklar istatistiksel önem taşımamaktaydı.



Şekil 4.8. Plazma toplam SH düzeylerinin hasta, taşıyıcı ve sağlam gruplardaki dağılımı.

Plazma protein karbonil düzeyleri

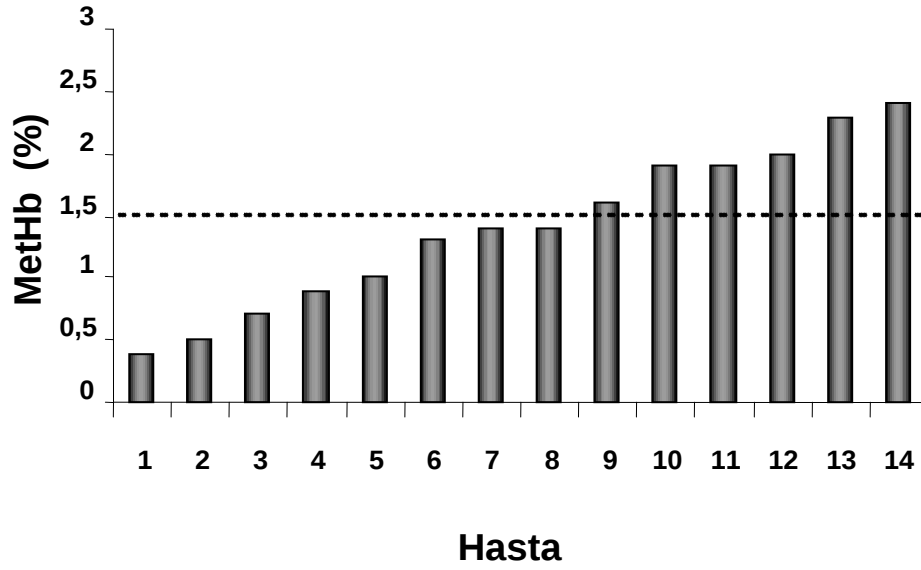
OHA hastalarında protein karbonil düzeyleri $0,93 \pm 0,15$ nmol/mg protein, taşıyıcılarında $0,74 \pm 0,08$ nmol/ mg protein ve sağlıklı çocuklarda $0,82 \pm 0,05$ nmol/ mg protein bulundu (Tablo 4.5). Hastalara ait karbonil düzeyleri taşıyıcılardan ve sağlamlardan anlamlı düzeyde yüksekti (sırasıyla $p < 0,001$ ve $p = 0,032$). Taşıyıcı ve sağlam gruba ait karbonil düzeyleri de istatistiksel fark göstermekteydi ($p = 0,009$) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Plazma protein karbonil düzeylerinin hasta, taşıyıcı ve sağlam gruplardaki dağılımı.

Methemoglobin (MetHb) yüzdesi düzeyleri

MetHb düzeyi (%) çalışılan 14 hastaya ait sonuçlar Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Altı hastanın yüksek, üç hastanın ise sınırda MetHb düzeyine sahip olduğu gözlemlendi. Normal aralığın üst sınır değeri kesikli çizgilerle gösterildi.



Şekil 4.10. Hastalara ait MetHb yüzdeleri. MetHb normal aralığının üst sınırı (%1,5) kesikli çizgilerle gösterilmiştir.

Plazma protein elektroforezi bulguları

Altı hasta ve beş sağlam çocuğa ait plazma örneklerinin total protein düzeyleri Tablo 4.6’de sunulmuştur.

Tablo 4.6. Protein elektroforezi yapılan hasta ve sağlam çocuklara ait total protein düzeyleri

	Hasta (n=6)	Sağlam (n=5)	p*
Protein (gr/dL)	6,96±0,28	7,18±0,16	0,171
Ortalama±SD			

Hasta ve sağlam çocuklara ait plazma örneklerinden başlangıçta ve üreyle muamele sonrası her bir protein fraksiyonuna ait yüzdelerin ortalaması ve standart sapması Tablo 4.7 ve Tablo 4.8’de sunulmuştur. Buna göre başlangıçta Alfa1 ve gama fraksiyonları hastalarda anlamlı düzeyde yüksek ve alfa-2 fraksiyonu anlamlı ölçüde düşüktü. Alfa1/Globülin oranı da hastalarda anlamlı olarak yüksekti.

Tablo 4.7. Hasta ve sağlam grupta başlangıçtaki protein fraksiyonlarının ortalaması

Protein Fraksiyonu (Başlangıç)	Hasta (n=6)	Sağlam (n=5)	p*
Albumin (%)	66,03±3,61	68,62±1,15	0,177
Alfa1 (%)	2,22±0,45	0,98±0,30	0,004*
Alfa2 (%)	6,62±0,83	8,92±0,70	0,004*
Beta (%)	12,87±1,26	14,36±1,20	0,126
Gama (%)	12,27±2,71	7,12±1,64	0,009*
Albümin/Globülin	1,97±0,31	2,19±0,12	0,177
Alfa1/Globülin	0,065±0,01	0,031±0,01	0,004*
Ortalama±SD			

*Mann Whitney U testi

Tablo 4.8. Hasta ve sağlam grupta üre ile muamele sonrası protein fraksiyonlarının ortalaması

Protein Fraksiyonu (Üre)	Hasta (n=6)	Sağlam (n=5)	p*
Albümin (%)	44,92±10,34	36,28±9,10	0,247
Alfa1 (%)	17,63±10,68	28,86±11,92	0,177
Alfa2 (%)	9,25±2,12	12,42±4,21	0,177
Beta (%)	15,88±2,48	17,08±1,44	0,177
Gama (%)	12,32±2,87	5,36±3,02	0,009*
Albümin/Globülin	1,97±0,31	2,19±0,12	0,247
Alfa1/Globülin	0,30±0,13	0,44±0,12	0,177

Ortalama±SD

*Mann Whitney U testi

Üre muamelesi sonrası sağlam ve hastalar arasında gama fraksiyon yüzdeleri arasında fark devam etmiştir (p=0,009). Ayrıca üre muamelesinin her fraksiyona etkisi, değişim yüzdesi (%Değişim) olarak hesaplanmış ve Tablo 4.9’da sunulmuştur. Buna göre üre muamelesi sonrası Alfa1 fraksiyonundaki değişim hastalarda daha az oldu (p=0,004)

% Değişim= [Protein fraksiyonunun yüzdesinde üre muamelesi ile oluşan fark/Fraksiyonun başlangıç yüzdesi] x 100

Tablo 4.9. Hasta ve sağlam gruptaki her bir fraksiyona ait % değişimlerin ortalaması

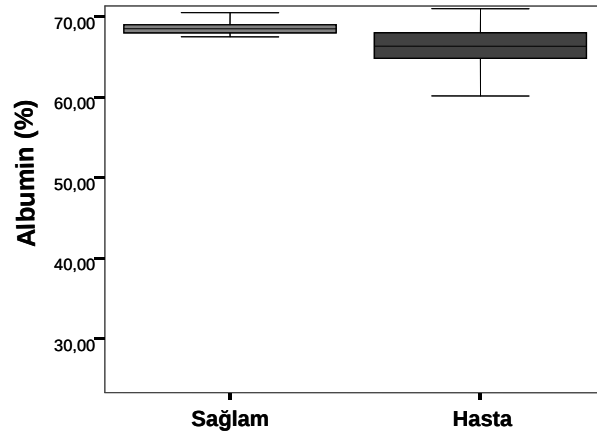
Değişim Yüzdesi	Hasta (n=6)	Sağlam (n=5)	p
Albümin	-31,49±18,00	-47,21±12,85	0,177
Alfa1	726,76±511,36	2770,95±415,42	0,004*
Alfa2	40,82±32,30	37,92±37,81	0,792
Beta	23,24±11,72	19,76±15,27	0,792
Gama	1,13±15,45	-27,19±35,38	0,177
Albümin/Globülin	53,84±23,57	73,03±9,37	0,177
Alfa1/Globülin	363,82±194,89	1318,23±150,62	0,004*

Ortalama±SD

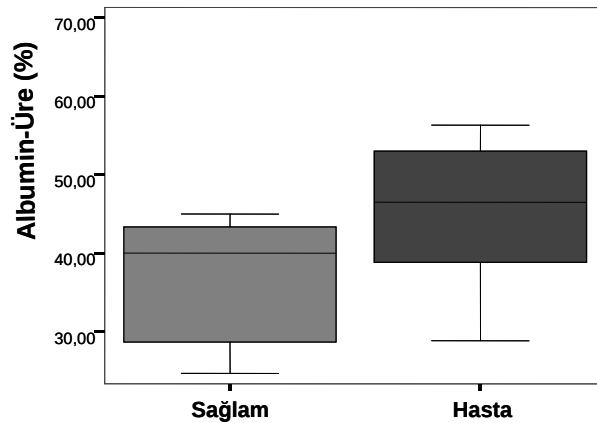
Azalma yönündeki değişimler (-), artama yönündeki değişimler (+) ile gösterilmiştir.

Her bir protein fraksiyonu için sağlam ve hasta grupta başlangıç, üre muamelesi sonrası ve değişim yüzdeleri dağılımı grafiklerle (Şekil 4.11'den Şekil 4.26'ya kadar) sunuldu. Karşılaştırma kolaylığı açısından başlangıç ve üre muamelesi sonrası ortalama değerlerin yer aldığı grafiklerde 'y ekseninin alt ve üst sınırları' aynı değer aralığında tutuldu.

Başlangıçta sağlam ve hastalar arasında **Albümin fraksiyonu** yüzdeleri arasında anlamlı fark görülmedi (Şekil 4.11). Üre muamelesi sonrası sağamlardaki albümin farksiyonu yüzdesi hastalara kıyasla daha düşük değerlere ulaştı (Şekil 4.12).

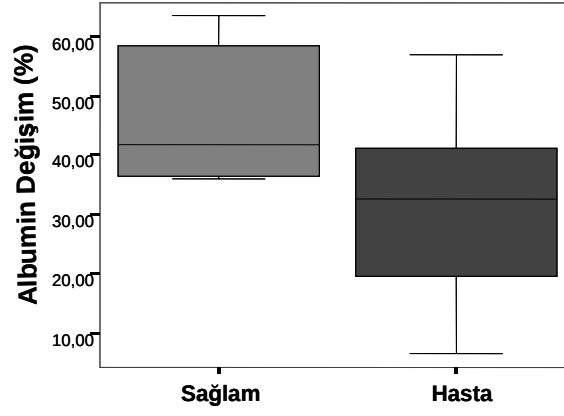


Şekil 4.11. Başlangıçtaki ortalama albümin yüzdesi.



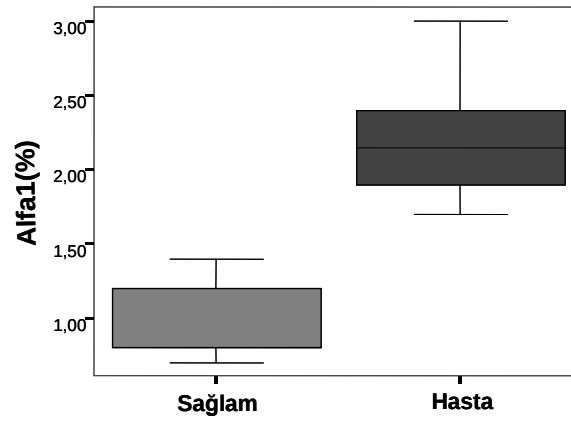
Şekil 4.12. Üre muamelesi sonrası albümin yüzdelерinin dağılımı.

Albumin fraksiyonundaki azalma sađlamalarda daha fazlaydı, dađılımı dardı; oysa hastalarda daha dűşűk bir deđişim gűzlendi, dađılım daha geniřti (řekil 4.13).

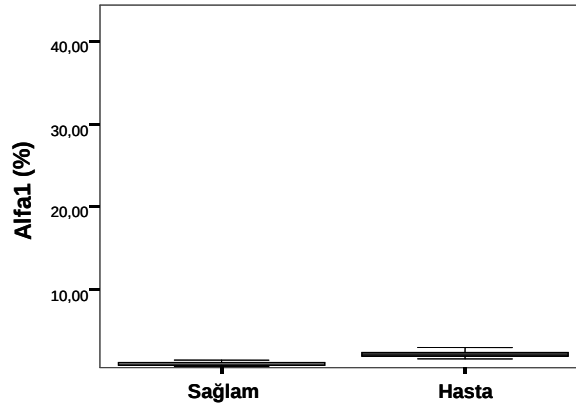


şekil 4.13. Sağlam ve hastada albumin fraksiyonundaki değişim.

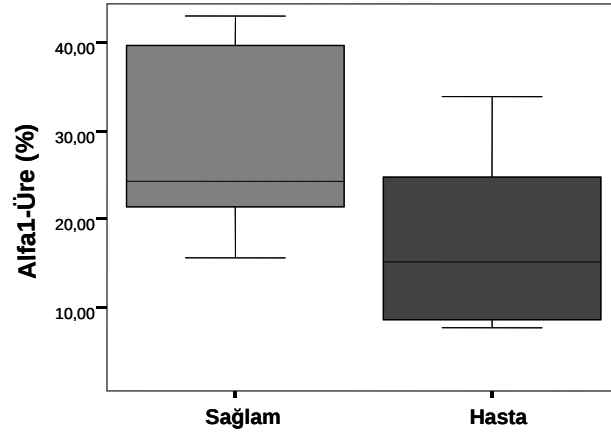
Başlangıçta ve üre muamelesi sonrasında **Alfa1 fraksiyonu** yüzdeleri ve değişim yüzdesi Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’de sunuldu. Şekil 4.14 ve Şekil 4.15 aynı grafikdir. Ancak Şekil 4.15’te y eksenini alt ve üst değerleri, üre muamelesi grafiği olan Şekil 4.16 ile aynı tutuldu.



Şekil 4.14. Başlangıç Alfa1 fraksiyonunun sağlam ve hastada dağılımı.

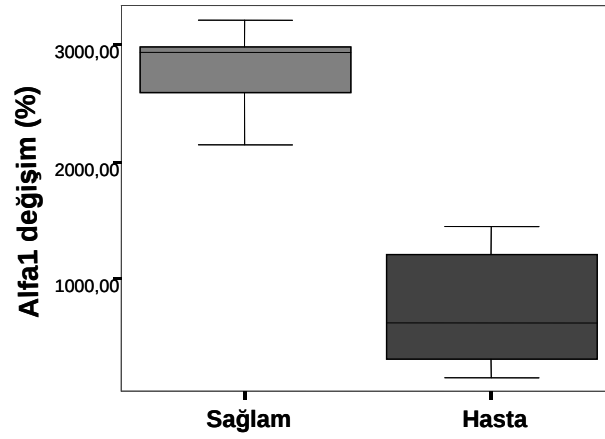


Şekil 4.15. Başlangıç Alfa1 fraksiyonunun sağlam ve hastadaki dağılımı (y eksenini alt ve üst değerleri, üre muamelesi grafiği ile aynı tutuldu).



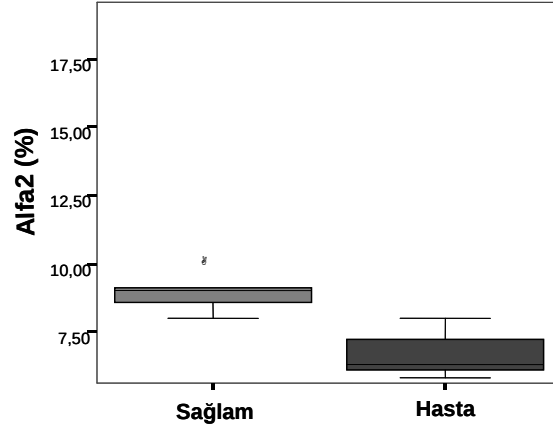
Şekil 4.16. Sağlam ve hastada üre muamelesi sonrası Alfa1 fraksiyonları yüzdesi.

Alfa1 yüzdesindeki değişim hasta gruba göre sağlam grupta anlamlı şekilde yüksekti ($p=0,004$).

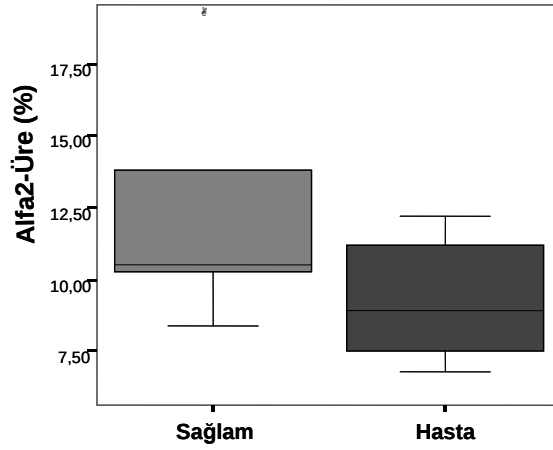


Şekil 4.17. Sağlam ve hastada Alfa1 değişim yüzdesinin dağılımı

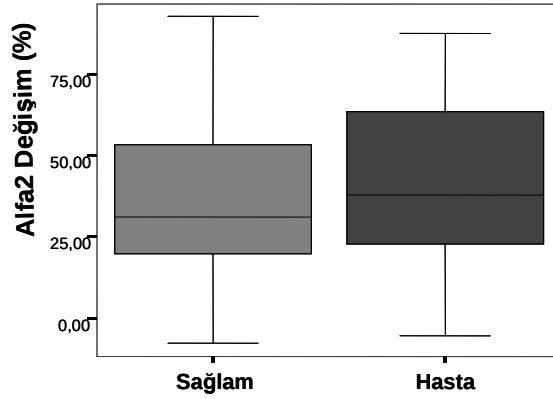
Başlangıçta ve üre muamelesi sonrasında **Alfa2** Fraksiyonu ve değişim yüzdeleri Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve şekil 4.20’de sunuldu.



Şekil 4.18. Sağlam ve hastalarda başlangıçtaki Alfa2 yüzdesinin dağılımı.

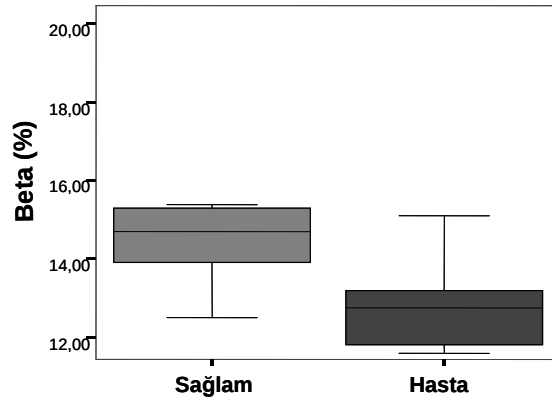


Şekil 4.19. Sağlam ve hastadaki üre muamelesi sonrası Alfa2 yüzdesinin dağılımı.

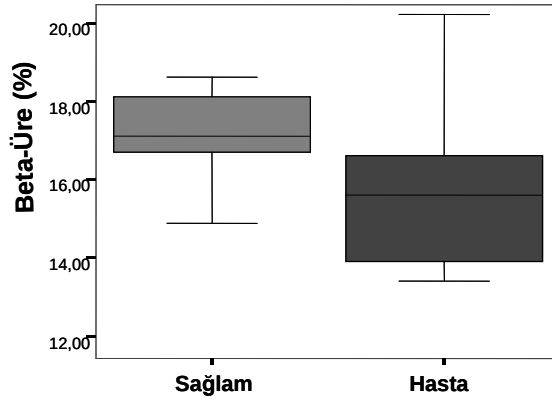


Şekil 4.20. Sağlam ve hastadaki Alfa2 yüzdesinin değişimi.

