



T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI  
ANABİLİM DALI

**ORAK HÜCRE ANEMİSİNDE HEMOLİZİN  
PLAZMA OKSİDASYONUNA VE NİTRİK OKSİT  
METABOLİZMASINA ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Gamze ÇELMELİ**

**Antalya, 2013**



**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI  
ANABİLİM DALI**

**ORAK HÜCRE ANEMİSİNDE HEMOLİZİN  
PLAZMA OKSİDASYONUNA VE NİTRİK OKSİT  
METABOLİZMASINA ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Gamze ÇELMELİ**

**Tez Danışmanı: Doç.Dr. O. Alphan KÜPESİZ**

*“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”*

**Antalya, 2013**

“Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2010.01.0103.007 Proje No ile desteklenmiştir”

## TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım tüm değerli hocalarıma,

Tezimin tüm aşamalarında ve asistanlık eğitimim süresinde her türlü desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç.Dr. O.Alphan KÜPESİZ'e

Tezimin yapımında yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr. Mutay ASLAN'a, Prof.Dr. Bülent ANTMEN'e, Araş.Gör.Dr. Serdar DOĞAN'a ve Merkez Laboratuvarı çalışanlarına,

Asistanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım kliniğimizden uzmanlığını almış ve halen çalışmakta olan tüm uzman doktor arkadaşlarıma,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma ve hemşire arkadaşlarıma,

Her zaman desteğini, sevgisini esirgemeyen eşime ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa:

**Simgeler ve Kısaltmalar Dizini**

**Şekiller Dizini**

**Tablolar Dizini**

|                                                       |           |
|-------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b>                               | <b>1</b>  |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b>                              | <b>3</b>  |
| 2.1. Hemoglobinin Yapısı ve Görevi                    | 3         |
| 2.2. Orak Hücre Hastalığı                             | 4         |
| 2.2.1. Tarihçe                                        | 4         |
| 2.2.2. Epidemiyoloji                                  | 4         |
| 2.2.3. Patofizyoloji                                  | 6         |
| 2.2.3.1. Hemolizin NO metabolizmasına etkisi          | 7         |
| 2.2.3.2. Oksidatif stres ve NO                        | 8         |
| 2.2.3.3. Vasküler Disfonksiyon ve NO                  | 11        |
| 2.2.4. Klinik bulgular                                | 13        |
| 2.2.4.1. Akut komplikasyonlar                         | 13        |
| 2.2.4.2. Kronik komplikasyonlar ve hedef organ hasarı | 16        |
| 2.2.5. Tanı                                           | 18        |
| 2.2.6. Tedavi                                         | 20        |
| 2.2.7. Prognoz                                        | 24        |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>                             | <b>25</b> |
| 3.1. Hemoliz Varlığının Değerlendirilmesi             | 25        |
| 3.2. Plazma Protein Karbonil Seviyelerinin Ölçümü     | 26        |
| 3.3. Plazma Lipid Oksidasyonunun Ölçümü               | 26        |
| 3.4. Plazma Nitrit ve Nitrat Ölçümü                   | 27        |
| 3.5. Plazma Protein Nitrasyonunun Ölçümü              | 27        |
| 3.6. İstatistiksel Analiz                             | 27        |
| <b>4. BULGULAR</b>                                    | <b>28</b> |
| <b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b>                           | <b>33</b> |
| <b>6. ÖZET</b>                                        | <b>37</b> |
| <b>7. ABSTRACT</b>                                    | <b>38</b> |
| <b>8. KAYNAKLAR</b>                                   | <b>39</b> |

## KISALTMALAR DİZİNİ

|                                   |                                        |
|-----------------------------------|----------------------------------------|
| <b>•NO<sub>2</sub></b>            | Nitrojen dioksit                       |
| <b>AGS</b>                        | Akut Göğüs Sendromu                    |
| <b>ALP</b>                        | Alkalen fosfataz                       |
| <b>cGMP</b>                       | Cyclic guanosine monophosphate         |
| <b>Cl</b>                         | Klor                                   |
| <b>CO<sub>2</sub></b>             | Karbondioksit                          |
| <b>COX</b>                        | Siklooksijenaz                         |
| <b>DAN</b>                        | 2,3,-diaminoaphthalene                 |
| <b>DNA</b>                        | Deoksiribo nükleik asit                |
| <b>DNPH</b>                       | 2,4-dinitrofenilhidrazin               |
| <b>EDHF</b>                       | Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör |
| <b>EDRF</b>                       | Endothelium-derived relaxing factor    |
| <b>EKG</b>                        | Elektrokardiografi                     |
| <b>EKO</b>                        | Ekokardiogram                          |
| <b>FAD</b>                        | Flavin adenin dinükleotid              |
| <b>FMN</b>                        | Flavin mononükleotid                   |
| <b>G6PD</b>                       | Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz           |
| <b>GCSF</b>                       | Granülosit koloni stimule edici faktör |
| <b>GFR</b>                        | Glomerüler filtrasyon hızı             |
| <b>GnRH</b>                       | Gonadotropin releasing hormon          |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | Hidrojen Peroksit                      |
| <b>Hb</b>                         | Hemoglobin                             |
| <b>HNO<sub>2</sub></b>            | Nitröz asid                            |
| <b>HPLC</b>                       | High-performance liquid chromatography |
| <b>ICAM-1</b>                     | İnterselüler adezyon molekülü-1        |
| <b>IEF</b>                        | İzoelektrik fokuslama                  |
| <b>ISC</b>                        | Irreversible sickle cell               |
| <b>K</b>                          | Potasyum                               |
| <b>LDH</b>                        | Laktat Dehidrogenaz                    |
| <b>MCH</b>                        | Ortalama eritrosit hemoglobini         |
| <b>MCP-1</b>                      | Monosit kemoatraktan protein-1         |
| <b>MCV</b>                        | Ortalama eritrosit hacmi               |
| <b>NADPH</b>                      | Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat  |
| <b>NFκB</b>                       | Nükleer faktör kappa B                 |