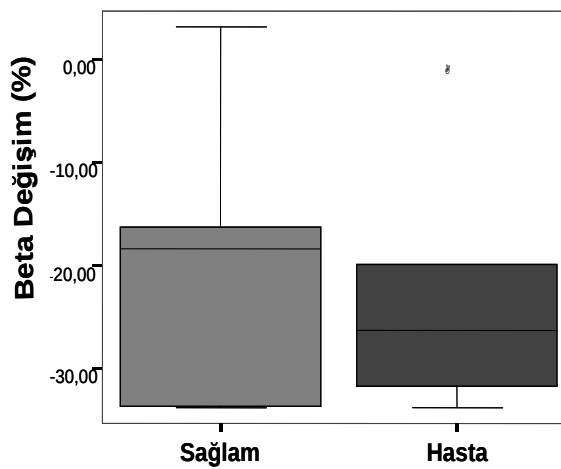
Başlangıçta ve üre muamelesi sonrasında **Beta** fraksiyonu ve değişim yüzdeleri Şekil 4.21, Şekil 4.22 ve Şekil 4.23'te sunuldu.



Şekil 4.21. Sağlam ve hastada başlangıçtaki Beta fraksiyonu yüzdesinin dağılımı.

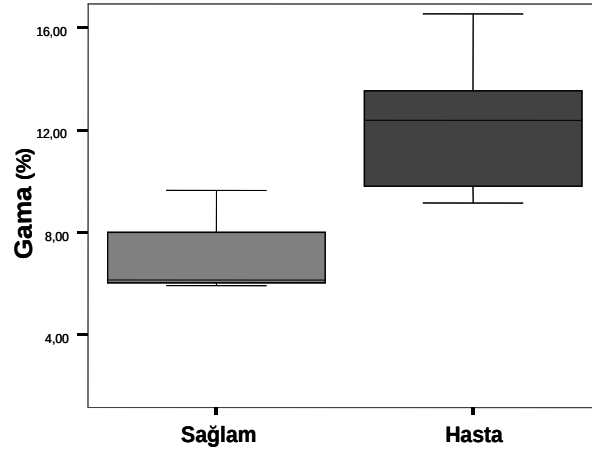


Şekil 4.22. Sağlam ve hastada üre muamelesi sonrası Beta fraksiyonu yüzdesinin dağılımı.

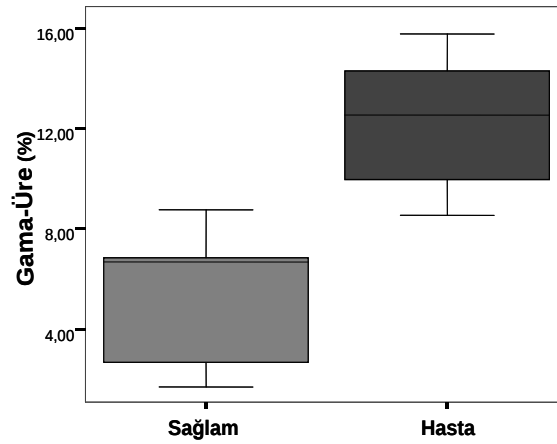


Şekil 4.23. Sağlam ve hastada Beta fraksiyonu değişim yüzdeleri

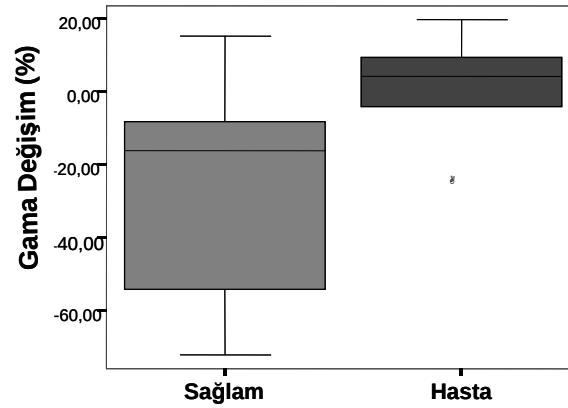
Sağlam ve hastada başlangıçta ve üre sonrasında **Gama** fraksiyonu ve değişim yüzdeleri Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26’da sunulmuştur.



Şekil 4.24. Sağlam ve hastada başlangıçtaki Gama fraksiyonu yüzdesinin dağılımı.



Şekil 4.25. Sağlam ve hastada üre muamelesi sonrası Gama fraksiyonu yüzdesinin dağılımı.



Şekil 4.26. Sağlam ve hastada Gama fraksiyonundaki değişim yüzdesinin dağılımı.

Protein fraksiyonları ve diğer çalışma parametreleri arasındaki anlamlı ilişkiler; sağlam grupta Tablo 4.10'da ve hasta grupta Tablo 4.11'de gösterilmiştir.

Tablo 4.10. Sağlam grupta protein fraksiyonları ve diğer parametreler arasındaki anlamlı korelasyonlar

Korelasyon	r	p
Albümin ve Trigliserit	1	<0,001
Albümin ve Protein Karbonil	-0,900	0,037
Alfa2 ve T-SH düzeyleri	-0,900	0,037
Beta-Üre ve Bilirubin	0,900	0,037
Albümin/Globülin ve TG	1	<0,001
Albümin/Globülin ve Protein Karbonil	-0,900	0,037
Globülin ve Trigliserit	-1	<0,001
Globülin ve Protein karbonil	0,900	0,037

r: Pearson korelasyon katsayısı

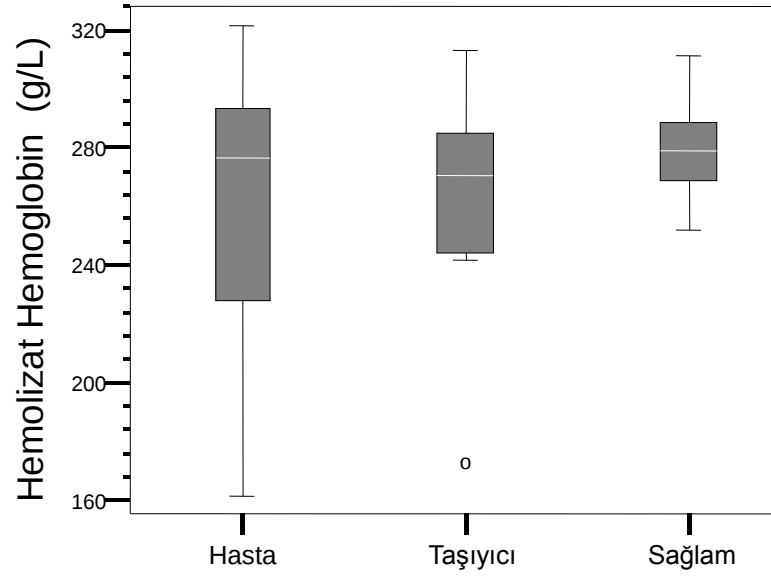
Tablo 4.11. II. grup hasta örneklerinde protein fraksiyonları ve diğer parametreler arasındaki anlamlı korelasyonlar

Korelasyon	r	p
Albümin-Değişim ve T-SH	-0,943	0,005
Albümin-Değişim ve Protein Karbonil	-0,829	0,042
Alfa1-Üre ve T-SH	-0,943	0,005
Alfa1-Değişim ve T-SH	0,943	0,005
Alfa1-Değişim ve Protein Karbonil	-0,829	0,042
Alfa2-Üre ve T-SH	-0,886	0,019
Alfa2-Değişim ve T-SH	-0,943	0,05
Alfa2-Değişim ve Protein Karbonil	-0,829	0,042
Beta ve Kolesterol	0,829	0,042
Beta ve Trigliserit	0,841	0,036
Gama-Üre ve T-SH	0,812	0,05
(Albumin/Globülin) Üre ve T-SH	0,886	0,019
(Albumin/Globülin) Değişim ve T-SH	-0,943	0,005
(Alfa1/Globülin) Üre ve T-SH	-0,943	0,005
(Alfa1/Globülin) Üre ve Protein. Karbonil	-0,829	0,042
Alfa1/Globülin Değişim ve T-SH	-0,943	0,005
Alfa1/Globülin Değişim ve Protein Karbonil	-0,829	0,042

r: Pearson korelasyon katsayısı

Hemolizat Hb Düzeyleri

Hemolizat Hb düzeyleri; hastalarda $256,1 \pm 50,1$ g/L, taşıyıcılarda $263,2 \pm 39,1$ g/L ve sağlamlarda $281,0 \pm 18,2$ g/L bulundu, gruplar arasında anlamlı fark görülmedi (Şekil 4.27).

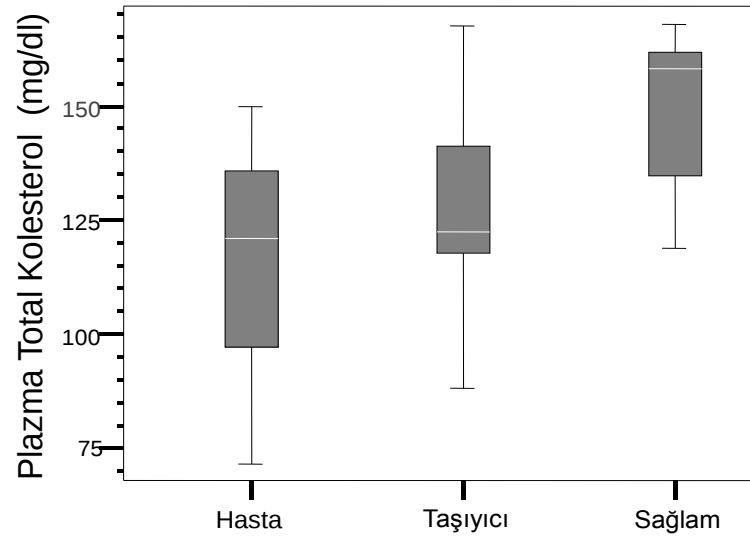


Şekil 4.27. Hemolizattaki Hb'nin hasta, taşıyıcı ve sağlam gruptaki dağılımı.

4.2.2. Lipitler

Plazma total kolesterol düzeyleri

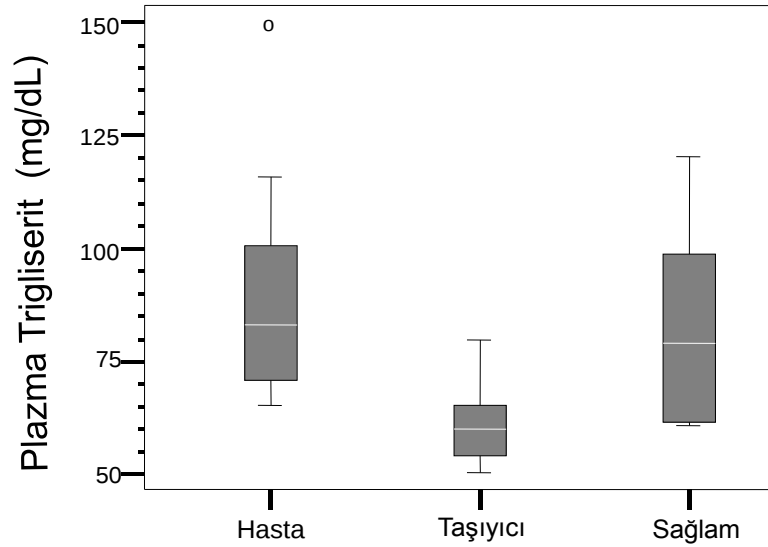
Plazma total kolesterol düzeyleri OHA hastalarında $116,67 \pm 23,61$, taşıyıcılarda $127,5 \pm 22,4$ mg/dL ve sağlam çocuklarda $151,6 \pm 16,5$ mg/dL olarak bulundu (Tablo 4.12). Hasta ve taşıyıcı çocuklara ait plazma kolesterol düzeyleri sağlıklı çocuklardan anlamlı ölçüde düşüktü (sırasıyla $p < 0,001$ ve $p = 0,014$). Hasta ve taşıyıcı gruplara ait ortalama kolesterol düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.



Şekil 4.28. Plazma total kolesterol düzeylerinin hasta, taşıyıcı ve sağlam grupta dağılımı.

Plazma TG düzeyleri

Hastalarda plazma TG düzeyleri $89,3 \pm 23,5$ mg/dL, taşıyıcılarda $60,9 \pm 9,2$ mg/dL, ve sağlam çocuklarda $83,0 \pm 21,1$ mg/dL olup hastalarda taşıyıcılara göre anlamlı derecede yüksekti ($p=0,014$). Hasta ve sağlamlar arasında fark görülmedi. Sağlamlara ait değerler taşıyıcılardan yüksekti ($p=0,007$) (Şekil 4.29, Tablo 4.12).



Şekil 4.29. Plazma TG düzeylerinin hasta, taşıyıcı ve sağlam grupta dağılımı.

Tablo 4.12. Hasta, taşıyıcı ve sağlam grupta plazma ve hemolizat lipidlerinin ortalama düzeyleri

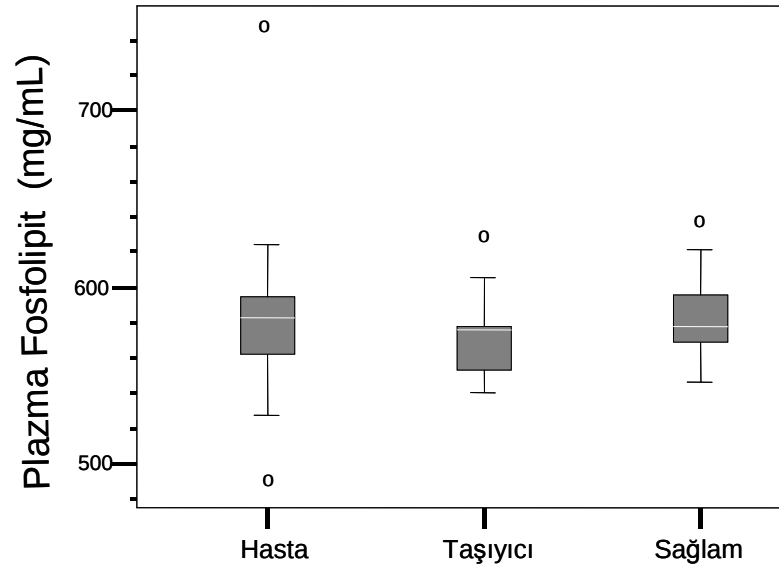
Lipitler	Hasta (n=15)	Taşıyıcı (n=10)	Sağlam (n=10)	p*
<i>Plazma</i>				
Total Kolesterol (mg/dL)	116, 7±23,6	127,5±22,4	151,6±16,5	0. 006
Trigliserit (mg/dL)	89,3±23,5	60,9±9,2	83,0±21,1	0.002
Fosfolipit (mg/ml)	583,5±57,2	574,4±27,4	584,0±27,1	0.702
<i>Hemolizat</i>				
Trigliserit (mg/gr Hb)	0,66±0,29	0,58±0,17	0,64±0,13	0.627
Kolesterol (mg/gr Hb)	3,79±0,80	3,34±0,61	3,26±0,54	0.165

Ortalama± SD

*Kruskal Wallis varyans analizi

Plazma fosfolipit düzeyleri

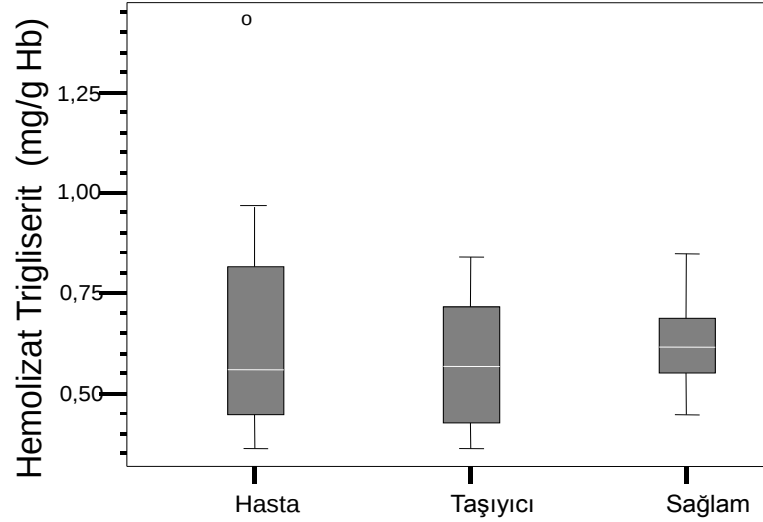
Plazmada ortalama fosfolipit düzeyleri hastalarda $583,5 \pm 57,2$ mg/ml, taşıyıcılarda $574,4 \pm 27,4$ mg/ml ve sağlıklı çocuklarda $584,0 \pm 27,1$ mg/ml bulundu (Tablo 4.12). Gruplar arasında fark görülmedi (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. Plazma fosfolipit düzeylerinin hasta, taşıyıcı ve sağlam grupta dağılımı.

Hemolizat TG düzeyleri

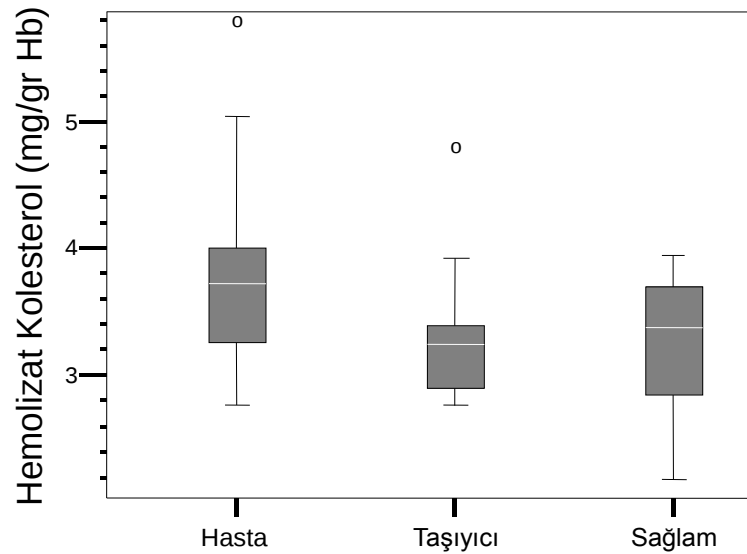
Hemolizatta TG düzeyleri hastalarda $0,66 \pm 0,29$ mg/grHb, taşıyıcılarda $0,58 \pm 0,17$ mg/grHb, ve sağlamlarda $0,64 \pm 0,13$ mg/grHb bulunmuştur (Tablo 4.12). Değerler arasında fark görülmemiştir (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. Hemolizat trigliserit düzeylerinin hasta, taşıyıcı ve sağlamlarda dağılımı.

Hemolizat kolesterol düzeyleri

Hemolizat kolesterol düzeyleri hastalarda $3,79 \pm 0,80$ mg/gr Hb, taşıyıcılarda $3,34 \pm 0,61$ mg/gr Hb, ve sağlamlarda $3,26 \pm 0,54$ mg/gr Hb bulundu (Tablo 4.12). Gruplar arasında fark görülmedi (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. Hemolizat kolesterol düzeylerinin hasta, taşıyıcı ve sağlamlardaki dağılımı.

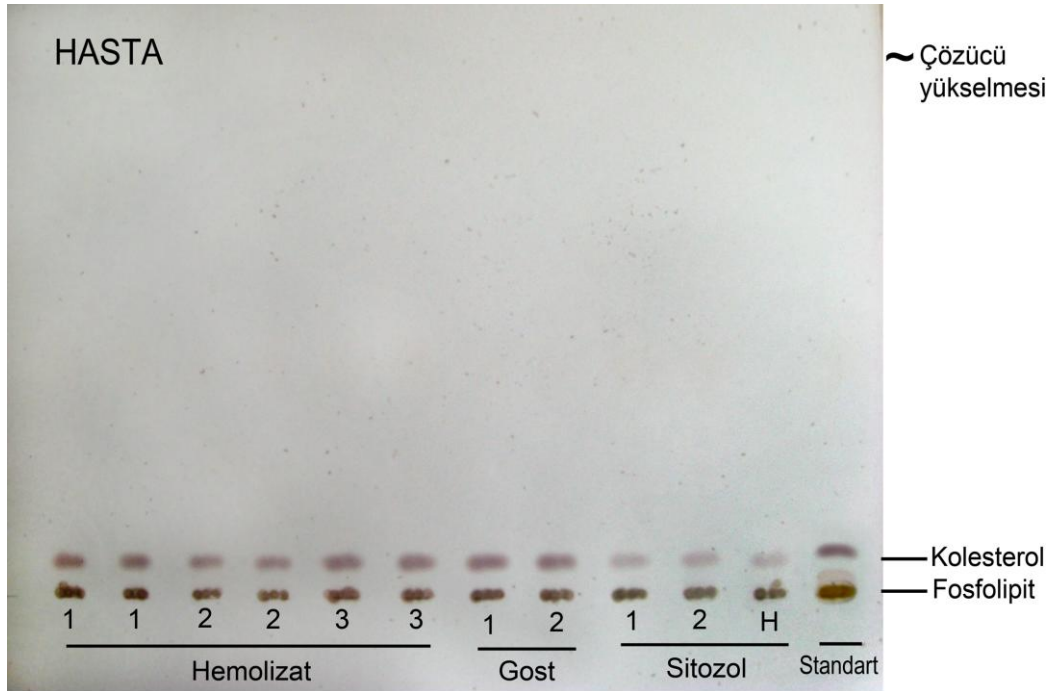
İnce Tabaka Sonuçları

Nötral lipitler

Hasta, taşıyıcı ve sağıamlara ait hemolizatlardan elde edilen lipit ekstreleri, Silika G ince tabakaya her örnekten ikili olarak uygulandı. Hasta, taşıyıcı ve sağıamlara ait örneklerin ayrı ayrı ayrı uygulandığı ince tabakalarda, bir hastaya ait sitozol ektresi (H) de kontrol amaçlı yüklendi

Hasta grup

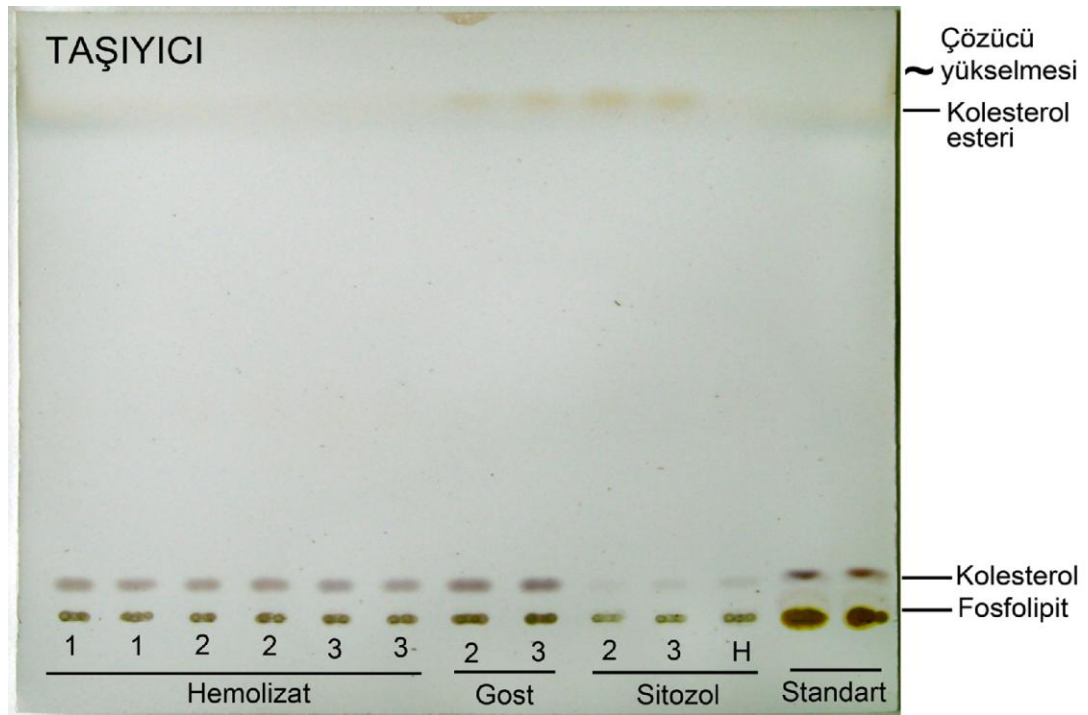
Hastalarda; hemolizat ve gostta daha yoğun olarak, sitozolde ise az düzeyde kolesterol saptandı (Şekil 4.33). Bütün örneklerde yoğun olarak polar lipit gözlemlendi.



Şekil 4.33. Hastalara ait hemolizat, gost ve sitozol örneklerinin uygulandığı ince tabaka görüntüsü. Yürütme çözeltisi: Hekzan: Dietil eter: Asetik asit (90:10:1 [v/v/v]). Görüntüleme: Karbonizasyon. H: Kontrol amaçlı hasta sitozol ektresi.

Taşıyıcı grup

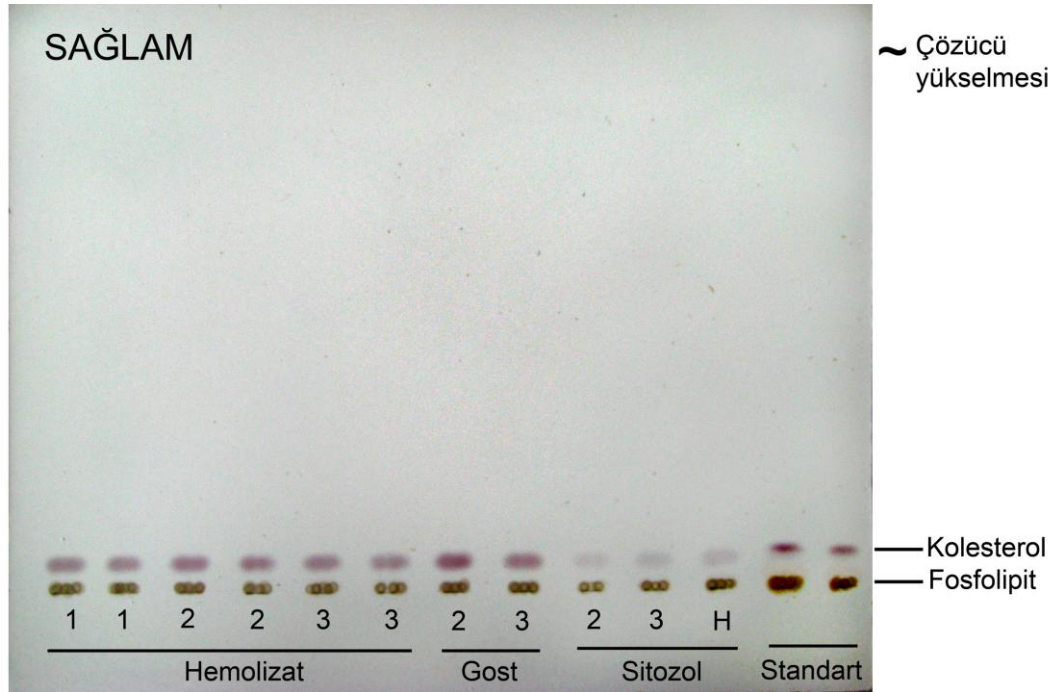
Taşıyıcılarda; hemolizat ve gostda daha yoğun olarak, sitozolde ise az düzeyde kolesterol saptandı (Şekil 4.34). Polar lipitler bütün örneklerde yoğun şekilde gözlemlendi. Ayrıca taşıyıcılara ait örneklerde; çözücünün yükseldiği sınırdan, özellikle sitozol ve gostta belirgin olan kolesterol esterleri görüldü.



Şekil 4.34. Taşıyıcılara ait hemolizat, gost ve sitozol örneklerinin uygulandığı ince tabaka görüntüsü. Yürütme çözeltilisi: Hekzan: Dietil eter: asetik asit (90:10:1 [v/v/v]) Görüntüleme: Karbonizasyon, H: Kontrol amaçlı hasta sitozol ektresi.

Sağlam Grup

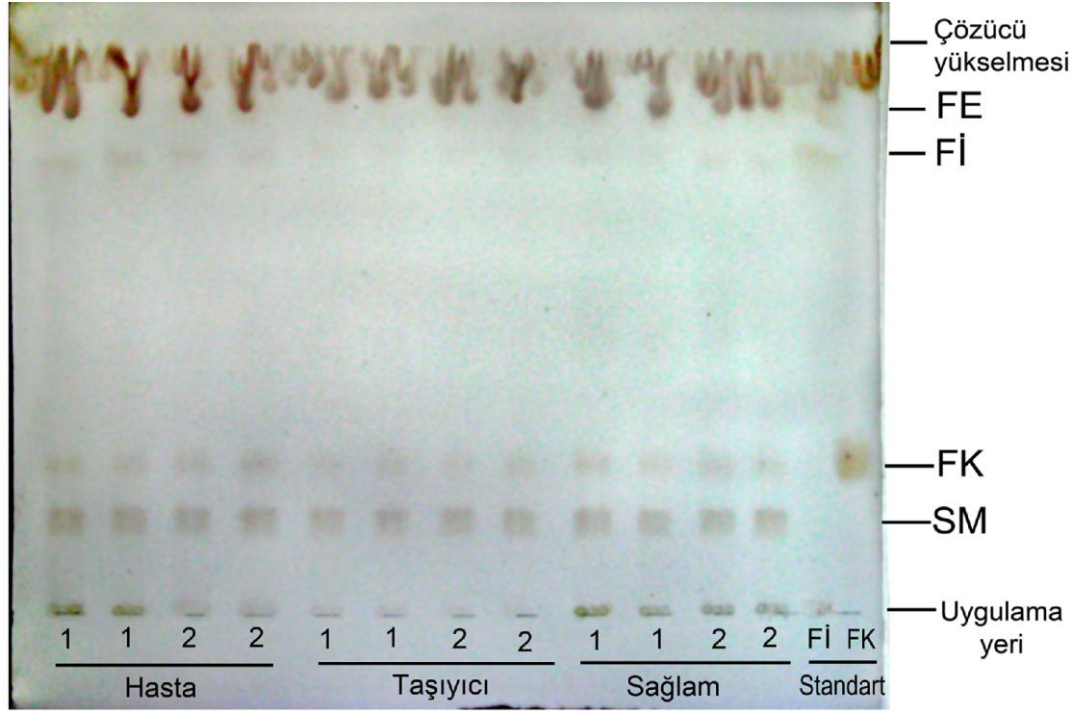
Sağlamlarda; hemolizat ve gostta daha yoğun olarak, sitozolde ise az düzeyde kolesterol saptandı (Şekil 4.35). Bütün örneklerde yoğun polar lipit gözlemlendi.



Şekil 4.35. Sağlamlara ait hemolizat, gost ve süpernatant örneklerinin uygulandığı ince tabaka görüntüsü. Yürütme çözeltisi: Hekzan: Dietil eter: Asetik asit (90:10:1 [v/v/v]) Görüntüleme: Karbonizasyon. H: Kontrol amaçlı hasta sitozol ektresi.

Polar Lipitler

Hasta, taşıyıcı ve sağamlardan seçilen ikişer örneğe ait hemolizat ektreleri Silika G ince tabakaya çiftler halinde uygulandı.Tabakanın alt yarısında sfingomyelin (SM), fosfatidilkolin (FK) ve üst yarısında daha silik olarak fosfatidil inozitol (Fİ) ve fosfatidil etanolamin (FE) lekeleri gözlemlendi.



Şekil 4.36. Hasta, taşıyıcı ve sağamlara ait hemolizat ektresi örneklerinin uygulandığı ince tabaka fotoğrafı. Yürütme Çözeltisi: Kloroform: Metanol: Asetik asit:Su (60:50:1:4 [v/v/v/v]) Görüntüleme: Karbonizasyon

4.2.3. İyonlar

Plazmada Fe iyonu hastalarda taşıyıcı ve kontrollere kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunurken, diğer iyon düzeyleri arasında fark görülmedi (Tablo 4.13).

Hemolizatta Zn iyonu düzeyleri 3 grupta benzerdi. Hemolizat Cu hastalarda taşıyıcı ve sağlamlara kıyasla anlamlı yüksekti ($p<0,001$). Hastalarda hemolizat Fe düzeyleri kontrollerden anlamlı olarak düşük ($p=0,002$) olup hastalara ait hemolizat Ca düzeyleri de taşıyıcılardan düşüktü ($p=0,041$).

Tablo 4.13. Hasta, taşıyıcı ve sağlam gruba ait plazma ve hemolizat Zn, Cu, Fe, Ca düzeyleri

İyonlar	Hasta (n=15)	Taşıyıcı (n=10)	Sağlam (n=10)	p*
<i>Plazma</i>				
Çinko ($\mu\text{g/dL}$)	158,3 $\pm$ 13,8	155,8 $\pm$ 35,8	154,1 $\pm$ 22,4	0,519
Bakır ($\mu\text{g/dL}$)	95,9 $\pm$ 9,9	90,7 $\pm$ 10,3	96,3 $\pm$ 9,1	0,480
Demir ($\mu\text{g/dL}$)	156,9 $\pm$ 31,9	102,6 $\pm$ 17,6	94,0 $\pm$ 26,9	<0,001
Kalsiyum (mg/dL)	11,0 $\pm$ 0,8	11,2 $\pm$ 0,8	10,8 $\pm$ 0,6	0,607
<i>Hemolizat</i>				
Çinko ($\mu\text{g/dL}$)	405,1 $\pm$ 68,7	378,7 $\pm$ 57,3	332,7 $\pm$ 66,2	0,075
Bakır ($\mu\text{g/dL}$)	80,4 $\pm$ 13,0	44,0 $\pm$ 10,1	59,0 $\pm$ 11,2	<0,001
Demir (mg/dL)	36,9 $\pm$ 6,2	39,7 $\pm$ 4,8	46,8 $\pm$ 5,6	0,002
Kalsiyum ($\mu\text{g/dL}$)	168,4 $\pm$ 230,8	309,1 $\pm$ 206,4	138,7 $\pm$ 118,9	0,043

Ortalama $\pm$ SD

* Kruskal Wallis varyans analizi

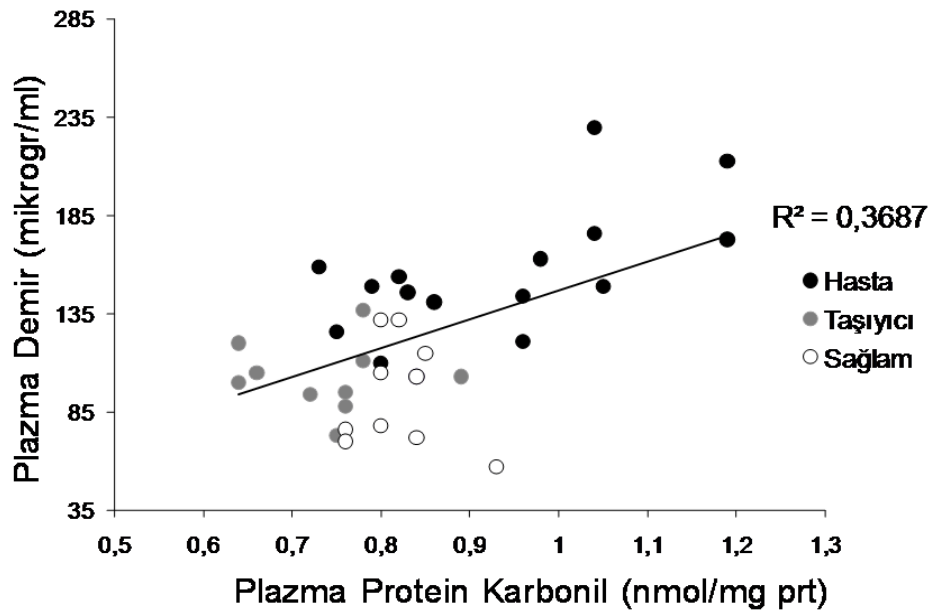
4.2.4. Korelasyonlar

İyon korelasyonları

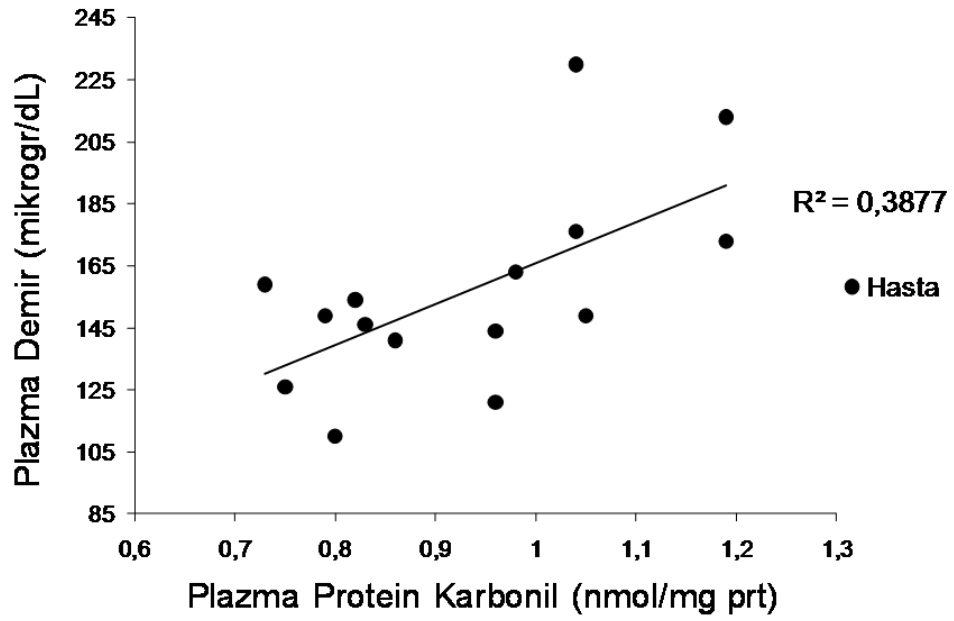
Tüm olgular dikkate alındığında plazma Fe düzeyleri ve çalışılan diğer test parametreleri arasında saptanan anlamlı ilişkiler Tablo 4.14’de verildi. Hasta, taşıyıcı ve sağlam gruplar birlikte değerlendirildiğinde, saptanan plazma Fe ve protein karbonil ilişkisi şekil 4.37’ de gösterildi. Ayrıca tek başına hasta grubunda saptanan plazma Fe ve protein karbonil ilişkisi Şekil 4.38’de gösterildi.

Tablo 4.14. Plazma demir düzeylerinin diğer parametrelerle korelasyonları

	Korelasyon katsayısı	p
Plazma Bilirubin	$r= 0,711$	$<0,001$
Plazma Protein Karbonil	$r= 0,495$	0,002
Plazma Trigliserit	$r= 0,427$	0,011
Plazma Kolesterol	$r= -0,429$	0,01
Hemolizat Kolesterol	$r= 0,364$	0,032
Hemolizat Demir	$r= -0,366$	0,031
Hemolizat Bakır	$r= 0,558$	$<0,001$



Şekil 4.37. Hasta, taşıyıcı ve sağlam gruplarda plazma demir ve plazma protein karbonil düzeyleri arasındaki ilişki.