|                                   |                                          |
|-----------------------------------|------------------------------------------|
| <b>NO</b>                         | Nitrik Oksit                             |
| <b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> | Nitrit                                   |
| <b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> | Nitrat                                   |
| <b>NOS</b>                        | Nitrik oksit sentaz                      |
| <b>NRBC</b>                       | Nucleated red blood cell                 |
| <b>O<sub>2</sub></b>              | Oksijen                                  |
| <b>O<sub>2</sub><sup>·-</sup></b> | Süperoksit anyonu                        |
| <b>OHA</b>                        | Orak Hücre Anemisi                       |
| <b>OHH</b>                        | Orak Hücre Hastalığı                     |
| <b>ONOO<sup>-</sup></b>           | Peroksinitrit                            |
| <b>ONOOOCO<sub>2</sub></b>        | Nitrozoperoksokarbonat                   |
| <b>PaO<sub>2</sub></b>            | Parsiyel oksijen basıncı                 |
| <b>PCR</b>                        | Polimeraz zincir reaksiyonu              |
| <b>PDE III</b>                    | Fosfodiesteraz III                       |
| <b>PKA</b>                        | Protein kinaz A                          |
| <b>PKG I ve II</b>                | Protein kinaz G I ve II                  |
| <b>RDW</b>                        | Eritrosit dağılım genişliği              |
| <b>RNA</b>                        | Ribonükleik asit                         |
| <b>SERCA</b>                      | Sarkoplazmik/endoplazmik retikulum ATPaz |
| <b>SOD</b>                        | Süperoksit dismutaz                      |
| <b>TRV</b>                        | Tricuspid regurgitant jet velocity       |
| <b>Tyr<sup>•</sup></b>            | Tirozin radikali                         |
| <b>VCAM-1</b>                     | Vasküler hücre adezyon molekülü-1        |
| <b>VOK</b>                        | Vazo-oklüziv kriz                        |
| <b>XO</b>                         | Ksantin Dehidrogenaz                     |
| <b>YPHF</b>                       | Yüksek persistan fetal hemoglobin        |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| <b><u>Şekil</u></b>                                                                                               | <b><u>Sayfa</u></b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 2.1. $\beta^S$ geninin kaynak aldığı bölgeler ve dağılımı                                                         | 5                   |
| 2.2. Orak hücre anemisinde artmış intravasküler hemoliz ve oksidatif stresin NO metabolizması üzerindeki etkileri | 8                   |
| 2.3. Süperoksit ( $O_2^-$ ) iyonunun Süperoksit Dismutaz (SOD) ve Nitrik oksit (NO) ile oluşturduğu reaksiyonlar  | 9                   |
| 2.4. Proteinlerin karbonilasyonu                                                                                  | 9                   |
| 2.5. İzoprostan oluşumu                                                                                           | 10                  |
| 2.6. 3-Nitrotirozin oluşumu                                                                                       | 10                  |
| 3.1. Protein hidrazon oluşumu                                                                                     | 26                  |
| 4.1. LDH izoenzim tayini                                                                                          | 29                  |
| 4.2. Serbest plazma hemoglobin düzeyleri                                                                          | 30                  |
| 4.3. Plazma 8-izoprostan düzeyleri                                                                                | 30                  |
| 4.4. Plazma protein karbonil düzeyleri                                                                            | 31                  |
| 4.5. Plazma nitrit ve nitrat seviyeleri                                                                           | 31                  |
| 4.6. Plazma nitrotirozin düzeyleri                                                                                | 32                  |
| 4.7. Korelasyon gösteren biyokimyasal veriler                                                                     | 32                  |

## TABLÖLAR DİZİNİ

| <b><u>Tablo</u></b>                                                | <b><u>Sayfa</u></b> |
|--------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <b>2.1.</b> Orak hücre sendromlarının ayırıcı tanısı               | <b>20</b>           |
| <b>4.1.</b> Yaş ve cinsiyet dağılımı                               | <b>28</b>           |
| <b>4.2.</b> Hasta ve kontrol grubunda variant hemoglobin değerleri | <b>28</b>           |
| <b>4.3.</b> Hasta ve kontrol grubunda biyokimyasal veriler         | <b>29</b>           |
| <b>4.4.</b> LDH izoenzim değerleri                                 | <b>29</b>           |

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Orak hücre anemisinde (OHA) görülen vasküler bozuklukların kompleks patofizyolojisini tek bir mekanizma ile açıklamak mümkün değildir. Ancak oksidatif stresin bu mekanizmalar içerisinde önemli bir yere sahip olduğu çeşitli çalışmalar ile rapor edilmiştir [1,2]. Orak hücre anemisinde oluşan hemoglobin yapısının (Hb S) 2 kat daha fazla oksidasyona maruz kaldığı gösterilmiştir [3]. Tüm bu bulgulara ilave olarak, bu hereditör kan hastalığında hemoglobinde oluşan kalıtsal instabiliteye bağlı olarak hem grubunun salındığı ve hem grubunda mevcut demirin ise oksidasyon-redüksiyon siklusu içerisinde oksidatif hücre hasarına neden olduğu ortaya konmuştur [4,5].

Orak hücre anemili hastalarda görülen vasküler tromboz ve artmış nötrofil-endotel adezyonu vasküler disfonksiyonun varlığını düşündürür [6,7]. Vasküler fonksiyonun lokal kontrolünde nitrik oksit (NO) önemli bir modulatördür. Nitrik oksit, hücresel düzeyde etkisini intraselüler cGMP düzeylerini artırarak gösterir. Nitrik oksite bağlı oluşan hücresel cGMP düzeylerindeki artış düz kas hücrelerinde vazodilatasyona, trombositlerde aggregasyonun inhibe olmasına ve nötrofil-endotel adezyonunda azalmaya neden olur [8].

Orak hücre anemili hastalarda oluşan intravasküler hemoliz, eritrositlerden hemoglobin, arginaz ve laktat dehidrogenaz (LDH) salınımına neden olur. Arginaz NO'nin öncülü olan arginin aminoasidinin yıkılmasına neden olur ve NO yapımı azalır. Ayrıca plazmaya salınan hemoglobin NO ile reaksiyona girerek nitrat ve methemoglobin oluşturur. Bu reaksiyon sonucunda NO metabolize olur ve fizyolojik etkisini kaybeder [9].

Nitrik oksitin fizyolojik etkisinin inhibisyonunda, intravasküler oksidatif stresin varlığı ve antioksidanların seviyesi de önemlidir. Orak hücre anemili hastalarda rapor edilen artmış ksantin dehidrogenaz (XO) ve vasküler NADPH oksidaz aktivitesi intravasküler süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ) salınımına neden olur. Nitrik oksit, süperoksit anyonu ve hem grubunda bulunan demir ile çok hızlı reaksiyona girer. Nitrik oksitin süperoksit anyonu ile reaksiyonu sonucunda peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) oluşur. Peroksinitritin kendisi çok kuvvetli bir oksidan olup protein ve lipid oksidasyonuna sebep olur. Plazma  $ONOO^-$  oluşumunun en önemli göstergesi plazma protein nitrasyonudur [10-14].

Orak hücre anemisinde oluşan oksidanlar aracılığıyla NO fizyolojik etkisini göstermeden metabolize olur. Bu gibi durumlarda damar duvarında nötrofil adezyonu ve trombosit agregasyonu artarak, inflamatuvar bir yanıt gelişir. Bu durum hastalıkla bağlantılı olan pulmoner hipertansiyon, priapizm, bacak ülserasyonu ve nonhemorajik vasküler oklüzyonun patofizyolojisinde rol oynamaktadır [15].