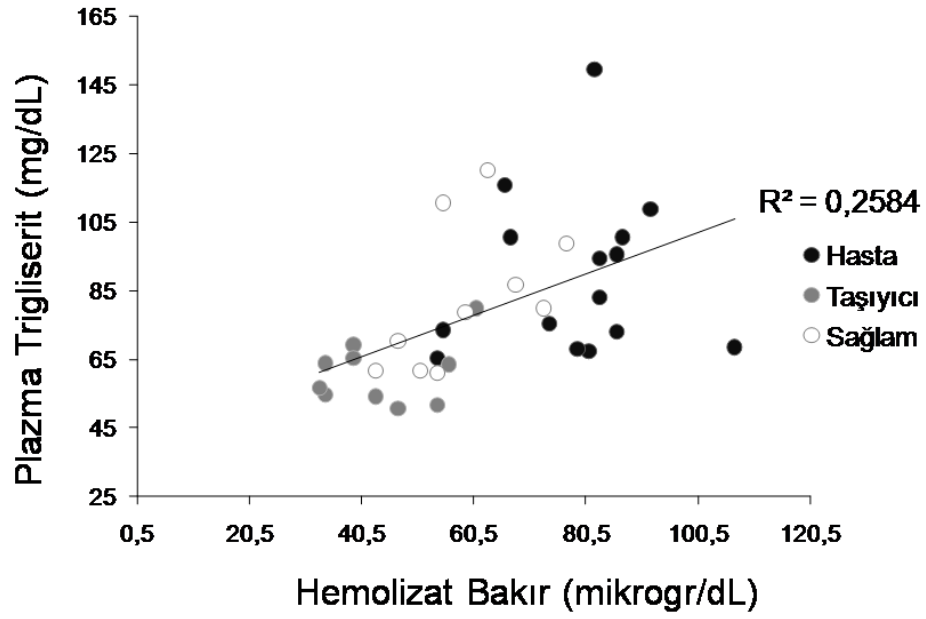


Şekil 4.38. Hasta grupta plazma demir ve plazma protein karbonil düzeyleri arasındaki ilişki.

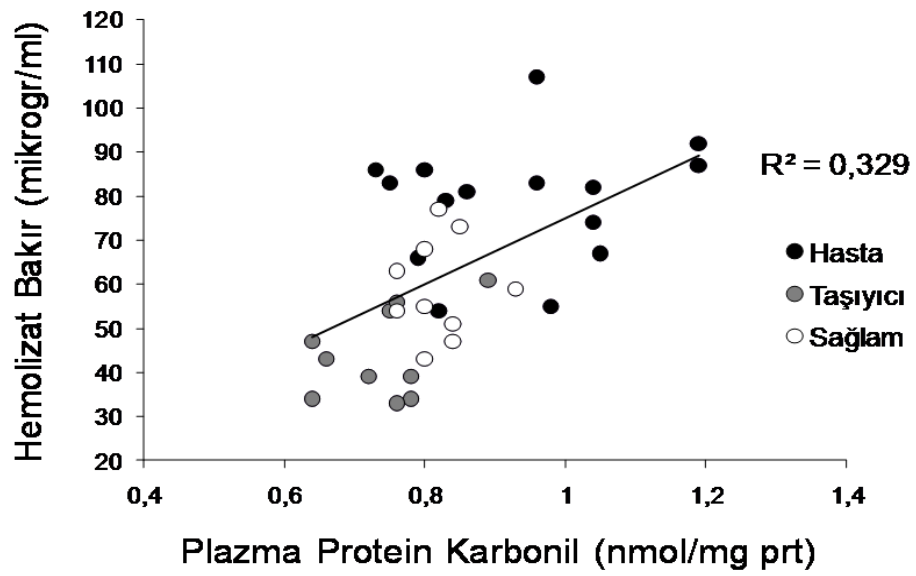
Tüm olgular dikkate alındığında hemolizat Cu düzeyi ile anlamlı korelasyonu olan çalışma parametreleri Tablo 4.15’de gösterildi. Hemolizat Cu’nun TG ile ilişkisi Şekil 4.39’da, plazma protein karbonil ile ilişkisi Şekil 4.40’da, hemolizat kolesterol ile ilişkisi Şekil 4.41’de gösterildi.

Tablo 4.15. Hemolizat bakır düzeylerinin diğer parametrelerle korelasyonları

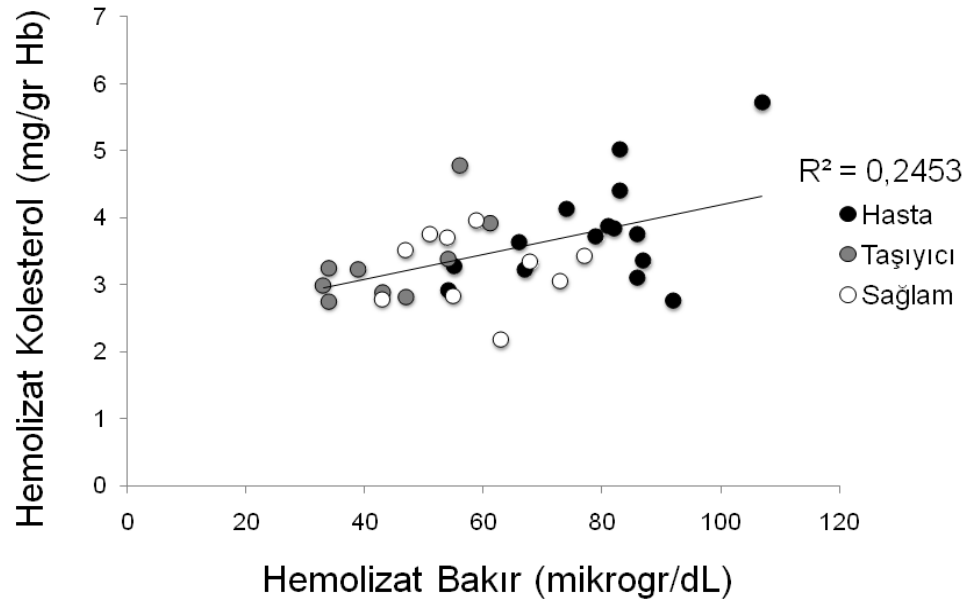
	Korelasyon katsayısı	p
Plazma Trigliserit	r=0,648	<0,001
Plazma Protein Karbonil	r=0,545	<0,001
Hemolizat Kolesterol	r=0,439	0,008



Şekil 4.39. Plazma trigliserit ve hemolizat Cu düzeyleri arasındaki ilişki.

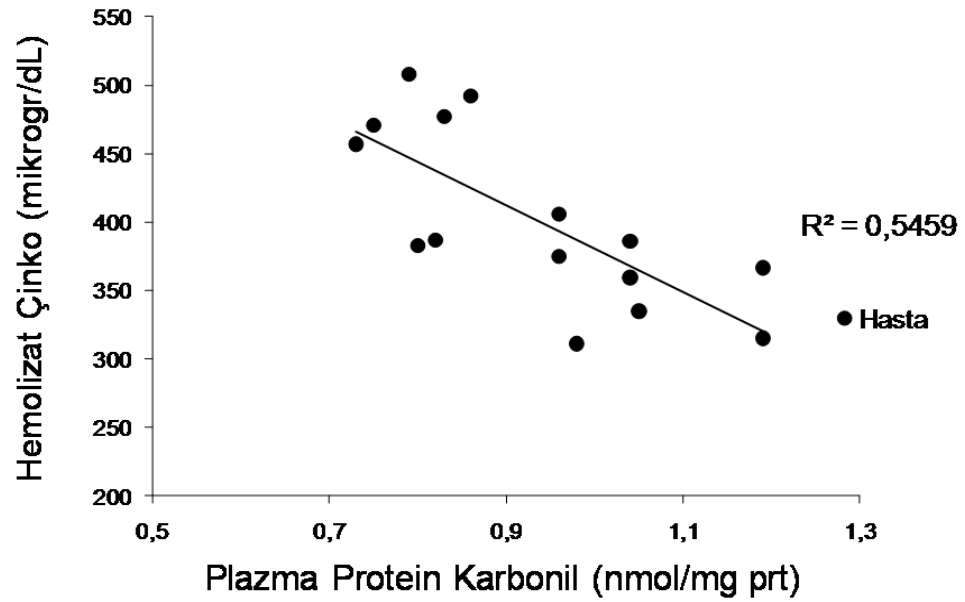


Şekil 4.40. Hemolizat Cu ve plazma protein karbonil düzeyleri arasındaki ilişki.



Şekil 4.41. Hemolizat kolesterol ve hemolizat Cu düzeyleri arasındaki ilişki.

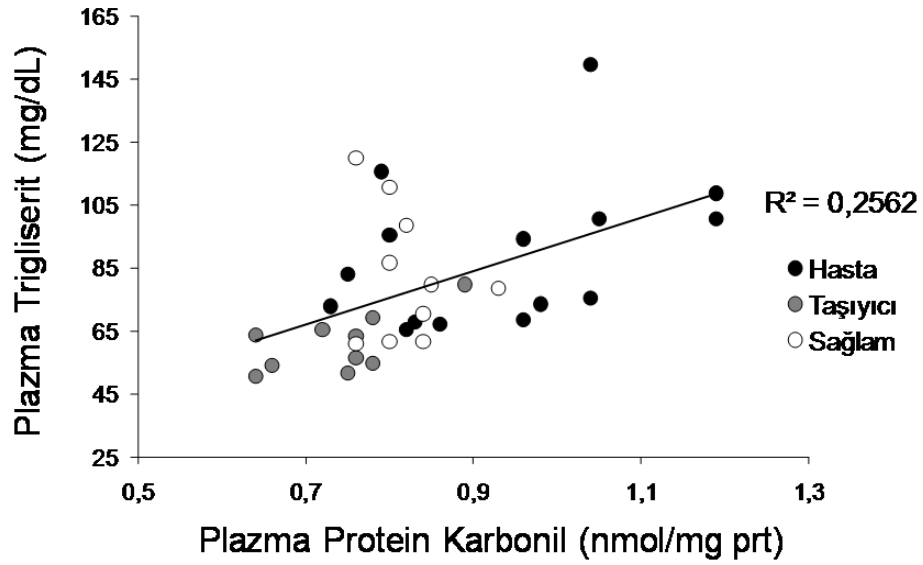
Sadece hasta grubu değerlendirildiğinde hemolizat Zn ve plazma protein karbonil düzeyleri arasında anlamlı korelasyon ($r=-0,711$) ($p=0,006$) bulundu (Şekil 4.42).



Şekil 4.42. Hasta grubunda hemolizat Zn ve plazma protein karbonil düzeyleri ilişkisi.

Lipit Korelasyonları

Tüm olgular dikkate alındığında plazma TG düzeyleri ile plazma protein karbonil düzeyleri arasında anlamlı korelasyon ($r=0,528$) ($p<0,001$) bulundu (Şekil 4.43). Sadece hasta grubu değerlendirildiğinde plazma fosfolipit ve TG düzeyleri arasında ilişki ($r=0,606$)($p=0,017$) saptanmıştır (Şekil 4.44). Ayrıca TG ve Bilirubin düzeyleri arasında korelasyon ($r=0,539$) ($p<0,001$) gözlemlendi.



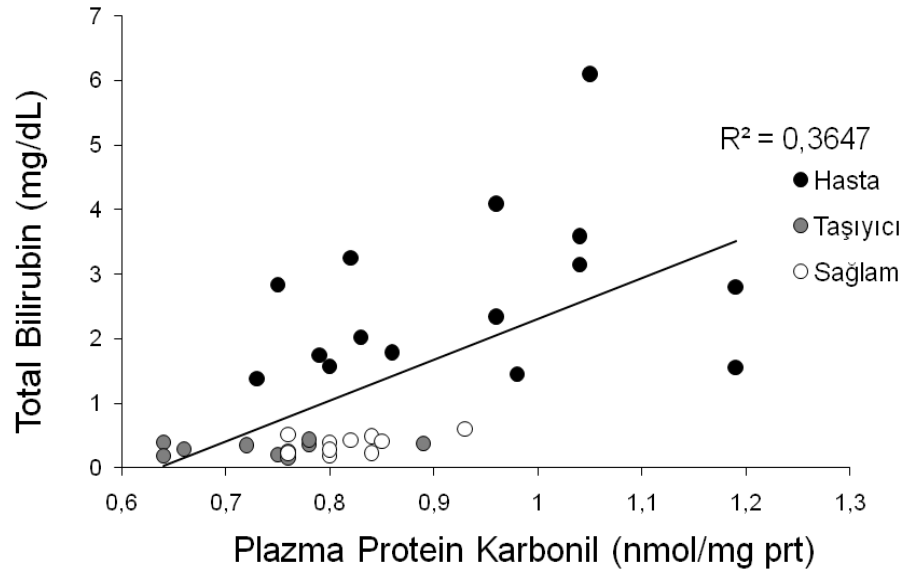
Şekil 4.43. Plazma trigliserit ve plazma protein karbonil düzeyleri arasındaki ilişki.



Şekil 4.44. Hasta grubunda plazma fosfolipit ve TG düzeyleri arasındaki ilişki.

Hemoliz (Total Bilirubin)- Protein Karbonil korelasyonu

Tüm olgular değerlendirildiğinde total bilirubin ve plazma protein karbonil arasında korelasyon($r=0,608$) ($p<0,001$) bulunmuştur (Şekil 4.45).



Şekil 4.45. Total bilirubin ve plazma protein karbonil düzeyleri arasındaki ilişki.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmaya OHA tanısı almış, düzenli takip edilen, genel durumu stabil 15 çocuk; hastaların kardeş ve yakın akrabaları arasından seçilen 10 taşıyıcı ve 10 sağlıklı çocuk, dahil edildi. Hasta grup taşıyıcı ve sağlam grupta yaş ve cinsiyet bakımından benzerdi.

Bu çalışmada OHA hastası, taşıyıcısı ve sağlıklı çocukların plazma ve hemolizat ortamı protein, lipit ve iyonlar yönünden incelendi. OHA hastalarının plazma ve hemolizat ortamının diğer iki gruptan önemli farklılıklar gösterdiği görüldü.

5.1. OHA’da oksitleyici baskı (I. Grup örnekler)

OHA hastalarında plazma (134) ve hemolizat (135) ortamında oksitleyici baskının, sağlıklı ve taşıyıcı çocuklara göre artmış olduğu birçok çalışma ile MDA düzeyleri incelenerek gösterilmiştir. Benzer şekilde bu çalışmada da MDA düzeylerinin hem plazma hem de hemolizatta istatistiksel olarak önemli ölçüde artmış olduğu gözlemlendi (Tablo 4.3).

5.2. OHA’da hemoliz düzeyleri (II. Grup Örnekler)

Hasta, taşıyıcı ve sağlam grubun plazmalarında total bilirubin düzeyleri ölçüldü (Şekil 4.7). Hasta grubunda bilirubin düzeyi, taşıyıcı ve sağlıklı grubun her ikisinden de önemli derecede yüksek bulundu ($p<0,001$). OHA hastalarında hemoliz artışı bilinen bir gerçek olmasına rağmen, diğer bulgularla korelasyonu önemli bilgiler verebileceği için bu ölçüm yapıldı. İkinci grupta incelenen tüm olgularda total bilirubin düzeyleri ile; plazma protein karbonil ($r=0,608$), plazma Fe ($r=0,711$), plazma TG ($r=0,539$) ve hemolizat Cu ($r=0,661$) değerleri arasında anlamlı korelasyon gözlemlendi. Bu da bu sayılan parametrelerin, hemolizle aynı faktörden etkilendiğini düşündürdü.

5.3. Protein Ortamı

Hastaların plazma protein düzeyleri, taşıyıcı ve sağlamlardan anlamlı fark göstermedi.

5.3.1. Plazma proteinleri

Plazma proteinlerinde olası hasar 3 farklı yöntemle (protein karbonil, toplam SH düzeyi ve elektroforezle) araştırıldı. Sonuçta OHA plazmasında proteinlerin yaygın şekilde hasar gördüğü ve yapısal değişime uğradığı gösterildi.

Protein karbonil düzeyi çalışmaları

İkinci grup hastalarda protein karbonil değerleri, taşıyıcı ve sağlam gruba ait değerlerden anlamlı olarak yüksek bulundu (Tablo 4.5). Giriş bölümünde detaylı anlatıldığı gibi yeni karbonil gruplarının oluşması proteinin birincil yapısındaki hasarın bir göstergesidir. OHA hastalarının plazma proteinlerinin yapısal değişime uğraması durumunda konformasyon ve fonksiyonlarının etkilenmesi beklenir.

Plazma protein karbonil düzeyi ile plazma Fe ($r=0,495$) (Şekil 4.37) ve hemolizat Cu ($r=0,555$) (Şekil 4.40) düzeyleri arasındaki pozitif korelasyon, proteindeki hasarın büyük ölçüde metalle katalizlenen oksidasyondan kaynaklandığını düşündürmektedir. Yine protein karbonili ile total bilirubin düzeyi arasındaki korelasyon ($r=0,711$) (Şekil 4.45), eritrosit hemolizi ile protein karbonil oluşumunun aynı etkiden, yani oksitleyici baskıdan kaynaklandığını düşündürmektedir. Yine bu bulguları destekler şekilde, hasta grubu içinde; Cu ile genellikle ters etkileşim içinde olan hemolizat Zn düzeyi ile plazma protein karbonil düzeyi arasında negatif korelasyon gözlenmiştir ($r= -0,711$, $p=0.006$).

OHA'da protein oksidasyonunu inceleyen az sayıda çalışma vardır. Bizim hasta grubumuzla benzer olarak stabil durumdaki OHA olgularının incelendiği bir çalışmada hastaların plazma protein karbonil düzeyleri kontrolden yüksek bulunmuştur (136). Kronik transfüzyon alan OHA hastalarının değerlendirildiği bir diğer çalışmada ise hastalardaki protein oksidasyonu kontrolle benzer bulunmuştur (134). Kronik transfüzyonun bir tedavi olarak uygulanması, OHA hastalarının genelinde var olan artmış eritropoetik ve oksidatif stresi (137) azaltarak, protein oksidasyonunun artmasını dolaylı olarak önlemiş olabilir.

Plazma toplam sülfidril düzeyi çalışmaları

Toplam SH düzeyi 2. grup örneklerde ölçüldü ve hasta grubunda, sağlam ve taşıyıcı değerlerinden anlamlı olarak düşük bulundu (Tablo 4.5). OHA hastalarının plazmalarında bildiğimiz kadarıyla toplam SH içeriği daha önce çalışılmamıştır, bu çalışma bu yönden ilk verileri sunmaktadır. Plazma tiyol içeriğinin %80'nin plazma proteinlerinden kaynaklandığı rapor edilmiştir (138). Bu durumda plazma proteinlerinin serbest sülfidril içeriğinin; hasta grubunda, sağlam ve taşıyıcıya göre önemli ölçüde azaldığını ve tiyolün okside formu olan disülfid formuna döndüğünü söyleyebiliriz. Bu da OHA hastalarında plazma proteinlerinin konformasyon ve yapılarının oksitleyici ortamdan etkilendiğinin bir diğer göstergesidir.

Toplam SH düzeyi ile çalışılan diğer parametreler arasında bir korelasyon gözlenememiştir. Büyük olasılıkla protein toplam SH düzeyi başka faktörlerden de etkileniyor olabilir. Ancak hasta grubunda toplam plazma SH düzeyi ile “üre muamelesi sonrası” albümin fraksiyonundaki % değişim arasındaki güçlü negatif korelasyon ($r=-0,943$) (Tablo 4.11) önemli bir bilgidir. Çünkü sağlıklı grupta, albümin fraksiyonundaki değişim yüzdesi hasta grubundan farklıdır ve üre muamelesi ile albüminden $\alpha 1$ fraksiyonuna göç, sağlam grubun önemli bir özelliğidir. Bu görüşü destekler şekilde, hasta grubunda, bu albümin değişim yüzdesi ile protein karbonil düzeyi arasında güçlü negatif korelasyon ($r=-0,829$) (Tablo 4.11) vardır. Bütün bu bilgiler, stabil OHA hastalarında plazma toplam SH ve protein SH düzeyinin daha fazla olgu ile incelenmesi ve aynı ölçümün kriz hastalarında da yapılmasının önemli sonuçlar vereceğini düşündürmektedir.

Plazma proteinlerindeki değişimin elektroforezle incelenmesi

Plazma protein karbonil düzeyleri ve toplam plazma SH düzeyleri ölçümü ile hasar belirlemenin dışında, proteinlerdeki yapısal değişimi gözleyebilmek için plazma örnekleri elektroforezle incelendi.

Literatürde OHA hastalarında plazma protein paternini inceleyen az sayıda çalışma vardır (139-141). Bu çalışmalarda; yüksek total protein, düşük albümin, düşük Alfa1 ve Alfa2 globülin fraksiyonu ve değişmiş albümin/globülin oranı bulunmuştur. Ayrıca kriz döneminde elektroforez paterninin tamamen değiştiği bir çalışmayla rapor edilmiştir (139). Bir diğer çalışmada ise total protein düzeyi yüksek, fakat yukarıda belirtilenlerden farklı olarak artmış albümin düzeyi gözlenmiştir (142). Hastaların klinik durumları konusunda bilgi verilmediği için karşılaştırma yapılması da güçleşmektedir.

Bu çalışmada, sadece plazma protein paterninin yeterli bilgi veremeyeceği düşünülerek proteinlerin olası yapısal farklılıklarını görebilmek için plazmaların üre ile muamele edilmesi yoluna gidildi. Yöntemler kısmında belirtildiği şekilde her bir plazma örneği üre ile muamele edilerek ve edilmeden elektroforez ile incelendi. Üre ile muamelede, konsantrasyon ve süre belirlemede aşağıdaki bilgiler kullanıldı:

Moleküler dinamik simülasyonlar 8 M üre ve 60°C’da proteinin hızla açıldığı, fakat aynı sıcaklıkta, sulu ortamda bu açılmanın olmadığını göstermektedir. Açılmada ilk adım, molekülün hidrofobik kısmının genişlemesi ve sonra su ve üre tarafından çözülmesidir (143). 6 M üre çözeltisinde ise albümin tamamen denatüre olmamakta fakat konformasyonel değişimlere uğramaktadır (144). Bir diğer çalışmada ise çeşitli konsantrasyonlarda üre bulunduran akrilamid ile elektroforez yapıldığında, 2,2 M üre ile albüminin denatüre olmaya başladığı görülmüştür (145). Albümin gibi monomerik bir protein olan arjinin kinazın, elektroforez paterni, üre gradyanı ile incelendiğinde; 2 M üre konsantrasyonunda açılmanın başladığı üre miktarı 5 M’ a ulaştığında ikincil ve üçüncül yapının yok olduğu rapor edilmiştir (146).

Bu çalışmada üre son konsantrasyonu 3M’da tutularak plazma proteinlerinin denatüre olmaları engellendi ve yapılarının en az ölçüde zarara uğraması sağlandı. Örnekler 2. gruptan seçildi ve bu grupta total plazma protein değerleri arasında anlamlı fark olmadığı için bütün örneklerde aynı üre konsantrasyonu kullanılabilir.

Üre ile muamelede 24 saat seçildi, çünkü üreye kısa süre maruziyetin etkili olmadığı; 24 saatin uygun bir süre olduğu, üreli ve üresiz ortamda albüminin izoelektrik nokta belirleme çalışmaları ile gösterilmiştir (147).

3 M üre ile 24 saat 30°C’de inkübasyonla plazma proteinleri denatüre edilmeden, protein çevresindeki sulu ortamın yapısının ve dinamiğinin biraz değişmesi, solvofobik etkinin azalması ve hidrofobik kısımların daha çözünür hale geçmesi amaçlandı. Bu değişen çevreye, yapısı farklı olan proteinlerin farklı cevap vermesi beklenir. Beklendiği gibi, bu çalışmada, hasta ve sağlıklı grup plazmalarının üre muamelesine tepkileri çarpıcı şekilde farklı oldu (Tablo 4.8, Şekil 4.12, Şekil 4.16, Şekil 4.25).

Üre ile muamele etmeden, plazmaların protein elektroforezi yapıldığında; hastaların Alfa1, ve Gama fraksiyonlarının sağlamlardan anlamlı şekilde yüksek ve Alfa2 fraksiyonlarının anlamlı şekilde düşük olduğu, albümin ve Beta fraksiyonlarının sağlamlardan biraz düşük olmasına rağmen aralarında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.

Alfa1 fraksiyonundaki artış OHA hastalarında görülen inflamasyona, Gama fraksiyonundaki artış ise poliklonal gamopatiye (89, 148) bağlanabilir. Hastalarda Alfa2 globülinlerindeki düşüş OHA hastalarında görülen kronik hemolize bağlı, haptoglobülin düzeyindeki düşüşten kaynaklanabilir (149).

Üre ile muamele sonrasında sağlam ve hasta gruplarının her ikisinde de, anlamlı olmamakla beraber, albümin fraksiyonunda düşme, Alfa1, Alfa2 ve Beta’ da artış görülürken, Gama fraksiyonunda ise sağlam grubunda düşüş, hasta grubunda artış gözlenmiştir.

Üre muamelesi tablosunda fraksiyonlar arasında sadece Gama fraksiyonunda iki grup arasında anlamlı fark görülmektedir. Fark anlamlı olmamakla beraber, albümin fraksiyonu hasta grubunda; Alfa1, Alfa2, ve Beta fraksiyonları sağlam grubunda daha yüksektir.

Bu tabloyu daha iyi kavramak için, fraksiyonların, üre muamelesiyle uğradıkları değişimlerin yüzdesi hesaplanmıştır. Fraksiyonlar birer birer incelendiğinde şunlar görülmektedir:

Üre ile muamele etmeden, hasta ve sağlıklı grubun albümin fraksiyonları arasında anlamlı bir fark olmamasına rağmen, sağlamların albümin fraksiyonu

(%68,62), hasta grubununkinden (%66,03) yüksektir. Üre ile muamele sonrasında, her iki grupta da; albümin bandı genişlemekte, ancak bir önceki durumun tersine olarak, hasta albümini fraksiyonu sağlamdan daha yüksek bir değer almaktadır (Tablo 4.8), çünkü sağlam grupta albümin bandında önemli bir düşüş görülmektedir. % değişim hesaplandığı zaman sağlam gruptaki değişim (%47) hasta grubundaki değişimden (%31) daha yüksektir. Muhtemelen değerlerin dağılımının yaygın olmasından dolayı anlamlı fark gözlenememektedir ama “kutu grafikleri” ile iki grubun ve değişim yüzdelerinin farkı açık olarak görülmektedir (Şekil 4.13).

OHA’da plazma proteinlerindeki önemli değişim; en çok $\alpha 1$ ve γ globülin fraksiyonlarındaki % değişimin çarpıcı farklılığı ile ortaya çıkmaktadır.

Sağlamlarda Alfa1 fraksiyonlarındaki değişim yüzdesi 2770 ± 415 iken hastalarda bu yüzde 726 ± 511 (Tablo 4.9) bulundu. Görüldüğü kadarıyla, sağlamlarda; albümin fraksiyonundan, Alfa1 fraksiyonuna önemli ölçüde göç olurken, hastalarda bu göç çok daha az olmaktadır. Alfa1 fraksiyonunun miktarının, albümine nazaran çok az olması, Alfa1 fraksiyonundaki artış yüzdelerinin bu derece yüksek olmasına yol açmaktadır.

Sağlam grupta, üre muamelesi yapılırken, Alfa1 fraksiyonuna yoğun albümin göçü olurken, hastalarda bu göçün çok daha az olması nasıl açıklanabilir?

Plazmanın ana proteini olan albümin, klasik elektroforez teknikleriyle, tek bant halinde görülmektedir, ancak insan ve sığır albümin preparatlarının dimer ve sülfidril içeriği yönünden heterojen bir yapıda olduğu uzun yıllardır bilinmektedir (150). Bu heterojenlik, kısmen serbest tiyol bulunduran (sistein 34) ve bulundurmayan formlarından kaynaklanmaktadır. Serbest tiyol bulundurmayan form sistein ve glutatyonla dimer oluşturan formdur. Ayrıca albüminin hidroksi apatit, DEAE sefadeks kolonlarındaki davranışı, termal denaturasyonla yapılan termodinamik çalışmalarda albüminin heterojen yapıda olduğunu göstermiştir (151). Daha sonraki yıllarda, kapiller zon elektroforezi gibi daha ileri teknikler kullanılarak da insan albümininin heterojen yapıda olduğu gösterilmiştir (152). Albümin heterojenliğinin önemli kaynaklarından birinin, farklı disülfid bağlanmaları ile oluşan izomerizasyon olduğu öne sürülmektedir. Bu izomerlerin, ancak katodik elektroforezle gösterilebilen ve normal formdan daha katyonik olan izoformlar

olduğu öne sürülmüştür. Bu izomerler, normal albüminden daha dayanıksızdır ve normal albümine göre daha pozitif yüklüdür, yani daha katodiktir (144).

Bulgularımızı yorumlamakta kullanabileceğimiz bir diğer bilgi de şudur: Oksitleyici şartlar altında, albüminin serbest olan sisteini (sistein 34) ROS ile etkileşerek iki tersinir türev, yani sülfenik (SOH-alb) ve sülfenik asit (SO₂H-alb) oluşturabilmektedir (Şekil 2.12). Bu iki ara ürün de güçlü oksitleyici şartlarda, tersinmez olan son ürüne, yani sülfonik asit türevine (SO₃H-alb) dönüşebilmektedir.

Bu iki sonucun ışığı altında; büyük olasılıkla sağlıklı kişilerde ve normal şartlarda daha katodik olan albümin izomeri, daha anodik olan ana molekülle çeşitli zayıf etkileşimlerle ve özellikle polar olmayan sıkı bir bağlantı içinde bir arada yürümekte ve elektroforezde tek bir bant görülmektedir. Plazma üre ile muamele edildiğinde, zayıf etkileşimler kırıldığı için bu iki izomer birbirinden bağımsız yürümekte ve daha katodik olan izoform, Alfa1 fraksiyonuna göç etmektedir. Bu göç, etkin olarak, sağlıklı grupta albümin fraksiyonunda düşüş (%47) ve α1 fraksiyonunda artış (%2770) olarak gözlenmektedir (Tablo 4.9).

OHA hasta grubunda bu göç sağlam gruba göre çok daha azdı, (albümin düşüşü %31, Alfa1 artışı %726). Bu da büyük olasılıkla, OHA hastalarının plazmalarındaki güçlü oksitleyici ortamın, albümin moleküllerinin serbest tiyolünün bir kısmını oksitleyerek son ürün olan sülfonik asit türevlerini oluşturması ile ortaya çıkmaktadır. Böylece katodik izomer, fazladan bir negatif yük kazanacak ve göç etmesi engellenecektir.

Üre, zayıf etkileşimleri kırarak proteinlerin yapısını bozmaktadır. Yapısal olarak, herhangi bir modifikasyona uğramadığı sürece, bir proteinin üre muamelesine aynı tepkiyi vermesi beklenir. Molekülün yapısını bir arada tutan zayıf etkileşimlerde; molekülün yükünde; birincil, ikincil veya üçüncül yapısında bir değişim olması halinde molekülün üre veya diğer denatüran ajanlara tepkisi farklı olacaktır.

In vitro deneylerle, oksitlendiği zaman albüminin özelliklerinin değiştiği gösterilmiştir: Molekül tripsinle daha kolay yıkmakta, daha hızla degradasyona uğramaktadır (153). Ayrıca ligand bağlama ve antioksidan potansiyeli değişmektedir. Antioksidan aktivitesi de sistein 34'e dayanmaktadır (138). Oksitlenen albüminin proteolize uğrayarak plazmadan uzaklaştığı rapor edilmektedir (154). Bu çalışmada

gözlenen hasta grubunda sağlıklı gruptan biraz düşük albümin değeri belki oksitlenme ile tetiklenen bu proteolizle ilgili olabilir.

Sistein 34'ün oksitlenmesi halinde oluşan SO₃H-albümin yapısal olarak farklı olduğu gibi molekülde açılma oluşabileceği böbrek patolojisi olan olguların plazma albümininde gösterilmiştir (155). Ayrıca bu hastalarda 48 Da'luk bir katılım ile albüminin molekül ağırlığının ve net negatif yükünün arttığı gösterilmiştir (138).

Albüminin son zamanlarda anlaşılan bir rolü de antioksidan özelliğidir. Plazmada enzimatik antioksidan sistemlerin zayıf olması dolayısıyla, albümin, önemli bir plazma antioksidanı olarak görev yapmaktadır. Bu fonksiyonu için önemli olan grup serbest olan sülfidril (sistein 34) grubudur ve oksitleyici baskının etkisiyle bu grup sulfonik aside kadar oksitlenebilmektedir. OHA hastalarının plazmalarında da, artan oksitleyici baskıyla, önemli miktarda albüminin, serbest tiyolü oksitlenerek sülfonik asit oluşturuyor olabilir.

Albüminin oksitlenmesi ve serum protein profilindeki değişim, daha önce, böbrek hastalarında ve diyabette çalışılmıştır (156-158).

Bu çalışma ile de, ilk defa, OHA hastalarının plazma albümininde yapısal bir değişim olduğu, zayıf denatüran şartlarda sağlam ve hastalıklı plazmaların elektroforez sonuçlarının karşılaştırılması ile dolaylı olarak gösterilmiştir.

Böbrek yetmezliği (156) ve diyabette (157) albüminin kısmen oksitlendiği, "merkaptosuz albümin" (nonmerkaptosuz albümin) ile dolaylı olarak gösterildi. Merkaptosuz albümin düzeyinin böbrek bozukluk derecesi ile orantılı olduğu ve hemodiyaliz hastalarında belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir (159). Daha sonra 8 hemodiyaliz hastasında albümin oksidasyonunun ara ürünleri gösterilmiş fakat son ürün gösterilememiştir (155). Ayrıca yine hemodiyaliz hastalarından saflaştırılan albüminin, radikalleri yok etme kapasitesinin azaldığı ve ligand bağlama özelliklerinin değiştiği gösterildi (153, 160). Ligand bağlama özelliklerindeki değişim albümin yapısındaki değişimin bir belirtisidir. Çeşitli ileri tekniklerle böbrek hasarlı hastalarda albüminin oksitlenme ile yapısal olarak değiştiği, molekülde şişme ve kısmen açılma olduğu konusunda güçlü deliller elde edilmiştir (155). Ayrıca; hipertirodi ve böbrek hastalarında plazma proteinlerinde ve albüminde yapısal değişim olduğu denatüre edici şartlardaki elektroforez paterni ile gösterilmiştir (161-162).

Bu çalışmada, iki grubun plazma proteinleri arasında bir diğer önemli farklılık, gama fraksiyonları arasında görüldü. Sağlam grubun plazmasının üre muamelesi ile gama fraksiyonunda düşüş görülürken (%27), hasta grubunda artış (%1) gözlemlendi. Muhtemelen sağlıklı grupta gama fraksiyonundan bir göç olurken, hasta grubunda, gerçekleşmiş olan yapısal değişimlerle, farklı bir davranış ortaya çıkmaktadır.

Daha önce ayrıntılı olarak belirtildiği gibi, bir kaç çalışmayla, OHA hastalarının plazması klasik protein elektroforezi yöntemleriyle çalışılmış ve hangi fraksiyonların artıp eksildiği rapor edilmiştir (139-141). Bir çalışma sonucunda da OHA'da albümine oksidasyonla MDA eklentisi olduğu bildirilmiştir (163).

Bu çalışma ile ilk defa, OHA hastalarında plazma proteinlerinde yaygın hasar ve yapısal değişim olduğu gösterildi. Yukarıda belirtilen albümin oksidasyon çalışmaları ve bu çalışmanın bulguları beraberce değerlendirilince plazma proteinlerindeki gözlenen değişime, “oksitleyici ortamın” yol açtığı sonucuna varıldı. Elde edilen elektroforez grafikleri, plazma protein karbonil ve toplam plazma sülfidril verileri, plazma ve eritrosit MDA düzeyleri değerlendirilerek şu sonuca varıldı:

OHA hastalarının plazmalarında sadece albümin fraksiyonunda değil diğer fraksiyonlarda da yaygın hasar ve değişimler vardır. Ayrıca bu hastaların sadece eritrositleri değil, plazma ortamlarında da oksitleyici baskı etkindir. Hastaların plazma protein ortamı, sağlıklı ve taşıyıcı grubun plazma protein ortamından farklıdır.

5.3.2. Hemolizat protein ortamı

Eritrositlerin proteinlerinin %99'dan fazlası Hb'den oluştuğundan, hemolizat protein ortamındaki değişim, Hb üzerinden incelenmiştir. Gruplar arasında Hb düzeyleri yönünden anlamlı fark yoktu (Şekil 4.27), ancak hastaların Hb düzeyleri taşıyıcı ve sağlamlara göre daha geniş bir dağılım gösterdi. Hb oksidasyonunun bir göstergesi olan MetHb yüzdeleri, hastalarda tam kanda ayrıca çalışılmış, hastaların ihmal edilmeyecek bir kısmında yüksek MetHb düzeylerine rastlanmıştır (Şekil 4.10). Orak eritrositlerde MetHb oluşumunun arttığı bilinmekteyse de MetHb yüzdesinin dikkate alındığı klinik çalışmaya rastlanmamıştır. Stabil dönemde dahi artmış MetHb yüzdesi bulgusu, bu hastaların eritrositlerindeki oksidatif ortam hakkında fikir vermektedir. Hemolizattaki yüksek interferans dolayısı ile karbonil ve sülfidril içeriğinin ölçülmesi mümkün olamadı.

5.4. Lipit ortamı

5.4.1. Plazma Kolesterolü

OHA hastalarında plazmada kolesterol, trigliserit ve fosfolipit tayiniyle lipit ortamı incelenmiştir. OHA hastalarında plazma kolesterolü taşıyıcı ve sağlam çocuklardan anlamlı ölçüde düşük bulundu. Bu bulgu literatürde OHA hastalarında sıklıkla gözlenen bulgudur (29), ancak mekanizması anlaşılamamıştır.

Kolesterol düzeylerinin düştüğü diğer klinik durumlar arasında; sıtma enfeksiyonu (164-165), siyanotik konjenital kalp hastalığı (166), kronik böbrek yetmezliği, hipertiroidizm, sindirime bağlı malabsorpsiyonlar (167), yüksek rakımda yaşama (9), talasemi majör ve intermedya (168-169), G6PD eksikliği (170), sferositoz (171), aplastik anemi (172) verilebilir. Sayılan kronik anemilerde ve sıtmada artmış hemoliz ve eritropoezin uyarılması tipiktir.

OHA hastalarında kronik anemi yüzünden sürekli eritrosit sentezi yapılmaktadır. Bu da membran sentezi için kolesterol ihtiyacı doğurur ve bu ihtiyaç büyük ölçüde plazma kolesterol havuzundan sağlanabilir. Bu düşüncemizi destekler şekilde kronik anemilerde yüksek eritropoetik aktivite ile düşük kolesterol düzeyleri arasında korelasyon gösterilmiştir (173). Diğer yandan OHA hastalarında sağlamlarla karşılaştırıldığı zaman apoA1 ve apoB düzeylerinin daha düşük olduğu görülmüştür (174). ApoA1'in kolesterol taşınmasındaki rolü ve antioksidan fonksiyonu göz önüne alınınca OHA'daki düşük kolesterol düzeyine eritropoezden başka faktörlerin de katkıda bulunabileceği söylenebilir. Nitekim bu çalışmada hasta, taşıyıcı ve sağlam olgular (1. Grup) göz önüne alınınca plazma MDA ve kolesterol düzeyleri arasında oldukça güçlü bir negatif korelasyon ($r=-0.501$) (Şekil 4.4) gözlemlendi. Plazmada oksitleyici baskının göstergelerinden biri olan MDA düzeyi arttıkça kolesterol düzeyi düşmektedir. Bu da oksitleyici baskıyla hipokolesterolemi ilişkisini ortaya koymaktadır. Bildiğimiz kadarıyla OHA hastalarında bu ilişki ilk defa kurulmuştur ve bundan böyle OHA hastalarında hipokolesterolemiyi etkileyen faktörlerden biri olarak oksidatif baskının göz önüne alınmasını gerektirmektedir.