**Çalışmamızın amacı;**

- 1) Orak hücre anemili hastalarda ve kontrol grubunda hemoliz varlığını değerlendirmek,
- 2) Her iki grupta plazma protein ve lipid oksidasyonu, plazma protein nitrasyonu ve nitrik oksit metabolitlerini ölçmek,
- 3) Elde edilen verilerin özellikle intravasküler hemoliz göstergesi olan serbest hemoglobin ile ilişkisini incelemek ve
- 4) Hemolizin NO metabolizmasını, plazma oksidasyon ve nitrasyonunu ne yönde etkilediğini araştırmaktır.

Ayrıca elde edilen verilerin hastalığın vasküler patogenezi aydınlatma yönünden yeni bilgiler sağlaması amaçlandı.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hemoglobinin Yapısı Ve Görevi

Hemoglobin molekülü toplam dört polipeptit zincirden oluşan, 64-64,5kDa büyüklüğünde bir tetramerdir. Her polipeptit zinciri demir içeren hem ve globin moleküllerinden meydana gelir. Hemoglobin molekülü iki farklı globin zinciri içerir. Embriyo, fetus ve erişkinde  $\alpha$  ve  $\beta$  benzeri globinlerden oluşan farklı hemoglobinler sentezlenir. Alfa benzeri zincirler (zeta [ $\zeta$ ], alfa [ $\alpha$ ]) 16. kromozomda, beta globin benzeri zincirler (epsilon [ $\epsilon$ ], beta [ $\beta$ ], delta [ $\delta$ ] ve gama [ $\gamma$ ]) ise 11. kromozom üzerinde kodlanırlar. Erken embriyonik hayatta yolk sactan üç farklı hemoglobin sentezlenir: Hb Gower-1 ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), Hb Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ) ve Hb Gower-2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ). 14. gestasyon haftasından sonra bu embriyonik hemoglobinlerin yerini Hb F ( $\alpha_2\gamma_2$ ) almaya başlar. Hb F fetal hayatta ve erken neonatal dönemdeki major hemoglobindir. Gestasyonun yaklaşık 38. haftasında fetal hemoglobinden erişkin hemoglobin yapımına geçiş olur. Sağlıklı bir yetişkinde %96-%98 Hb A<sub>1</sub> ( $\alpha_2\beta_2$ ), %3,5'tan daha az Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ), daha az miktarda da Hb F ( $\alpha_2\gamma_2$ ) bulunur [16,17].

Hemoglobinin içyapısı ferröz formdaki demiri ( $\text{Fe}^{+2}$ ) su ve oksidasyon reaksiyonlarından koruyan hidrofobik bir ortam sağlarken, dış yüzeyindeki hidrofilik radikaller suda çözülebilirliğini sağlar [16].

Hem oksijeni reversibl olarak bağlayarak dokulara oksijen ( $\text{O}_2$ ) transportunu sağlar. Demirin Ferrik forma ( $\text{Fe}^{+3}$ ) oksidasyonu hemin hematine, hemoglobin molekülünün ise methemoglobine dönüşmesine neden olarak oksijen transpotunu bozar. Globin hemi oksidasyon reaksiyonlarından korur (tampon). Ayrıca  $\alpha$  globin zincirinin N-terminal ucu karbondioksit ( $\text{CO}_2$ ) ile bağlanarak dolaşımdaki  $\text{CO}_2$  transportunun %10'unu sağlar [16].

Hemoglobin molekülü nitrik oksit (NO) metabolizması ve transportunda da görevlidir. Özellikle oksihemoglobin NO'ye yüksek afinite gösterir. Hem grubundaki demir atomu NO'yi kuvvetli şekilde bağlar. Bu şekilde dokulara oksijen salınır, hemoglobin-NO birleşerek methemoglobin oluşturur ve nitrat iyonları salınarak NO metabolize olur. Deoksihemoglobinin ise NO'ye afinitesi düşüktür. Hipoksik durumlarda NO hemoglobinden ayrılarak dokulara salınır ve başta vasodilatasyon olmak üzere fizyolojik etkilerini gösterir. Böylece NO kan seviyesi dengede tutulur [18].

## 2.2. Orak Hücre Hastalığı

11. kromozomdaki  $\beta$  globin geninin 6. kodonundaki tek nokta mutasyonu sonucu (GAG nükleotid dizisinde Adenin yerine Timin gelir)  $\beta$  globin zincirinin altıncı pozisyonundaki glutamik asit valin ile yer değiştirir ve hemoglobin S ( $\alpha_2\beta_2^{6\text{Glu-Val}}$ ) oluşur. Orak hücre hastalığı (OHH) Hb S'i homozigot veya bileşik heterozigot taşıyan bireylerde görülen, değişken klinik tablolar oluşturabilen bir grup hastalıktır. Otozomal resesif kalıtımla geçer. Orak hücre anemisi (OHA) ise Hb S'i genetik olarak homozigot durumda taşıyan hastalar için kullanılan terimdir ve orak hücre hastalıklarının prototipidir. Hb S ile bileşik heterozigot olarak bulunan hemoglobin varyantları klinik tablonun şiddetini belirler. Orak hücre anemisi (Hb S/S) ve Hb S/ $\beta^0$  ağır klinik tablo oluştururken Hb SC, Hb S/ $\beta^+$ , Hb S/D-Punjab, Hb S/O-Arab daha hafif klinik tablo oluşturur. Orak hücre taşıyıcıları (Hb AS) ise klinik belirti oluşturmadığı için orak hücre hastalığı grubunda sayılmaz ve tesadüfen saptanırlar [19, 20]

### 2.2.1. Tarihçe

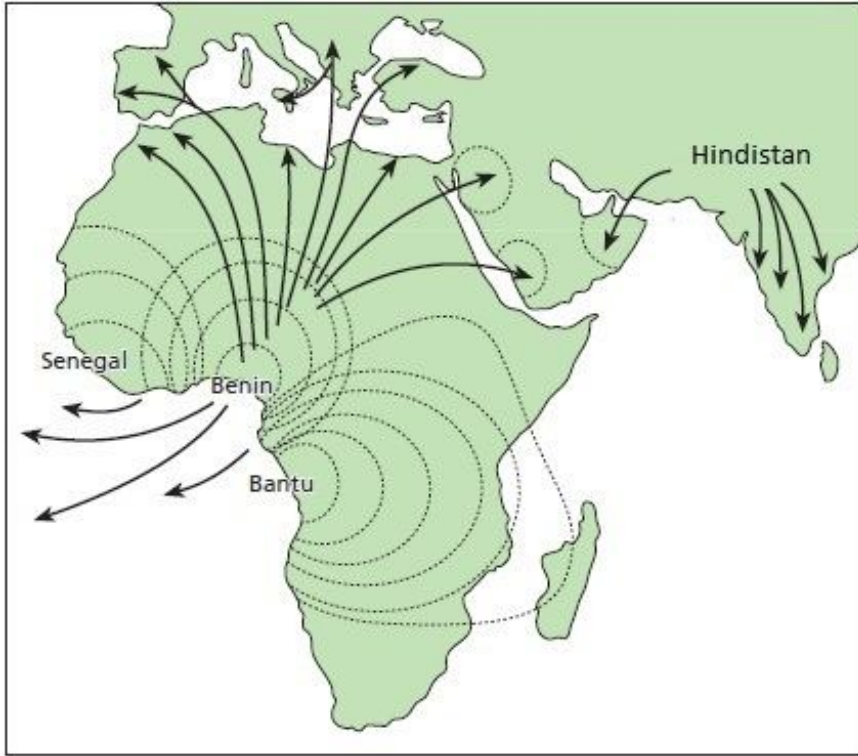
1874 yılında Afrikalı Horton [21] özellikle yağışlı mevsimlerde sıklığı artan, kan anormallikleriyle ve ateşli, ağrılı krizlerle seyreden, kalıtsal bir hastalıktan söz etmiştir. Orak hücre hastalığının tıbbi olarak ilk tanımlanması 1910 yılında Herrick [22] tarafından yapılmıştır. Herrick sırt ve kas ağrısı ile hastaneye yatırdığı Karayip'li bir öğrencide anemi ve orak şeklindeki eritrositleri tanımlamış, şikâyetlerinin orak şeklindeki eritrositlerle ilişkili olabileceğini belirtmiştir. Pauling ve Itano [23] 1949'da orak hücre anemisinin beta globin genindeki bir mutasyondan kaynaklandığını keşfetmesiyle orak hücre hastalığı moleküler düzeyde tanımlanan ilk hastalık olmuştur. Ayrıca hastalarda elektroforez yöntemi ile Hb S'i saptayarak taşıyıcılarda da Hb S ve Hb A'nın birlikte bulunduğunu göstermişlerdir. Bundan 9 yıl sonra Ingram [24] Hb S'te glutamik asit yerine valinin geldiğini göstermiştir.

### 2.2.2. Epidemiyoloji

Orak hücre hastalığı en yaygın görülen kalıtsal hemoglobinopati olup, her yıl yaklaşık 300 bin hasta çocuk doğmakta ve milyonlarca insan bu hastalıktan etkilenmektedir. Bu yüzden dünya genelinde önemli bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır. Özellikle endemik sıtma hastalığı olan bölgelerde orak hücre taşıyıcılığının daha sık görüldüğü, taşıyıcılığın Plasmodium malaria'ya karşı koruyucu

olduğu ve bu kişilerde sıtma hastalığının morbidite ve mortalitesinin belirgin düşük olduğu gösterilmiştir [25,26]. Orak hücre taşıyıcılığının prevalansı batı, orta ve doğu Afrika'da %40'a kadar çıkmaktadır. Bu bölgelerde saptanan mutasyonlar kaynak aldığı yerlere (Senegal, Kamerun, Benin, Bantu) göre isimlendirilmişlerdir [27]. Hastalığın merkezi Afrika olmakla beraber göçler ile tüm dünyaya yayılmıştır. Karaibler, Orta ve Güney Amerika, Akdeniz çevresindeki ülkeler (Türkiye ve Yunanistan'ı içine alan), Ortadoğu ve Hindistan hastalığın sık görüldüğü diğer bölgelerdir (Şekil 2.1.) [16,28,29].

Çukurova bölgesi ülkemizde OHA'nin en sık bulunduğu yöredir. Hb S ülkemizde özellikle Arapça konuşan ve Eti-Türkü olarak adlandırılan etnik grupta yüksek olarak bulunmaktadır [30]. Türkiye genelinde sıklık %0,37-0,6 arasında iken, özellikle Çukurova bölgesinde bazı yörelerde sıklık %3-44 arasında saptanmıştır [31, 32]. Ayrıca Sağlık Bakanlığı ve Ulusal Hemoglobinopati Konseyinin son verilerine göre taşıyıcı sıklığı Adana'da %10, Antakya'da %10.5, Mersin'de %13.6 olup, ülkemizdeki toplam OHA'li hasta sayısı 1200 civarındadır [33].



Şekil 2.1.  $\beta^S$  geninin kaynak aldığı bölgeler ve dağılımı [16].

### 2.2.3. Patofizyoloji

Deoksi durumundaki Hb S hızlı bir şekilde polimerize olur, taktoid adı verilen küçük, katı, mekik şeklinde cisimciklere dönüşür. Bu kristaloidlerin eriyebilirliği ve akışkanlığı normal Hb yapısından daha düşüktür. Orak hücre hemoglobininin likid ve solid fazları arasındaki dengeyi tayin eden en önemli dört faktör oksijen düzeyi, HbS düzeyi, ısı ve Hb S dışındaki diğer hemoglobinlerin varlığıdır. Hb S düzeyi ise viral ve bakteriyel infeksiyonlar, alkol, oksihemoglobin disosiasyon eğrisinin sağa kaymasına neden olan pH azalması ve 2,3 difosfogliserat düzeyinin azalması, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) eksikliği, gebelik, menstruasyon, ısı değişiklikleri, psikososyal stres gibi birçok tetikleyicilerden etkilenir [34,35]. Normal hücrelerin hemoglobin konsantrasyonu 30 g/dL'dir ancak Hb S'in 20.8 g/dL'den daha yoğun konsantrasyonlarda viskozitesi azalarak jelleşir. Bu şekilde oraklaşmış hücreler küçük kapillerleri geçmek için gerekli şekil değiştirme yeteneğini kaybederler ve mikrovasküler oklüzyonlara neden olurlar. Böylece dokularda nekroz ve fibroze kadar ilerleyen harabiyet ve organ disfonksiyonu gelişir [36].

Oraklaşmayı etkileyen bir diğer faktör de hücrenin dehidrasyon derecesidir. Hücrelerin deoksijenasyonu intracelluler  $Ca^{2+}$  artışına neden olur. Oraklaşmış hücrelerde intracelluler  $Ca^{2+}$  dört kat daha yüksek saptanmıştır [37]. Böylece  $Ca^{2+}$  aktivasyonlu  $K^+$  kanalı (Gardos kanalı) ve K-Cl kotransport kanalı aktive olarak hücrenin  $K^+$  ve su kaybına neden olur. Hücrelerin dehidratasyonu sonucu yükselen hemoglobin konsantrasyonu oraklaşmanın artmasına katkıda bulunur [38,39].

Oraklaşmış hücrenin reoksijenasyonu ise kararsız bir form oluşturur ve hücre hızlı bir şekilde otooksidasyona uğrayarak reaktif oksijen radikallerini oluşturur. Hb S'in otooksidasyonundan kaynaklanan subklinik kronik oksidatif stres eritrosit membranındaki lipidlerin peroksidasyonuna ve iskelet proteinlerinde yapısal değişikliklere neden olur. Bu yapısal hasar oraklaşmayı geri dönüşümsüz kılar ve orak hücreler kapillerlerden geçerken hemolize uğrar [40,41].