Plazma kolesterolü ile eritrosit membran kolesterolü denge halindedir. Sıçanlarda, diyetle eklenen kolesterolün, eritrosit oksidatif stresi üzerindeki etkisi incelenmiş (175); kolesterolle beslenen sıçanlarda kontrole kıyasla plazma kolesterol düzeyi %6 ve eritrosit kolesterol düzeyi %12 artarken, eritrosit MDA düzeyi de

anlamli olarak azalmiştir. Aynı hayvanlarda yüksek dozda fenilhidrazin kullanilarak peroksidan stres oluřturulduęunda; kontrol farelerde, kolesterol düzeyinde dūřuř gōrōlmū; kolesterolle beslenenlerde bu dūřuř gōzlenmemiřtir. Kolesterolōn oksidan stresten koruyucu etkisini, membran kolesterolōnū artirarak gōsterdięi dūřōnōlmūřtir. OHA'lı hastalarda da diyetin kolesterolden zenginleřtirilmesinin hastaların genel metabolizması ve hastalık seyri ūzerindeki etkilerinin incelenmesi yararlı olabilir.

Aynı şekilde bōtōn olgular (I. Grup; hasta, taşıyıcı, sağlam) gōz ūnōne alınınca hemolizat MDA dōzeyiyle plazma kolesterolō arasında daha gōēlō bir negatif korelasyon olduğu gōrōldō ($r = -0,523$) (şekil 4.5).

Bu bulgular OHA hastalarında artan oksitleyici baskının plazma lipit dengesini de bir şekilde değiştirdiğini gōstermektedir.

Hipokolesterolemik bireylerin kanındaki T ve CD8+ hōcreleri azalmiřtir, enfeksiyonlara duyarlılık artmiřtir (176). Organizmanın oksidatif strese daha duyarlı olmasından dolayı, hipokolesterolemi varlıęında total serum antioksidan aktivitesi ve tiyol konsantrasyonu da dūřer (177). Hipokolesterolemi primer intraserebral kanama iēin bir risk faktōrōdūr (178). Kolesterol dōzeyleri dūřōk OHA hastaları bu aēılardan da deęerlendirilmelidir.

5.4.2. Plazma Trigliserit düzeyi

Plazmada bir diğer önemli lipit olan trigliserit, OHA hastalarında taşıyıcılara göre anlamlı olarak yüksektir. Hastaların plazma trigliserit ortalaması sağlamlardan yüksek olmakla beraber fark anlamlı değildir. Çalışmada kan örnekleri sabah aç karnına alınmıştır. Dolayısıyla TG düzeyleri, endojen sentezlenen ve VLDL partikülü içinde karaciğerden dolaşıma verilen TG' i yansıtır.

OHA hastalarında kontrole kıyasla yüksek TG düzeylerinin saptanmasının yanında (27, 179-180), normal TG düzeyleri de gözlenebilmektedir (30). Türkiye'den yapılan bir çalışmada da OHA hastalarında yüksek TG düzeyleri saptanmıştır (181). 67 Nijerya'lı OHA hastası çocuğa ait lipit parametrelerinin incelendiği bir çalışmada plazma kolesterol ve HDL-kolesterol düzeylerinin düştüğü bulunurken, plazma TG düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Hastaların klinik durumuyla ilgili bilgiye rastlanmamıştır.

Bu çalışmada; hasta, taşıyıcı ve sağlam olguların hepsi göz önüne alındığında, plazma TG düzeyi ile total bilirubin düzeyi arasında anlamlı pozitif korelasyon ($r=0,539$), plazma Fe düzeyi arasında yine pozitif korelasyon ($r=0,427$), hemolizat Cu düzeyi arasında kuvvetli pozitif korelasyon ($r=0,648$) ve plazma protein karbonil düzeyi arasında kuvvetli pozitif korelasyon ($r=0,528$) gözlemlendi.

Bu çalışmadaki TG-Bilirubin korelasyonu bulgusunu destekler tarzda OHA'da rölatif hipertrigliseridemi ve intravasküler hemoliz arasında korelasyon bildiren bir çalışma vardır (182). Ayrıca plazma lipitleri, özellikle de TG düzeyleriyle vasküler fonksiyon bozukluğu arasında bir ilişki olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Hastaların TG düzeyindeki artış, sağlamlardan anlamlı olarak yüksek değildir ama bu yukarıda belirtilen korelasyonlar, TG düzeyinin diğer parametrelerle ilişkisini göstermektedir. Hemolizin önemli ölçütlerinden biri olan bilirubin, önemli oksitleyici metaller olan Fe ve Cu ve protein hasarının göstergesi olan protein karbonil düzeyi ile TG düzeyi arasındaki bu korelasyonlar oksitleyici baskı ve hasardan TG'in de etkilendiğini düşündürmektedir.

Taşıyıcı gruptaki diğer iki gruba göre daha düşük TG düzeyi daha fazla olgu ile plazma lipoproteinleri incelenerek aydınlatılabilir.

5.4.3. Plazma fosfolipit düzeyleri

Plazma fosfolipit düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi. Bu bulguya benzer şekilde bir çalışma da, plazma fosfolipitlerinin krizsiz dönemde kontrolle benzerken, krizlerde arttığını bildirmiştir (183).

Korelasyonlar incelendiğinde plazma fosfolipitlerinin, sadece hasta grubu göz önüne alındığında, plazma TG ile pozitif korelasyonu ($r=0,606$) ve sağlam grup göz önüne alındığında ise hemolizat kolesterolü arasında pozitif korelasyon ($r=0,636$) gözlenmiştir. Bu bulgularla, plazma fosfolipit düzeyleri hastalığın stabil olduğu dönemde en az etkilenen lipit fraksiyonu olarak gözükmemektedir.

5.4.4. Hemolizat Lipitleri

Hemolizat lipit ekstresinde kolesterol ve TG düzeyleri incelendi ve her iki lipit için de gruplar arasında anlamlı fark görülmedi. Literatürde bildiğimiz kadarıyla kolesterol çalışmaları daha çok eritrosit membranı kullanılarak yapılmıştır. OHA hastalarında eritrosit membran kolesterolünün arttığını bildiren çalışmalar vardır (31-32, 184) . Sadece bir çalışmada orak eritrositlerdeki kolesterolün daha düşük olduğu rapor edilmiştir (185). Bir başka çalışma, orak eritrositlerin membranındaki kolesterol miktarının hücre yaşıyla ilgili olduğunu ileri sürmüştür (186). OHA hastalarının kanlarında genç eritrosit sayısının fazla olması dolayısıyla; membran kolesterol içeriğinin yüksek bulunması doğaldır.

Bu çalışmada ayrıca bazı hasta, taşıyıcı ve sağlam olgulara ait hemolizat ve buradan elde edilen gost ve sitozoldeki lipitler silika G ince tabakası ile incelendi. Polar olmayan ve polar lipitlerin ayrımını görmek için iki farklı yürütme çözeltisi uygulandı. Polar olmayan lipitler için yapılan yürütmede polar lipitler başlangıç noktasında kalırken, polar olmayan kolesterol tabakada yürüyerek ayrılmıştır. OHA hasta grubunun eritrosit lipitleri, polar olmayan lipitler açısından, taşıyıcı ve sağlam çocukların eritrosit lipitleriyle benzer bulundu. Sitozoldeki kolesterol miktarı bütün gruplarda gosta göre daha azdı.

Polar lipitler içindeki fosfolipit türlerini ayırmak için ayrı bir yürütme çözeltisi uygulandı. Hasta, taşıyıcı ve sağlam olgulara ait hemolizat lipit ekstresinde; fosfatidil kolin, fosfatidil etanolamin, sfingomyelin varlığı görüldü.

İnce tabaka ile hemolizat, gost ve sitozole bakılmasının sebebi hastalarda, diğerlerinde olmayan bir lipit tipi bulunup bulunmadığını görmek veya herhangi bir lipidin normalden farklı miktarda bulunup bulunmadığını anlamaktı. Bu yönden hasta, taşıyıcı ve sağlıklı gruplar arasında bir fark gözlenemedi. Daha önce yapılan bir çalışmada OHA'da membran fosfolipit türlerinin normal kişilere ait eritrositlerden farklı olduğu gözlenmiştir (25).

5.5.İyon ortamı

5.5.1. Çinko

Bu çalışmada OHA hastası, taşıyıcısı ve sağlamlar arasında plazmada Zn düzeyleri açısından fark görülmedi. Çeşitli çalışmalarda OHA hastalarında plazma veya serum Zn düzeylerinin kontrole göre düşük olduğu bildirilmiştir (38, 75, 187-190). Prasad ve arkadaşları 84 Afrika kökenli hastayı inceledikleri çalışmalarında plazma Zn düzeylerinde anlamlı düşüklük tespit etmişlerdir (16). Diğer yandan OHA hastalarının plazmalarında normalle benzer Zn düzeyleri bildiren çalışmalar da vardır (191-192). Suudi Arabistanlı OHA hastalarında plazma Zn düzeylerinin normal seviyede olduğu ve bu hastalarda ayak ülserleri ve enfeksiyonların da Afrikalı hastalardan daha iyi seyirli olduğu belirtilmiştir (76). Bu çalışmada özellikle genel durumu iyi, krizler yönünden stabil hastaların seçilmesi; bu hastaların çinko düzeylerinin taşıyıcı ve kontrole yakın olmasını açıklayabilir. Literatürdeki birçok çalışma hastaların klinik durumuyla ilgili bilgi vermemektedir.

Bu çalışmada hastaların eritrosit Zn düzeyleri taşıyıcı ve sağlamdan anlamlı düzeyde yüksek bulundu. OHA'da eritrosit Zn düzeylerini, hasta ve kontrol grubunda benzer (67, 191) veya hastalarda daha düşük bulan çalışmalar vardır (16). Ülkemizden yapılan bir çalışmada hastaların hem plazmasında hem de eritrositlerinde Zn düzeylerinin düşük olduğu bildirilmiştir (193). Bir başka çalışmada ise plazma Zn düzeyleri kontrole benzer olan hastalarda, eritrosit ve saçta da Zn eksikliğine rastlanmamıştır (194). Hastalarımızın çok azı Zn desteği almasına rağmen, beklenilenin aksine , Zn almayan grupta da eksiklik gözlenmedi.

5.5.2. Bakır

Bu çalışmada, plazma Cu düzeyi açısından gruplar arasında fark görülmedi. Daha önceki çalışmalarda OHA hastalarının plazmalarında, bakır düzeyleri normalle benzer (76) veya artmış (75) olarak rapor edilmiştir.

Bu çalışmada OHA hastalarına ait eritrositlerin ortalama Cu düzeyleri taşıyıcı ve kontrollerden anlamlı olarak yüksek bulundu. Orak eritrositlerde bakır düzeyinin arttığı histolojik yöntemlerle (14) ve atomik absorpsiyon spektrofotometrisi (195) ile gösterilmiştir. Artmış eritrosit Cu' ının, sülfidril grupları varlığında süperoksit iyonları üreterek hemolize yolaçabileceği gösterilmiştir (196). Orak eritrositlerdeki

artmış Cu'nın, kemik iliğini terkederken organelleri tamamen uzaklaştırılamayan genç eritrositlerin mitokondrilerindeki birikim olabileceği düşünülmüştür (197). Diğer yandan Türkiye'den yapılan bir çalışmada OHA hastalarının plazmasında düşük Cu düzeyleri bildirilmiştir (193).

5.5.3. Demir

Bu çalışmada hastaların plazma Fe düzeyleri, taşıyıcı ve kontrollerden anlamlı düzeyde yüksek bulundu. OHA'da kronik hemoliz ve transfüzyonlara bağlı olarak plazma Fe düzeylerinde artış gelişebilir (78). Literatürde plazma Fe düzeylerini düşük bulan çalışmalar da vardır (198-199). Hastalarımızın eritrosit Fe içeriği taşıyıcılardan düşüktür. Bu durum OHA hastalarında sürekli Hb yapımının uyarılmış halde olması ve Fe depolarının yeterli gelmesiyle ilgili olabilir.

5.3.4. Kalsiyum

Çalışmamızda, hastaların plazma Ca düzeyleri taşıyıcı ve sağlamlarla benzer bulunurken hemolizat Ca düzeyleri gruplar arasında farklı bulundu. Ancak her bir grup içinde kalsiyum iyonu dağılım aralığının geniş olduğu yüksek standart sapması değerleriyle de görülmektedir. Bu nedenle hemolizat Ca düzeyleriyle ilgili sağlıklı bir değerlendirme yapılamayacağı düşünülmüştür.

Geri dönüşümsüz oraklaşmanın mekanizması tam olarak aydınlatılamamakla beraber; eritrosit membranında artan Ca konsantrasyonu, bu olayı etkileyen faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir. Eritrositlere Ca yüklenmesinin, bu hücrelerin oksitleyici baskıya hassasiyetlerini artırdığı rapor edilmiştir (200). Bu durumda, OHA hastalarında, başka çalışmalarla da gösterilen ve bu çalışmayla da doğrulanan artan eritrosit Ca konsantrasyonu; OHA'da eritrositlerdeki oksitleyici baskının etkisini ağırlaştıran bir faktör olacaktır.

Ayrıca, Ca membran proteinlerine bağlanarak, hücrenin su kaybetmesini tetikleyerek (201-202) hem geri dönüşümsüz oraklaşmaya, hem de membran yapısını bozarak eritrositin esnekliğini kaybetmesine yol açabilir.

Çalışmamızda Fe ve Cu iyonu ile oksidatif ve lipit parametreleriyle saptanan anlamlı korelasyonlar; bu iyonların OHA'daki oksidatif ortamın önemli bileşenlerinden olduğunu ve patolojik bulgularla ilişkisini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak OHA hastalarının plazma ve hemolizat iyon ortamının, sağlıklı bireylerin ortamlarından farklı olduğu görüldü. Ayrıca plazma karbonilinin; plazma Fe hemolizat Cu ve Zn ile korelasyonları, iyon dengesinin de oksitleyici baskıdan etkilendiğinin göstergesidir. Hemolizat Cu' ının, plazma trigliseridi ve hemolizat kolesterolü ile korelasyonu da iyon ve lipit ortamının etkileşimine veya aynı faktörden etkilendiklerine işaret etmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmaya genel durumu stabil (yöntemler kısmında belirtilen süreyle transfüzyon almamış, kriz geçirmemiş) OHA hastası, taşıyıcısı ve sağlıklı çocuklar dahil edildi. Çalışmanın önemli sonuçları aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. Bu çalışma ile OHA hastalarının plazma proteinlerinde genel protein hasarı ve yapısal değişim gösterildi. Ayrıca hasta grubunda, Alfa

1 globülin fraksiyonuna albümin göçünün gözlenmesi, bu hasar ve yapısal değişimden plazmanın ana proteini olan albüminin de etkilendiğini gösterdi.

2. Yine bu çalışmada OHA hastalarında; açıklanamamış ortak bir bulgu olan, düşük plazma kolesterolü ile oksitleyici baskının göstergesi olan plazma ve hemolizat MDA düzeyleri arasında anlamlı korelasyon gösterildi. Böylece oksitleyici baskının kolesterol düzeyini etkileyen faktörlerden biri olabileceği sonucuna varıldı.

3. Stabil OHA hastalarının; plazma ve eritrosit ortamında protein, lipid ve iyonlar yönünden taşıyıcı ve sağlıklı çocuklardan farklı olduğu sonucuna varıldı.

Bu sonuçlar ışığında öneriler aşağıdaki gibi özetlenebilir;

1. OHA hastaları ile ilgili yayınlarda; hastanın genel durumu, ne kadar süredir transfüzyon almadığı, destek ve tedavi amaçlı ilaç alıp almadığı konusunda bilgi verilmediği durumlarda bulguların sağlıklı karşılaştırması yapılamamaktadır. Bu yüzden hasta grubu seçilirken bu özelliklerin dikkate alınması, sonuçların değerlendirilmesinde çok yararlı olacaktır.

2. Stabil durumdaki hastalar yanında krizdeki hastaların da aynı parametrelerle incelenmesi ve genellikle ihmal edilen plazma ortamının da dikkate alınması hastalığın patofizyolojisinin aydınlatılmasını sağlayabilir.

3. Sağlam grubun aynı yöreden seçilmesi fenotiplerin benzer olması yönünden daha kesin sonuca götüren bulguların elde edilmesini sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Hebbel, R.P., W.T. Morgan, J.W. Eaton ve B.E. Hedlund. (1988). Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(1), 237-241.
2. Hebbel, R.P., J.W. Eaton, M. Balasingam ve M.H. Steinberg. (1982). Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *J Clin Invest*, 70(6), 1253-1259.
3. Rice-Evans, C., S.C. Omorphos ve E. Baysal. (1986). Sickle cell membranes and oxidative damage. *Biochem J*, 237(1), 265-269.
4. Hebbel, R.P. (1991). Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology. *Blood*, 77(2), 214-237.
5. Ney, P.A., M.M. Christopher ve R.P. Hebbel. (1990). Synergistic effects of oxidation and deformation on erythrocyte monovalent cation leak. *Blood*, 75(5), 1192-1198.
6. Kuypers, F.A., R.A. Lewis, M. Hua, M.A. Schott, D. Discher, J.D. Ernst ve diğeri. (1996). Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V. *Blood*, 87(3), 1179-1187.
7. Nash, G.B., C.S. Johnson ve H.J. Meiselman. (1984). Mechanical properties of oxygenated red blood cells in sickle cell (HbSS) disease. *Blood*, 63(1), 73-82.
8. Embury, S.H. (1986). The clinical pathophysiology of sickle cell disease. *Annu Rev Med*, 37, 361-376.
9. Liu, S.C., S.J. Yi, J.R. Mehta, P.E. Nichols, S.K. Ballas, P.W. Yacono ve diğeri. (1996). Red cell membrane remodeling in sickle cell anemia. Sequestration of membrane lipids and proteins in Heinz bodies. *J Clin Invest*, 97(1), 29-36.
10. Rifkind, J.M. (1974). Copper and the autoxidation of hemoglobin. *Biochemistry*, 13(12), 2475-2481.
11. Winterbourn, C.C. ve R.W. Carrell. (1977). Oxidation of human haemoglobin by copper. Mechanism and suggested role of the thiol group of residue beta-93. *Biochem J*, 165(1), 141-148.
12. Winterbourn, C.C., B.M. McGrath ve R.W. Carrell. (1976). Reactions involving superoxide and normal and unstable haemoglobins. *Biochem J*, 155(3), 493-502.
13. Repka T, S.O., Reddy R., Yuan J., Abrahamov A., Rachmilewitz E.A., Low PS, Hebbel RP. (1993). Nonrandom association of free iron with membranes of sickle and beta-thalassemic erythrocytes. *Blood*, 82, 3204-3210.
14. Schaeffer, K., J.A. Lofton, S.C. Powell, H.H. Osborne ve L.H. Foster. (1968). Occurrence of copper in sickling erythrocytes. *Proc Soc Exp Biol Med*, 128(3), 734-737.
15. Darbari D, L.M., Gordeuk V., Kark J.A., Castro O., Rana S., Apprey V., Kurantsin-Mills J. (2003). Fluorescence measurements of the labile iron pool of sickle erythrocytes. *Blood*, 102, 357-364.
16. Prasad, A.S., J. Ortega, G.J. Brewer, D. Oberleas ve E.B. Schoomaker. (1976). Trace elements in sickle cell disease. *JAMA*, 235(22), 2396-2398.