Orak hücre hastalığında hemoliz değişmez bir bulgudur. Orak şeklini alan eritrositler hem damar içinde, hem de damar dışında yıkıma uğrar. Damar dışındaki hemoliz HbS'in stabil olmamasına ve hücre duvarındaki oksidatif hasarlanmaya bağlı olarak monosit ve makrofajların fagositozu ile özellikle de dalakta gerçekleşir. Eritrositlerin yaklaşık üçte biri intravasküler hemolize giderler. Bu muhtemelen

oksijenasyon ve deoksijenasyon sırasında membran filamentlerinin kaybına ve fragmente eritrositlerin artmış kompleman duyarlılığına bağlıdır [36,40,42].

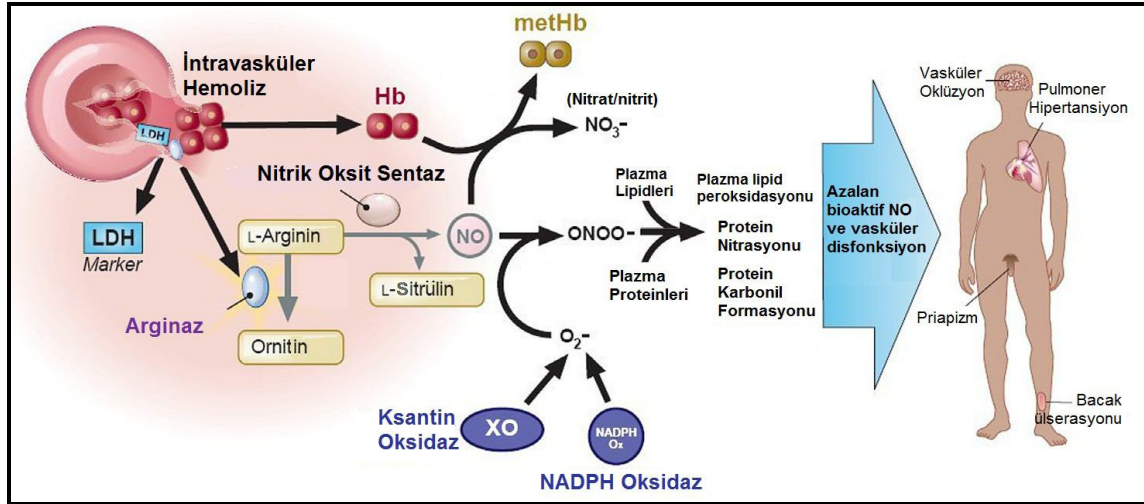
Orak hücre anemisinde artmış intravasküler hemoliz sonucu açığa çıkan serbest hemoglobin ve artmış reaktif oksijen radikalleri NO'nin fizyolojik etkisini gösteremeden metabolize olmasına neden olur ve vasküler inflamasyon sürecini başlatır [18].

#### **2.2.3.1. Hemolizin NO metabolizmasına etkisi**

'Endothelium-derived relaxing factor (EDRF)' olarak da bilinen NO vasküler fonksiyonun lokal kontrolünde önemli bir modülatördür. Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi izoformları tarafından L-argininden sentez edilir. Bu reaksiyon için ortamda oksijen ve bazı diğer kofaktörlerin [nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN), tetrahidrobiopterin ve kalmodulin] bulunması gerekir [43,44]. NO'nin ilk olarak endotelde varlığının gösterilmesinin ardından, serebellum, makrofajlar, nötrofiller, mast hücreleri, nonadrenerjik ve nonkolinerjik inhibitör nöronlar, fibroblastlar, düz kas hücreleri ve epitel hücreleri gibi vücutta pek çok hücre tarafından sentezlenip salıverildiği ortaya konmuştur. NOS izoenzimlerine özgü genler kromozom 7 (endotelyal NOS-eNOS), 12 (nöral NOS-nNOS) ve 17 (indüklenebilen NOS-iNOS) üzerinde bulunmuştur [45]. Nitrik oksit sentezleyen enzim-I (nNOS) ve NOS-III (eNOS) sürekli, ancak az miktarda ve kalsiyuma bağımlı olarak (enzim aktivasyonu için hücre içi kalsiyumun artması gerekir) salınır. Çeşitli diğer hücrelerde ise NOS-II ya da iNOS bulunur ve bunlar kalsiyuma bağımlı değildir, özgül sitokinlerin (endotoksin, eksotoksin veya oksidan ajanlar) indüklemesi sonrasında fazla miktarda salgılanır ve stres durumunda NOS-I ve NOS-III'ten 1000 kat daha fazla NO sentezleyebilmektedir [46].

NO, molekül ağırlığı 30 kDa olan, yağda çözünürlüğü yüksek ve biyolojik membranlardan kolaylıkla geçebilen gaz yapısında bir moleküldür. Serbest oksijen radikali olan NO oldukça reaktiftir ve hemoglobin ile hızla etkileşiminden dolayı *invivo* olarak oldukça kısa yarılanma ömrüne (1-5 s) sahiptir. Bu bağlanma, oksijene göre 3000 kat daha hızlı olmaktadır. NO, kanda hemoglobinin hem grubu ile etkileşerek hızlı bir şekilde inaktif ve stabil ürünler olan nitrit ve nitrata metabolize olur. Nitrat, NO'nin kandaki stabil biyoreaksiyon ürünüdür. Hemoglobin içermeyen doku kültüründe esas stabil ürün nitrittir [8].

Orak hücre anemili hastalarda oluşan intravasküler hemoliz, eritrositlerden hemoglobin, arginaz ve laktat dehidrogenaz (LDH) salınımına neden olur. Arginaz L-arginini ornitine dönüştürür ve NO prekürsörünün azalmasına, böylece NO yapımının azalmasına neden olur. Plazmaya salınan serbest hemoglobin NO ile reaksiyona girerek nitrit, nitrat ve methemoglobin oluşturur. Bu reaksiyon sonucunda NO fizyolojik etkisini kaybeder (Şekil 2.2.) [15].



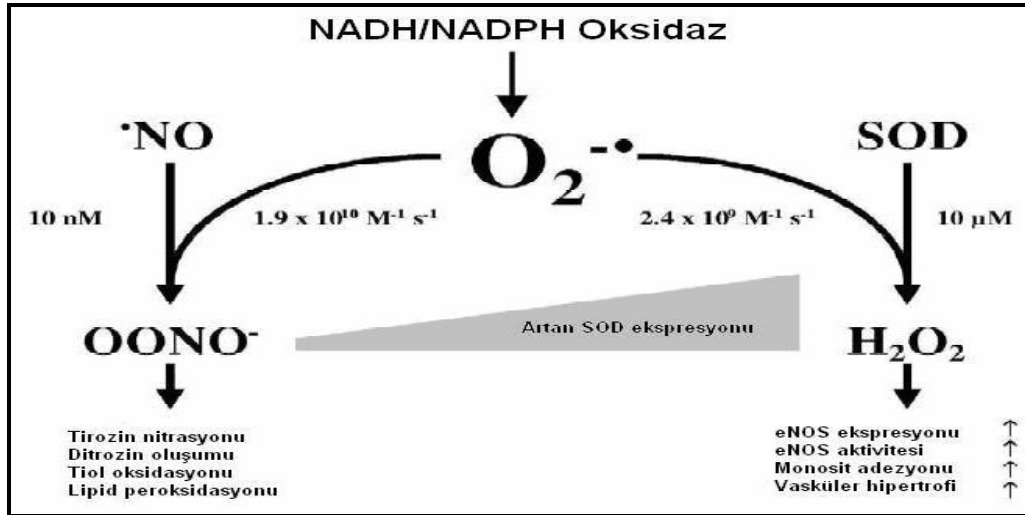
**Şekil 2.2.** Orak hücre anemisinde artmış intravasküler hemoliz ve oksidatif stresin NO metabolizması üzerindeki etkileri [15].

### 2.2.3.2. Oksidatif stres ve NO

Nitrik oksitin fizyolojik etkisinin inhibisyonunda, intravasküler oksidatif stresin varlığı ve antioksidanların seviyesi de önemlidir. Fizyolojik koşullarda NO antioksidan etkisiyle vasküler yapıda koruyucu bir rol üstlenmektedir. Orak hücre anemili hastalarda ise rapor edilen artmış ksantin dehidrogenaz (XO) ve vasküler NADPH oksidaz aktivitesi intravasküler  $O_2^-$  (süperoksit anyonu) salınımına neden olur. Nitrik oksitin süperoksit anyonu ile reaksiyonu sonucunda peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) oluşur [13-15].

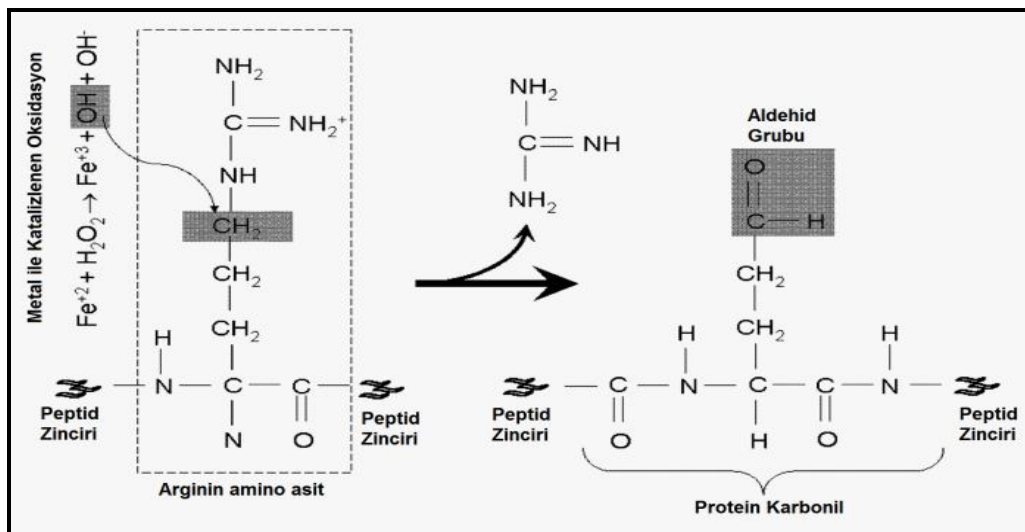
Süperoksit radikalinden peroksinitrit oluşumu ile süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) oluşumu arasında bir yarışma söz konusudur. Süperoksit radikalinin NO ile reaksiyona girme yeteneğinin SOD ile reaksiyona girme yeteneğine göre 3-6 kat daha fazla olmasına rağmen SOD düzeylerinin NO düzeylerine göre daha fazla olduğu fizyolojik koşullarda peroksinitrit oluşumu ihmal edilebilir düzeydedir. Dolayısıyla eNOS'tan fizyolojik koşullarda üretilen NO, SOD'un

fizyolojik konsantrasyonlarının varlığında antioksidan etki gösterirken, iNOS aracılığı ile üretilen çok yüksek konsantrasyonlardaki NO, peroksinitrit oluşumuna neden olur (Şekil 2.3.). Peroksinitritin kendisi çok kuvvetli bir oksidan olup protein ve lipid oksidasyonuna ve plazma protein nitrasyonuna sebep olur [13,47].



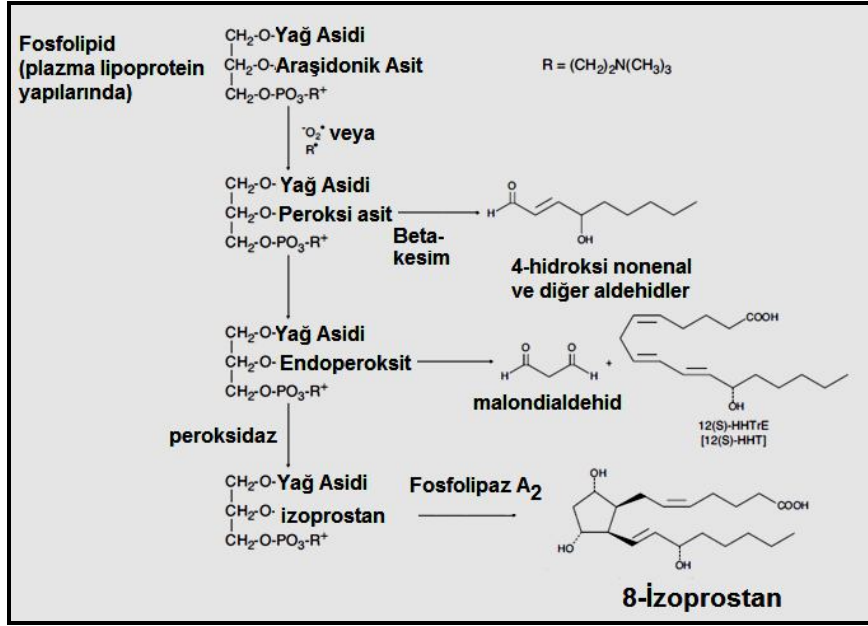
Şekil 2.3. Süperoksit ( $O_2^{\bullet-}$ ) iyonunun süperoksit dismutaz (SOD) ve nitrik oksit (NO) ile oluşturduğu reaksiyonlar [47].