17. Asakura, T., Minakata, K., Adachi, K., Russell, M.O., Schwartz, E. (1977). Denatured hemoglobin in sickle erythrocytes. *J Clin Invest.*, 59:, 633-640.
18. Kuross, S.A. ve R.P. Hebbel. (1988). Nonheme iron in sickle erythrocyte membranes: association with phospholipids and potential role in lipid peroxidation. *Blood*, 72(4), 1278-1285.
19. Westerman, M.P., L.E. Pierce ve W.N. Jensen. (1964). Erythrocyte and Plasma Lipids in Sickle Cell Anemia. *Blood*, 23, 200-205.
20. Clark, M.R., R.C. Unger ve S.B. Shohet. (1978). Monovalent cation composition and ATP and lipid content of irreversibly sickled cells. *Blood*, 51(6), 1169-1178.
21. Lane, T.A., S.K. Ballas ve E.R. Burka. (1976). Lipid synthesis in human erythroid cells: the effect of sickling. *Blood*, 47(2), 189-195.
22. Lubin, B., D. Chiu, J. Bastacky, B. Roelofsen ve L.L. Van Deenen. (1981). Abnormalities in membrane phospholipid organization in sickled erythrocytes. *J Clin Invest*, 67(6), 1643-1649.
23. Yasin, Z., S. Witting, M.B. Palascak, C.H. Joiner, D.L. Rucknagel ve R.S. Franco. (2003). Phosphatidylserine externalization in sickle red blood cells: associations with cell age, density, and hemoglobin F. *Blood*, 102(1), 365-370.
24. Ren, H., K. Ghebremeskel, I. Okpala, C.C. Ugochukwu, M. Crawford ve O. Ibegbulam. (2006). Abnormality of erythrocyte membrane n-3 long chain polyunsaturated fatty acids in sickle cell haemoglobin C (HbSC) disease is not as remarkable as in sickle cell anaemia (HbSS). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 74(1), 1-6.
25. Connor, W.E., D.S. Lin, G. Thomas, F. Ey, T. DeLoughery ve N. Zhu. (1997). Abnormal phospholipid molecular species of erythrocytes in sickle cell anemia. *J Lipid Res*, 38(12), 2516-2528.
26. Glew, R.H., J. Casados, Y.S. Huang, L.T. Chuang ve D.J. VanderJagt. (2003). Correlation of the fatty acid composition and fluid property of the cholesteryl esters in the serum of Nigerian children with sickle cell disease and healthy controls. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 68(1), 61-68.
27. el-Hazmi, M.A., F.A. Jabbar ve A.S. Warsy. (1987). Cholesterol and triglyceride level in patients with sickle cell anaemia. *Scand J Clin Lab Invest*, 47(4), 351-354.
28. Erasmus, R.T., A.O. Olukoga ve O. Ojuawo. (1990). Plasma lipids and lipoproteins in Nigerian children with sickle cell anemia. *Ann Trop Paediatr*, 10(4), 421-423.
29. Rahimi, Z., A. Merat, M. Haghshenass, H. Madani, M. Rezaei ve R.L. Nagel. (2006). Plasma lipids in Iranians with sickle cell disease: hypocholesterolemia in sickle cell anemia and increase of HDL-cholesterol in sickle cell trait. *Clin Chim Acta*, 365(1-2), 217-220.
30. Shores, J., J. Peterson, D. VanderJagt ve R.H. Glew. (2003). Reduced cholesterol levels in African-American adults with sickle cell disease. *J Natl Med Assoc*, 95(9), 813-817.
31. Marzouki, Z.M. ve S.M. Khoja. (2003). Plasma and red blood cells membrane lipid concentration of sickle cell disease patients. *Saudi Med J*, 24(4), 376-379.

32. Sasaki, J., M.R. Waterman, G.R. Buchanan ve G.L. Cottam. (1983). Plasma and erythrocyte lipids in sickle cell anaemia. *Clin Lab Haematol*, 5(1), 35-44.
33. Monnet, D., F. Kane, D. Konan-Waidhet, F. Diafouka, A. Sangare ve A.E. Yapo. (1996). Lipid, apolipoprotein AI and B levels in Ivorian patients with sickle cell anaemia. *Ann Biol Clin (Paris)*, 54(7), 285-288.
34. Shalev, O. ve R.P. Hebbel. (1996). Catalysis of soluble hemoglobin oxidation by free iron on sickle red cell membranes. *Blood*, 87(9), 3948-3952.
35. Marva, E. ve R.P. Hebbel. (1994). Denaturing interaction between sickle hemoglobin and phosphatidylserine liposomes. *Blood*, 83(1), 242-249.
36. Chandra R., J.P., Bajpai V.K., Gupta C.M. (1987). Membrane phospholipid organization in calcium-loaded human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.*, 902, 253-262.
37. Williamson P.A., K.A., Zacowski R.A., Devaux P.F. (1992). Ca^{2+} induces transbilayer redistribution of all major phospholipids in human erythrocytes. *Biochemistry*, 31, 6355-6360.
38. Prasad, A., Schoomaker, E.B., Ortega, J., Brewer, G.J., Oberleas, D., Oelshlegel, FJ Jr. . (1975). Zinc deficiency in sickle cell disease. *Clin Chem*, 21, 582-587.
39. Konotey-Ahulu, F.I. (1974). The sickle cell diseases. Clinical manifestations including the "sickle crisis". *Arch Intern Med*, 133(4), 611-619.
40. Savitt, T.L. (1997). The second reported case of sickle cell anemia. Charlottesville, Virginia, 1911. *Va Med Q*, 124(2), 84-92.
41. Cook J.E. ve M.J. (1915). Severe anemia with remarkable elongated and sickle-shaped red blood cells and chronic leg ulcers. *Arch Intern Med*, 16, 644-651.
42. Hahn, E. ve E. Gillespie. (1927). Sickle cell anemia. Report of a case greatly improved by splenectomy. Experimental study of sickle cell formation. *Arch Intern Med*, 39(233-254).
43. Diggs, L. ve J. Bibb. (1939). The erythrocyte in sickle cell anemia : morphology, size , hemoglobin content, fragility and sedimentation rate. . *JAMA*, 112, 695-700.
44. Harris, J.W., H.H. Brewster, T.H. Ham ve W.B. Castle. (1956). Studies on the destruction of red blood cells. X. The biophysics and biology of sickle-cell disease. *AMA Arch Intern Med*, 97(2), 145-168.
45. Sherman, I. (1946). The sickling phenomenon, with special reference to the differentiation of sickle cell anemia from the sickle cell trait. *Bull John Hopkins Hosp*, 67, 309-324.
46. Pauling, L. ve H.A. Itano. (1949). Sickle cell anemia a molecular disease. *Science*, 110(2865), 543-548.
47. Harris, J.W. (1950). Studies on the destruction of red blood cells. VIII. Molecular orientation in sickle cell hemoglobin solutions. *Proc Soc Exp Biol Med*, 75(1), 197-201.
48. Perutz, M.F. ve J.M. Mitchison. (1950). State of haemoglobin in sickle-cell anaemia. *Nature*, 166(4225), 677-679.
49. Ingram, V.M. (1957). Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature*, 180(4581), 326-328.

50. Muirhead, H. ve M.F. Perutz. (1963). Structure of Haemoglobin. a Three-Dimensional Fourier Synthesis of Reduced Human Haemoglobin at 5-5 Å Resolution. *Nature*, 199, 633-638.
51. Johnson, F.L., A.T. Look, J. Gockerman, M.R. Ruggiero, L. Dalla-Pozza ve F.T. Billings, 3rd. (1984). Bone-marrow transplantation in a patient with sickle-cell anemia. *N Engl J Med*, 311(12), 780-783.
52. Charache, S., M.L. Terrin, R.D. Moore, G.J. Dover, R.P. McMahon, F.B. Barton ve diğerleri. (1995). Design of the multicenter study of hydroxyurea in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea. *Control Clin Trials*, 16(6), 432-446.
53. Redding-Lallinger, R. ve C. Knoll. (2006). Sickle cell disease--pathophysiology and treatment. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 36(10), 346-376.
54. Arinola, O.G., J.A. Olaniyi ve M.O. Akiibinu. (2008). Nigerian Sickle Cell Disease Patients With Plasmodium Parasitaemia. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7(6), 766-769.
55. Aksoy, M., E.W. Ikin, A.E. Mourant ve H. Lehmann. (1958). Blood groups, haemoglobins, and thalassaemia in Turks in southern Turkey and Eti-Turks. *Br Med J*, 2(5102), 937-939.
56. Yuregir, G.T., O. Donma, N. Dikmen, T. Isbir ve M. Cinar. (1987). Population studies of hemoglobin S and other variants in Cukurova, the southern part of Turkey. *Acta Haematol Jap*, 50(4), 757-765.
57. Kılınç, M., F. Koçak, G. Yüreğir ve K. Aksoy. (1999). İçel İlinde Orak Hücre Anemisi ve b -Talasemi Taşıyıcılık Sıklığı *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 24, 62-65.
58. Yapıcı, G., F.T. Aksöz ve A. Kızılok. (2007). Frequency of Carriers for Beta Thalassemia and Sickle Cell Trait in Mersin. *Anatolian Journal of Clinical Investigation*, 1(255-259).
59. Noguchi, C.T. ve A.N. Schechter. (1981). The intracellular polymerization of sickle hemoglobin and its relevance to sickle cell disease. *Blood*, 58(6), 1057-1068.
60. Eaton, W.A. ve J. Hofrichter. (1990). Sickle cell hemoglobin polymerization. *Adv Protein Chem*, 40, 63-279.
61. Bunn, H.F. (1997). Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med*, 337(11), 762-769.
62. Schechter, A.N. (2008). Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*, 112(10), 3927-3938.
63. Bertles, J.F. ve P.F. Milner. (1968). Irreversibly sickled erythrocytes: a consequence of the heterogeneous distribution of hemoglobin types in sickle-cell anemia. *J Clin Invest*, 47(8), 1731-1741.
64. McCurdy, P.R. ve A.S. Sherman. (1978). Irreversibly sickled cells and red cell survival in sickle cell anemia: a study with both DF32P and 51CR. *Am J Med*, 64(2), 253-258.
65. Erickson, B., H. Williams, F. Hummel, P. Lee ve I. Macy. (1937). The lipid and mineral distribution of the serum and erythrocytes in the hemolytic and hypochromic anemias of childhood. *The Journal of Biological Chemistry*, 118, 569-598.

66. Prasad AS, S.E., Ortega J, Brewer G.J., Oberleas D., Oelshlegel FJ Jr. (1975). Zinc deficiency in sickle cell disease. *Clin Chem*, 21, 582-587.
67. Muskiet FD, M.F. (1984). Lipids, fatty acids and trace elements in plasma and erythrocytes of pediatric patients with homozygous sickle cell disease. *Clinica Chimica Acta*, 142, 1-10.
68. Leonard, M.B., B.S. Zemel, D.A. Kawchak, K. Ohene-Frempong ve V.A. Stallings. (1998). Plasma zinc status, growth, and maturation in children with sickle cell disease. *J Pediatr*, 132(3 Pt 1), 467-471.
69. Kuvibidila, S.R., M. Sandoval, J. Lao, M. Velez, L. Yu, D. Ode ve diğerleri. (2006). Plasma zinc levels inversely correlate with vascular cell adhesion molecule-1 concentration in children with sickle cell disease. *J Natl Med Assoc*, 98(8), 1263-1272.
70. Dash, S., G.J. Brewer ve F.J. Oelshlegel, Jr. (1974). Effect of zinc on haemoglobin binding by red blood cell membranes. *Nature*, 250(463), 251-252.
71. Prasad, A.S. (1979). Trace elements: biochemical and clinical effects of zinc and copper. *Am J Hematol*, 6(1), 77-87.
72. Brewer, G.J., G.M. Hill, R.D. Dick, A.S. Prasad ve Z.T. Cossack. (1985). Interactions of trace elements: clinical significance. *J Am Coll Nutr*, 4(1), 33-38.
73. Oluwole, A.F., O.I. Asubiojo, A.D. Adekile, R.H. Filby, A. Bragg ve C.I. Grimm. (1990). Trace element distribution in the hair of some sickle cell anemia patients and controls. *Biol Trace Elem Res*, 26-27, 479-484.
74. Kapu, M.M., A.F. Fleming ve B.U. Ezem. (1976). Letter: Plasma-copper in sickle-cell anaemia. *Lancet*, 2(7977), 153.
75. Bashir, N. (1995). Serum zinc and copper levels in sickle cell anaemia and beta-thalassaemia in North Jordan. *Ann Trop Paediatr.*, 15, 291-293.
76. Alayash, A.I., A. Dafallah, A. Al-Quorain, A.H. Omer ve M.T. Wilson. (1987). Zinc and copper status in patients with sickle cell anemia. *Acta Haematol*, 77(2), 87-89.
77. Mohanty, D., M.B. Mukherjee, R.B. Colah, M. Wadia, K. Ghosh, G.P. Chottray ve diğerleri. (2008). Iron deficiency anaemia in sickle cell disorders in India. *Indian J Med Res*, 127(4), 366-369.
78. Brown, K., C. Subramony, W. May, G. Megason, H. Liu, P. Bishop ve diğerleri. (2009). Hepatic iron overload in children with sickle cell anemia on chronic transfusion therapy. *J Pediatr Hematol Oncol*, 31(5), 309-312.
79. Ortiz O.E., L.V., Bookchin RM. . (1986). Calcium accumulated by sickle cell anemia red cells does not affect their potassium (86Rb+) flux components. *Blood*, 67, 710-715.
80. Oladipo, O.O., E.O. Temiye, V.C. Ezeaka ve P. Obomanu. (2005). Serum magnesium, phosphate and calcium in Nigerian children with sickle cell disease. *West Afr J Med*, 24(2), 120-123.
81. van der Dijs, F.P., F.R. van der Klis, F.D. Muskiet ve F.A. Muskiet. (1997). Serum calcium and vitamin D status of patients with sickle cell disease in Curacao. *Ann Clin Biochem*, 34 (Pt 2), 170-172.
82. Murphy, E., L.R. Berkowitz, E. Orringer, L. Levy, S.A. Gabel ve R.E. London. (1987). Cytosolic free calcium levels in sickle red blood cells. *Blood*, 69(5), 1469-1474.

83. Liu, S.C., S. Zhai ve J. Palek. (1988). Detection of hemin release during hemoglobin S denaturation. *Blood*, 71(6), 1755-1758.
84. Harrington, J.P. ve L. Keaton. (1993). Unfolding and release of heme from human hemoglobins A, S and F. *Int J Biochem*, 25(5), 661-664.
85. Nagababu, E., M.E. Fabry, R.L. Nagel ve J.M. Rifkind. (2008). Heme degradation and oxidative stress in murine models for hemoglobinopathies: thalassemia, sickle cell disease and hemoglobin C disease. *Blood Cells Mol Dis*, 41(1), 60-66.
86. Morris, C.R., J.H. Suh, W. Hagar, S. Larkin, D.A. Bland, M.H. Steinberg ve diğerleri. (2008). Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood*, 111(1), 402-410.
87. Bosman, G.J. (2004). Erythrocyte aging in sickle cell disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 50(1), 81-86.
88. Platt, O.S. ve J.F. Falcone. (1995). Membrane protein interactions in sickle red blood cells: evidence of abnormal protein 3 function. *Blood*, 86(5), 1992-1998.
89. Platt, O.S. (2000). Sickle cell anemia as an inflammatory disease. *J Clin Invest*, 106(3), 337-338.
90. Brittain, J.E. ve L.V. Parise. (2007). Cytokines and plasma factors in sickle cell disease. *Curr Opin Hematol*, 14(5), 438-443.
91. Lee, S.P., K.I. Ataga, E.P. Orringer, D.R. Phillips ve L.V. Parise. (2006). Biologically active CD40 ligand is elevated in sickle cell anemia: potential role for platelet-mediated inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(7), 1626-1631.
92. Hebbel, R.P. ve G.M. Vercellotti. (1997). The endothelial biology of sickle cell disease. *J Lab Clin Med*, 129(3), 288-293.
93. Hebbel, R.P., M.A. Boogaerts, J.W. Eaton ve M.H. Steinberg. (1980). Erythrocyte adherence to endothelium in sickle-cell anemia. A possible determinant of disease severity. *N Engl J Med*, 302(18), 992-995.
94. Kaul, D.K., M.E. Fabry ve R.L. Nagel. (1989). Erythrocytic and vascular factors influencing the microcirculatory behavior of blood in sickle cell anemia. *Ann N Y Acad Sci*, 565, 316-326.
95. Vordermeier, S., S. Singh, J. Biggerstaff, P. Harrison, H. Grech, T.C. Pearson ve diğerleri. (1992). Red blood cells from patients with sickle cell disease exhibit an increased adherence to cultured endothelium pretreated with tumour necrosis factor (TNF). *Br J Haematol*, 81(4), 591-597.
96. Kakhiashvili, D.G., N.B. Griko, L.A. Bulla, Jr. ve S.R. Goodman. (2005). The proteomics of sickle cell disease: profiling of erythrocyte membrane proteins by 2D-DIGE and tandem mass spectrometry. *Exp Biol Med (Maywood)*, 230(11), 787-792.
97. Ghatpande, S.S., P.K. Choudhary, C.T. Quinn ve S.R. Goodman. (2010). In vivo pharmaco-proteomic analysis of hydroxyurea induced changes in the sickle red blood cell membrane proteome. *J Proteomics*, 73(3), 619-626.
98. Wilson-Okoh, D.A., C.A. Nwauche ve O.A. Ejele. (2006). Splenic changes in sickle cell anaemia. *Niger J Med*, 15(1), 20-23.

99. Gurkan, E., Y. Ergun, S. Zorludemir, F. Baslamisli ve R. Kocak. (2005). Liver involvement in sickle cell disease. *Turk J Gastroenterol*, 16(4), 194-198.
100. Voskaridou, E., D. Christoulas, A. Bilalis, E. Plata, K. Varvagiannis, G. Stamatopoulos ve diğerleri. (2010). The effect of prolonged administration of hydroxyurea on morbidity and mortality in adult patients with sickle cell syndromes: results of a 17-year, single-center trial (LaSHS). *Blood*, 115(12), 2354-2363.
101. Bao B, P.A., Beck FW, Snell D, Suneja A, Sarkar FH, Doshi N, Fitzgerald JT, Swerdlow P. (2008). Zinc supplementation decreases oxidative stress, incidence of infection, and generation of inflammatory cytokines in sickle cell disease patients. *Translational Research*, 152, 67-80.
102. Canatan, D. Orak hücre anemisi. XXX. *Ulusal Hematoloji Kongresi, Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu Kitabı*, 93-100.
103. Garrison, W.M. (1987). Reaction mechanisms in radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chem Rev*, 87, 381-398.
104. Schuessler, H. ve K. Schilling. (1984). Oxygen effect in radiolysis of proteins. Part 2. Bovine serum albumin. *Int J Radiat Biol*, 45, 267-281.
105. Stadtman, E.R. ve R.L. Levine. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25(3-4), 207-218.
106. Stadtman, E.R. (1990). Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med*, 9(4), 315-325.
107. Smith, M.A., L.M. Sayre, V.E. Anderson, P.L. Harris, M.F. Beal, N. Kowall ve diğerleri. (1998). Cytochemical demonstration of oxidative damage in Alzheimer disease by immunochemical enhancement of the carbonyl reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J Histochem Cytochem*, 46(6), 731-735.
108. Amici, A., R.L. Levine, L. Tsai ve E.R. Stadtman. (1989). Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions. *J Biol Chem*, 264, 3341-3346.
109. Uchida, K., Y. Kato ve S. Kawakishi. (1990). A novel mechanism for oxidative damage of prolyl peptides induced by hydroxyl radicals. *Biochem Biophys Res Commun* :, 169, 265-271.
110. Creeth, J.M., B. Cooper, A.S.R. Donald ve J.R. Clamp. (1983). Studies of the limited degradation of mucous glycoproteins. *Biochem J*, 211, 323-332.
111. Taborsky, G. (1973). Oxidative modification of proteins in the presence of ferrous iron and air. *Biochem*, 12, 1341-1348.
112. Bennett, V. (1978). Purification of an active proteolytic fragment of the membrane attachment site for human erythrocyte spectrin. *J Biol Chem*, 253(7), 2292-2299.
113. Wolfe, L.C., K.M. John, J.C. Falcone, A.M. Byrne ve S.E. Lux. (1982). A genetic defect in the binding of protein 4.1 to spectrin in a kindred with hereditary spherocytosis. *N Engl J Med*, 307(22), 1367-1374.
114. Rank, B.H., J. Carlsson ve R.P. Hebbel. (1985). Abnormal redox status of membrane-protein thiols in sickle erythrocytes. *J Clin Invest*, 75(5), 1531-1537.