Protein oksidasyonunun en yaygın ve genel göstergesi protein karbonil miktarıdır. Demir ve bakır gibi kolay indirgenen ve oksitlenen iyonlar proteinlerde katyon bağlayıcı bölgelere bağlanıp, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve süperoksit anyonu ( $O_2^{\bullet-}$ ) ile reaksiyona girebilirler. Bu reaksiyon sonucunda lizin, arginin, prolin ve histidin gibi aminoasitlerin amin yan zincirleri karbonillere dönüşür (Şekil 2.4.) [48].



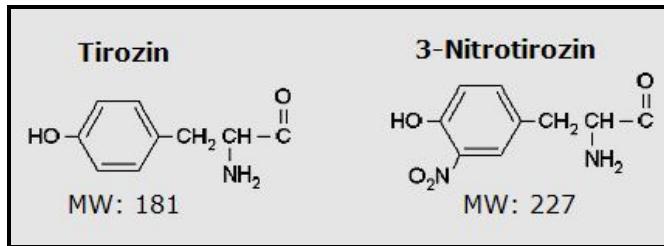
Şekil 2.4. Proteinlerin karbonilasyonu [48].

İzoprostanlar ise lipid oksidasyonunun bir göstergesidir. Plazmada izoprostanlar fosfolipidlerin oksidasyonu sonucunda oluşan eikosanoidlerdir. Oksidatif stresin arttığı durumlarda plazma ve idrar seviyeleri yükselir. Sağlıklı insanlardan elde edilen plazma serbest 8-iso prostoglandin  $F_{2\alpha}$  (8-isoprostan) seviyesi 40-100 pg/ml'dir ve bu düzey yaşla birlikte artış gösterir. İzoprostan oluşum şeması Şekil 2.5.'de gösterilmiştir [11,12, 49].



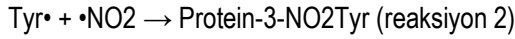
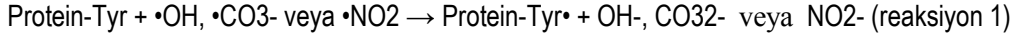
Şekil 2.5. İzoprostan oluşumu.

Peroksinitrit oluşumu protein tirozin rezidülerinin nitrasyonuna sebebiyet verir. 3-nitrotirozin, 3-bromotirozin ve 3-klorotirozin protein nitrasyonunun belirteçleri olmakla birlikte en sık kullanılan parametre 3-nitrotirozin miktarıdır [50]. Bu modifikasyon, oluşan nitrojen radikallerinin ( $\bullet\text{NO}_2$ ) aromatik amino asitlerle reaksiyona girmesiyle meydana gelir (Şekil 2.6.) [51].



Şekil 2.6. 3-Nitrotirozin oluşumu.

3-Nitrotirozin oluşumu için nitrojen dioksit ( $\bullet\text{NO}_2$ ), tirozil radikali ( $\text{Tyr}\bullet$ ) ile reaksiyona girmelidir. Bu reaksiyon, difüzyon ile sınırlandırılacak bir hızda ( $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) meydana gelir ve iki basamaklı olarak gerçekleşir. İlk olarak, proteinde bulunan Tyr amino asidi hücre içinde oluşan radikaller ile oksidasyona uğrayarak tirozil radikalini ( $\text{Tyr}\bullet$ ) oluşturur (reaksiyon 1). İkinci olarak,  $\text{Tyr}\bullet$  nitrojen dioksit ( $\bullet\text{NO}_2$ ) ile reaksiyona girerek nitrotirozini ( $\text{NO}_2\text{Tyr}$ ) oluşturur (reaksiyon 2) [51].



Tirozin nitrasyonunda hız kısıtlayıcı basamak, nitrojen dioksit ( $\bullet\text{NO}_2$ ) oluşumudur. Nitrojen dioksit ( $\bullet\text{NO}_2$ ), nitrik oksit'den (NO) köken alan nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) molekülünün oksidasyonu ile oluşur. Enzimatik ve non-enzimatik olarak meydana gelen  $\bullet\text{NO}_2$ , proteinlerde bulunan tirozin nitrasyonu için hız kısıtlayıcı faktördür [50-52].

### 2.2.3.3. Vasküler disfonksiyon ve NO

Endotel hücreleri, nitrik oksit ve prostasiklin, endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör (EDHF) gibi vazodilatörlerin yanı sıra, tromboksan A2, endotelin-1 ve anjiotensin II gibi vazokonstriktörlerin salınımına aracılık ederek kan basıncı ve kan akımı kontrolüne katkıda bulunurlar. Vasküler yatakta tonus kontrolü, vazokonstriktör ve vazodilatatör ajanlar arasındaki denge ile sağlanır. Endotel kaynaklı en önemli vazodilatatör NO'tir [53].

Membranları kolayca geçebilen ve oldukça lipofilik bir molekül olan NO hücresel düzeyde etkisini intraselüler cGMP düzeylerini arttırarak gösterir. NO'nin başlıca fizyolojik etkileri:

- **Vasodilatasyon:** Endotel hücresi tarafından sentezlenen NO, difüzyonla vasküler düz kas hücrelerine geçerek guanilat siklazı aktive edip cGMP (cyclic guanosine monophosphate) seviyesini arttırır. cGMP etkisini, cGMP bağımlı kinazlar olan protein kinaz G I ve II (PKG I ve II) aracılığı ile göstermektedir. PKG I, NO aracılıklı etkilerden asıl sorumlu olan izoenzimdir. Bunun sonucunda potasyum kanalları fosforile,  $\text{Ca}^{+2}$  kanalları hiperpolarize olur. Hücre içi  $\text{Ca}^{+2}$  miktarı azalır, kalsiyum-kalmodulin-miyozin hafif zincir kinaz kompleksinin oluşumu azalır, bu da düz kas hücresinde gevşemeye yol açar. NO, cGMP yolundan başka sodyum ve potasyum kanallarını doğrudan aktive

ederek de vazodilatasyona katkıda bulunur. Sepsiste olduğu gibi, aşırı NO varlığı sistemik hipotansiyona neden olabilirken tersi durumda NO sentezi azaldığında pulmoner hipertansiyon saptanmaktadır [7, 8, 54].