115. Ingram, V.M. (1957). The sulphhydryl groups of sickle-cell haemoglobin. *Biochem J*, 65(4), 760-763.
116. Murayama, M. (1957). Titratable sulfhydryl groups of normal and sickle cell hemoglobins at 0 degrees and 38 degrees. *J Biol Chem*, 228(1), 231-240.
117. Allison, A.C., R. Cecil ve N.S. Snow. (1960). The SH-group content of human foetal and sickle-cell haemoglobins. *Biochem J*, 74, 273-276.
118. Wayner, D.D., G.W. Burton, K.U. Ingold, L.R. Barclay ve S.J. Locke. (1987). The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta*, 924(3), 408-419.
119. Kadota, K., Y. Yui, R. Hattori, Y. Murohara ve C. Kawai. (1991). Decreased sulfhydryl groups of serum albumin in coronary artery disease. *Jpn Circ J*, 55(10), 937-941.
120. Collier, A., R. Wilson, H. Bradley, J.A. Thomson ve M. Small. (1990). Free radical activity in type 2 diabetes. *Diabet Med*, 7(1), 27-30.
121. Southorn, P.A. ve G. Powis. (1988). Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc*, 63(4), 381-389.
122. Halliwell, B. ve S. Chirico. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*, 57(5 Suppl), 715S-724S; discussion 724S-725S.
123. Yagi, K. (1987). Lipid peroxides and human diseases. *Chem Phys Lipids*, 45(2-4), 337-351.
124. Heller, J., P. Sogni, E. Barriere, K.A. Tazi, L. Chauvelot-Moachon, M.C. Guimont ve diğ erleri. (2000). Effects of lipopolysaccharide on TNF-alpha production, hepatic NOS2 activity, and hepatic toxicity in rats with cirrhosis. *J Hepatol*, 33(3), 376-381.
125. Vavricka, S.R., E. Burri, C. Beglinger, L. Degen ve M. Manz. (2009). Serum protein electrophoresis: an underused but very useful test. *Digestion*, 79(4), 203-210.
126. Gornall, A.G., C.J. Bardawill ve M.M. David. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem*, 177(2), 751-766.
127. Drabkin, D.L. ve J.H. Austin. (1935). Spectrophotometric studies. II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide Hb and sulfhemoglobin. *J. Biol. Chem*, 112, 51.
128. Atasayar, S., H. Gurer-Orhan, H. Orhan, B. Gurel, G. Girgin ve H. Ozgunes. (2009). Preventive effect of aminoguanidine compared to vitamin E and C on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol*, 61(1), 23-32.
129. Levine, R.L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med*, 32(9), 790-796.
130. Hu, M.L., C.J. Dillard ve A.L. Tappel. (1988). In vivo effects of aurothioglucose and sodium thioglucose on rat tissue sulfhydryl levels and plasma sulfhydryl reactivity. *Agents Actions*, 25(1-2), 132-138.
131. Folch, J., M. Lees ve G.H. Sloane Stanley. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1), 497-509.
132. Malloy, H. ve K. Evelyn. (1937). The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *Journal of Biological Chemistry*, 119, 481-490.

133. Simmons, A. (1997). Hematology: A combined theoretical approach, 2nd edition Butterworth-Heinemann. 295.
134. Walter, P.B., E.B. Fung, D.W. Killilea, Q. Jiang, M. Hudes, J. Madden ve diğerleri. (2006). Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with beta-thalassaemia or sickle cell disease. *Br J Haematol*, 135(2), 254-263.
135. Buchanan, G.R. ve C.A. Holtkamp. (1981). Platelet aggregation, malondialdehyde generation and production time in children with sickle cell anaemia. *Thromb Haemost*, 46(4), 690-693.
136. Manfredini, V., L.L. Lazzaretti, I.H. Griebeler, A.P. Santin, V.D. Brandao, S. Wagner ve diğerleri. (2008). Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. *J Natl Med Assoc*, 100(8), 897-902.
137. Rother, R., L. Bell, P. Hillmen ve M. Gladwin. (2005). The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA*, 293, 1653-1662.
138. Candiano, G., A. Petretto, M. Bruschi, L. Santucci, V. Dimuccio, M. Prunotto ve diğerleri. (2009). The oxido-redox potential of albumin methodological approach and relevance to human diseases. *J Proteomics*, 73(2), 188-195.
139. Allamanis, J. (1955). Paper electrophoresis of serum proteins in Cooley's anaemia and sickle cell anaemia. *Acta Paediatr*, 44(2), 122-127.
140. Fenichel, R., J. Watson ve F. Eirich. (1950). Electrophoretic studies of the plasma and serum proteins in sickle cell anemia. *J Clin Invest*, 29, 1620-1624.
141. Choremis, C., V. Kyriakides ve E. Papadakis. (1961). Studies on the blood lipids and lipoproteins in thalassaemia and sickle cell anaemia. *J Clin Pathol*, 14, 361-364.
142. Daga, D.R., I.C. Santos, C.B. Pelissari, M.S. Leonart, A.J. Nascimento, F.O. Pedrosa ve diğerleri. (2009). Biochemical markers in sickle cell disease in a Brazilian population. *Clin Chim Acta*, 408(1-2), 133-134.
143. Bennion, B.J. ve V. Daggett. (2003). The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(9), 5142-5147.
144. Gabaldon, M. (2002). Preparation and characterization of bovine albumin isoforms. *Int J Biol Macromol*, 30(5), 259-267.
145. Takayoshi, K. (1974). Increased sensitivity to urea denaturation of corn's fraction V. *Clinica Chimica Acta*, 50(3), 345-348.
146. France, R. ve S. Grossman. (1996). Denaturation and urea gradient gel electrophoresis of arginine kinase: evidence for a collapsed-state conformation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 326(1), 93-99.
147. Salaman, M.R. ve A.R. Williamson. (1971). Isoelectric focusing of proteins in the native and denatured states. Anomalous behaviour of plasma albumin. *Biochem J*, 122(1), 93-99.
148. Beaune, G., N.B. Giraud ve L. Tshilolo. (2009). Protein profile in 45 congolese children with sickle cell anaemia. *Ann Biol Clin (Paris)*, 67(6), 607-612.
149. Vavricka, S.R., E. Burri, B. C., L. Degen ve M. Manz. (2009). Serum protein electrophoresis: an underused but very useful test. *Digestion*, 79, 203-210.

150. Janatova, J., J.K. Fuller ve M.J. Hunter. (1968). The heterogeneity of bovine albumin with respect to sulfhydryl and dimer content. *J Biol Chem*, 243(13), 3612-3622.
151. Kanenobu, K. (1996). Rapid electrophoretic analysis of heterogeneity of bovine serum albumin using a linear polyacrylamide-coated capillary. *Anal Biochem*, 241, 42-46.
152. Girard, M., H.P. Bietlot ve T.D. Cyr. (1997). Characterisation of human serum albumin heterogeneity by capillary zone electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 772(1-2), 235-242.
153. Kawakami, A., K. Kubota, N. Yamada, U. Tagami, K. Takehana, I. Sonaka ve diğerleri. (2006). Identification and characterization of oxidized human serum albumin. A slight structural change impairs its ligand-binding and antioxidant functions. *FEBS J*, 273(14), 3346-3357.
154. Musante, L., G. Candiano, A. Petretto, M. Bruschi, N. Dimasi, G. Caridi ve diğerleri. (2007). Active focal segmental glomerulosclerosis is associated with massive oxidation of plasma albumin. *J Am Soc Nephrol*, 18(3), 799-810.
155. Bruschi, M., A. Petretto, G. Candiano, L. Musante, E. Movilli, L. Santucci ve diğerleri. (2008). Determination of the oxido-redox status of plasma albumin in hemodialysis patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 864(1-2), 29-37.
156. Himmelfarb, J. ve E. McMonagle. (2001). Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. *Kidney Int*, 60(1), 358-363.
157. Suzuki, E., K. Yasuda, N. Takeda, S. Sakata, S. Era, K. Kuwata ve diğerleri. (1992). Increased oxidized form of human serum albumin in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*, 18(3), 153-158.
158. Soejima, A., N. Matsuzawa, T. Hayashi, R. Kimura, T. Ootsuka, K. Fukuoka ve diğerleri. (2004). Alteration of redox state of human serum albumin before and after hemodialysis. *Blood Purif*, 22(6), 525-529.
159. Terawaki, H., K. Yoshimura, T. Hasegawa, Y. Matsuyama, T. Negawa, K. Yamada ve diğerleri. (2004). Oxidative stress is enhanced in correlation with renal dysfunction: examination with the redox state of albumin. *Kidney Int*, 66(5), 1988-1993.
160. Mera, K., M. Anraku, K. Kitamura, K. Nakajou, T. Maruyama ve M. Otagiri. (2005). The structure and function of oxidized albumin in hemodialysis patients: Its role in elevated oxidative stress via neutrophil burst. *Biochem Biophys Res Commun*, 334(4), 1322-1328.
161. Goswami, K., D.N. Nandakumar, B.C. Koner, Z. Bobby ve S.K. Sen. (2003). Oxidative changes and desialylation of serum proteins in hyperthyroidism. *Clinica Chimica Acta*, 337, 163-168.
162. Çavuşlu, N. (2002). İdiopatik glomerüler kapiller duvar bozukluklarında plazma proteinlerinde yapısal bozukluğun denatürasyonla gösterilmesi. *Akdeniz Üniversitesi*, 101405/ TO 1405.
163. Odhiambo, A., D.H. Perlman, H. Huang, C.E. Costello, H.W. Farber, M.H. Steinberg ve diğerleri. (2007). Identification of oxidative post-translational modification of serum albumin in patients with idiopathic pulmonary arterial

- hypertension and pulmonary hypertension of sickle cell anemia. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 21(14), 2195-2203.
164. Badiaga, S., K. Barrau, P. Parola, P. Brouqui ve J. Delmont. (2002). Contribution of nonspecific laboratory test to the diagnosis of malaria in febrile travelers returning from endemic areas: value of hypocholesterolemia. *J Travel Med*, 9(3), 117-121.
 165. Ozkaya, G., Yildirim, T., Aydin, K., Ergüven, S., Unal, S. (2006). A plasmodium falciparum malaria case originated from Mozambique: clues for the diagnosis and therapy. *Mikrobiyol Bul*, 40(4), 407-411.
 166. Niwa, K. (2006). The coronary circulation in adults with congenital heart disease. *Intern Med*, 45(21), 1199-1200.
 167. Brar, P., G.Y. Kwon, S. Holleran, D. Bai, A.R. Tall, R. Ramakrishnan ve diğerleri. (2006). Change in lipid profile in celiac disease: beneficial effect of gluten-free diet. *Am J Med*, 119(9), 786-790.
 168. Hartman, C., Tamary, H., Tamir, A., Shabad, E., Levine, C., Koren, A., Shamir, R. (2002). Hypocholesterolemia in children and adolescents with beta-thalassemia intermedia. *J Pediatr*, 141(4), 543-547.
 169. Papanastasiou, D.A., T. Siorokou ve F.A. Haliotis. (1996). beta-Thalassaemia and factors affecting the metabolism of lipids and lipoproteins. *Haematologia (Budap)*, 27(3), 143-153.
 170. Muntoni, S., B. Batetta, S. Dessi, S. Muntoni ve P. Pani. (1992). Serum lipoprotein profile in the Mediterranean variant of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Eur J Epidemiol*, 8 Suppl 1, 48-53.
 171. Johnsson, R. ve N.E. Saris. (1981). Plasma and erythrocyte lipids in hereditary spherocytosis. *Clin Chim Acta*, 114(2-3), 263-268.
 172. Yokoyama, M., Y. Suto, H. Sato, K. Arai, S. Waga, J. Kitazawa ve diğerleri. (2000). Low serum lipids suggest severe bone marrow failure in children with aplastic anemia. *Pediatr Int*, 42(6), 613-619.
 173. Shalev, H., J. Kapelushnik, A. Moser, H. Knobler ve H. Tamary. (2007). Hypocholesterolemia in chronic anemias with increased erythropoietic activity. *Am J Hematol*, 82(3), 199-202.
 174. Yuditskaya, S., A. Tumblin, G.T. Hoehn, G. Wang, S.K. Drake, X. Xu ve diğerleri. (2009). Proteomic identification of altered apolipoprotein patterns in pulmonary hypertension and vasculopathy of sickle cell disease. *Blood*, 113(5), 1122-1128.
 175. Bereza, U.L., G.J. Brewer ve G.M. Hill. (1985). Effect of dietary cholesterol on erythrocyte peroxidant stress in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta*, 835(3), 434-440.
 176. Muldoon, M.F., A. Marsland, J.D. Flory, B.S. Rabin, T.L. Whiteside ve S.B. Manuck. (1997). Immune system differences in men with hypo- or hypercholesterolemia. *Clin Immunol Immunopathol*, 84(2), 145-149.
 177. Muldoon, M.F., S.B. Kritchevsky, R.W. Evans ve V.E. Kagan. (1996). Serum total antioxidant activity in relative hypo- and hypercholesterolemia. *Free Radic Res*, 25(3), 239-245.
 178. Segal, A.Z., R.I. Chiu, P.M. Eggleston-Sexton, A. Beiser ve S.M. Greenberg. (1999). Low cholesterol as a risk factor for primary intracerebral hemorrhage: A case-control study. *Neuroepidemiology*, 18(4), 185-193.

179. Buchowski, M.S., L.L. Swift, S.A. Akohoue, S.M. Shankar, P.J. Flakoll ve N. Abumrad. (2007). Defects in postabsorptive plasma homeostasis of fatty acids in sickle cell disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 31(4), 263-268.
180. Kato, G.J., S. Martyr, W.C. Blackwelder, J.S. Nichols, W.A. Coles, L.A. Hunter ve diğerleri. (2005). Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with sickle cell disease are associated with pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality. *Br J Haematol*, 130(6), 943-953.
181. Canatan, D., Oguz, N., Özsanca, A., Aslan, İ., Bengü, A., Gürman, A., Sarica, B. (2000). Natural coagulation inhibitors and lipids in sickle cell anemia. *Turkish J Haematology*, 17(3), 119 -122.
182. Zorca, S., L. Freeman, M. Hildesheim, D. Allen, A.T. Remaley, J.G.t. Taylor ve diğerleri. (2010). Lipid levels in sickle-cell disease associated with haemolytic severity, vascular dysfunction and pulmonary hypertension. *Br J Haematol*.
183. Schwarz, H.P., M.B. Dahlke ve L. Dreisbach. (1977). Phospholipid composition of blood plasma, erythrocytes, and "ghosts" in sickle cell disease. *Clin Chem*, 23(9), 1548-1550.
184. Akinyanju, P.A. ve C.O. Akinyanju. (1976). Plasma and red cell lipids in sickle cell disease. *Ann Clin Lab Sci*, 6(6), 521-524.
185. Das, S.K. ve R.C. Nair. (1980). Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation of normal and sickled erythrocytes. *Br J Haematol*, 44(1), 87-92.
186. Westerman, M.P., M. Diloy-Puray ve M. Streczyn. (1979). Membrane components in the red cells of patients with sickle cell anemia. Relationship to cell aging and to irreversibility of sickling. *Biochim Biophys Acta*, 557(1), 149-155.
187. Hasanato, R.M. (2006). Zinc and antioxidant vitamin deficiency in patients with severe sickle cell anemia. *Ann Saudi Med*, 26(1), 17-21.
188. Phebus, C.K., B.J. Maciak, M.F. Gloninger ve H.S. Paul. (1988). Zinc status of children with sickle cell disease: relationship to poor growth. *Am J Hematol*, 29(2), 67-73.
189. Akenami, F.O., Y.A. Aken'Ova ve B.O. Osifo. (1999). Serum zinc, copper and magnesium in sickle cell disease at Ibadan, south western Nigeria. *Afr J Med Med Sci*, 28(3-4), 137-139.
190. Karayalcin, G., P. Lanzkowsky ve A.B. Kazi. (1979). Zinc deficiency in children with sickle cell disease. *Am J Pediatr Hematol Oncol*, 1(3), 283-284.
191. Abshire TC, E.J., Githens J. H. ve Hambidge M. (1988). Zinc status in children and young adults with sickle cell disease. *Am J Dis Child*, 142(12), 1356-1359.
192. Alayash, A.I. (1989). Zinc and some zinc dependent enzymes in sickle cell anemia. *Int J Vitam Nutr Res*, 59(4), 388-389.
193. Kilinc, Y., M. Kumi, B. Yilmaz ve A. Tanyeli. (1991). A comparative study of zinc and copper values in serum, erythrocytes and urine in sickle cell homozygotes and heterozygotes. *Acta Paediatr Scand*, 80(8-9), 873-874.
194. Kaynak, F., Gurkan, E., Urunsak, M., Baslamışlı, F., Kocak, R. (2005). Effect of folate supplementation on zinc status in patients with sickle cell disease. *Haematology*, 8(3), 458-461.

195. Schaeffer, K., J.E. Young, G.W. Buckaloo ve S.M. Howell. (1970). Fractionation studies of copper in erythrocytes from normal, sickle cell anemia, and hemoglobin C disease. *Proc Soc Exp Biol Med*, 134(1), 213-216.
196. Kumar, K.S., C. Rowse ve P. Hochstein. (1978). Copper-induced generation of superoxide in human red cell membrane. *Biochem Biophys Res Commun*, 83(2), 587-592.
197. Schaeffer, K., J. Aikens, M. Williamson ve E.J. Olson. (1981). The distribution of copper in sickling erythrocytes as determined by an IBM cell separator. *J Natl Med Assoc*, 73(7), 653-656.
198. Jeyakumar, L.H., E.O. Akpanyung, A.A. Akinyemi ve G.O. Emerole. (1987). An investigation into the iron status of children with sickle-cell disease in western Nigeria. *J Trop Pediatr*, 33(6), 326-328.
199. Nagaraj Rao, J. ve A.M. Sur. (1980). Iron deficiency in sickle cell disease. *Acta Paediatr Scand*, 69(3), 337-340.
200. Jain, S.K. ve S.B. Shohet. (1984). A novel phospholipid in irreversibly sickled cells: evidence for in vivo peroxidative membrane damage in sickle cell disease. *Blood*, 63(2), 362-367.
201. Clark, M.R., N. Mohandas ve S.B. Shohet. (1980). Deformability of oxygenated irreversibly sickled cells. *J Clin Invest*, 65(1), 189-196.
202. Glader, B.E. ve D.G. Nathan. (1978). Cation permeability alterations during sickling: relationship to cation composition and cellular hydration of irreversibly sickled cells. *Blood*, 51(5), 983-989.