- **Antitrombotik etki:** NO ve NO donörleri trombositlerde cGMP aracılığı ile PKG'yi stimüle ederler ve trombin gibi intraselüler kalsiyum düzeylerini arttırmak suretiyle trombosit agregasyonu sağlayan agonistlerin etkilerini inhibe ederler. Sarkoplazmik retikulumun membran proteinlerinden olan fosfolamban fosforilasyonuna bağlı olarak sarkoplazmik/endoplazmik retikulum ATPaz (SERCA) aracılı intraselüler kalsiyum sekestrasyonu ve cGMP bağımlı fosfodiesteraz III (PDE III) inhibisyonu sonrasında gözlenen protein kinaz A (PKA) aktivasyonu, NO'nin antitrombotik etkinliğine aracılık eden mekanizmalardır [7, 8, 54].
- **Antiadhezif etki:** NO vasküler hücre adezyon molekülü 1 (VCAM-1), monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1), interselüler adezyon molekülü 1 (ICAM-1) proteinlerinin, E ve P selektinlerin ekspresyonunu inhibe ederek lökosit adezyonunu azaltır. Bu etkinin redoks duyarlı transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kappa B (NFkB)'nin ekspresyonunun inhibisyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [7, 8, 55].
- **Antioksidan Etki:** NO antioksidan etkinliğini Hem oksijenaz I, ferritin ve SOD ekspresyonunu indüklemek ve böylece süperoksid düzeylerini ve peroksinitrit oluşumunu azaltarak gerçekleştirir [7, 8, 15, 47].
- NO'nin ayrıca parakrin ve otokrin yollar ile yeniden yapılanmayı (remodelling), endotel hücre apoptozisini, anjiogenezi, hücre büyümesi ve migrasyonunu ve hücre geçirgenliğini regüle edici etkileri, sinir sisteminde nörotransmitter fonksiyonu, yüksek konsantrasyonlarında sitotoksik etkisiyle immün sistemin bir parçası olarak organizmayı koruyucu görevleri bulunmaktadır [8].

OHA'nde görülen vasküler fonksiyon kaybında bir çok kompleks mekanizma birlikte rol almaktadır. NO biyoyararlanımındaki azalma sonucu eritrosit ve lökositlerin vasküler endotele artmış adezyonu, artmış koagülasyon aktivasyonu ve reperfüzyon hasarı sonucu artmış oksidatif stres sonucu gelişen vasküler inflamasyon doku hasarına ve orak hücre anemisinin değişken klinik tablosunun oluşmasına neden olur [7, 8].

#### 2.2.4. Klinik bulgular

Orak hücre anemisinin klinik bulguları ciddi hemoliz ve hemolitik anemi tarafından uyarılan kompensatuar mekanizmalar ile birçok doku ve organı ilgilendiren yaygın vazo-oklüzyon ve enfarktüse bağlı olarak oluşmaktadır. Hb S'li çocuklar doğumda anemik değildir. Hemolitik aneminin gelişimi postnatal Hb F'in düşmesiyle paralel seyreder ve yaklaşık 4. ayda belirginleşir. Orak hücre anemili hastalarda ortalama hemoglobin düzeyi 6-9 g/dL arasında olmasına rağmen, düşük hemoglobin düzeyi gayet iyi tolere edilmektedir. Çünkü oksijen disosisayon eğrisindeki kaymaya bağlı olarak eritrositler içindeki Hb S'in oksijene affinitesi azalmıştır. Bu durum hastaların düşük hemoglobin düzeylerine rağmen niçin klasik anemi belirtilerini göstermediğini açıklamaktadır. OHA'nin klinik bulguları akut veya kronik komplikasyonlar ile orak hücre krizlerine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır [19,36].

##### 2.2.4.1. Akut komplikasyonlar

- 1) **Vaso-oklüzif krizler (VOK):** Oraklaşan eritrositlerin kan damarlarını tıkanması sonucu oluşan doku infarktına bağlı olarak gelişen akut ve ağrılı ataklardır. Hastaların dörtte birinden fazlasında hastalığın ilk belirtisi olarak kendini göstermektedir. Sıklıkla uzun kemikleri içeren ekstremitelerin derin ağrısı şeklinde görülür. Daktilitis genellikle 3 yaşın altındaki çocuklarda görülen el ve ayak sırtındaki ağrılı ataklardır. 3 yaşından sonra hematopoez periferel kemiklerden daha merkeze doğru kayar ve daha çok kollar, bacaklar, kostalar ve sternum gibi alanlar tutulur. Mezenterik dolaşımdaki mikrovasküler oklüzyonlar ise karaciğer, dalak ve lenf nodlarının kapsüller gerilimiyle sonuçlanır ve akut batını taklit eden klinik tablo oluşur. Ağrı ile birlikte ateş, halsizlik ve lökositoz görülebilir. Kriz birkaç saat ya da birkaç gün sürebilir [56,57].
- 2) **Akut Göğüs Sendromu (AGS):** VOK'den sonra hastaneye yatışların en sık sebebi ve OHH'da ölüme neden olan en yaygın ikinci komplikasyondur [58]. OHA'de insidansı %24'tür. Ateş, göğüs ağrısı, takipne, öksürük, hipoksemi, hışıltı gibi semptomlara ek olarak akciğerde yeni gelişen infiltrasyon ile karakterizedir. Lökositoz sıklıkla görülür, trombositoz eşlik edebilir. İnflamatuvar bir mediatör olan sekretuar fosfolipaz 2 seviyesi yükselmiştir. VOK nedeniyle hastaneye yatan hastalarda ateş ve yüksek fosfolipaz 2

seviyelerinin birlikte bulunması AGS gelişimi açısından iyi bir prediktif göstergedir [59]. AGS'nun %50'sinin nedeni enfeksiyonlardır (virüsler, atipik etkenler, pnömokok, Parvovirüs B19 gibi). Ayrıca infarktüs ve yağ embolisine bağlı olarak da gelişebilir. Astımlı çocuklarda, yüksek hemoglobin ve beyaz küre değerlerinde AGS riski artmaktadır. Yüksek Hb F seviyeleri ise koruyucudur [60,61].

- 3) **İnme:** Akut semptomatik inme özellikle homozigot OHA'de ve erken çocukluk yaşlarında daha sıktır. Hb SS hastalarında ilk dekatta insidansı %11 olup genellikle enfarktlara bağlıdır. İleri yaşlarda sıklığı azalır ve daha çok hemorajilere bağlı oluşur. Kronik endotel hasarına bağlı olarak intrakranial arterlerin (özellikle Willis poligonunun büyük arterlerinin; internal karotid arter, orta ve anterior serebral arter gibi) intima tabakasındaki değişiklikler sonucu lümeni daralarak oblitere olur. Enfarktların bir diğer nedeni de tromboembolilerdir. Hemiparezi, yürüyüş veya konuşma bozuklukları, mental durum değişiklikleri, baş ağrısı gibi semptomlar görülebilir. Hastaların 2/3'sinde belirgin nörolojik düzelme görülür ancak nörokognitif kayıplar da sıktır. Tedavi edilmeyen hastaların %70'inde ilk 3 yıl içinde rekkürrens görülür ve prognozu daha kötüdür. Erken tanı ve tedavi önemlidir. Ayrıca transkranial doppler, beyin MRI gibi tarama yöntemleri ile, Hb S'i %30'un altında tutarak (eritrosit transfüzyonu, hidroksiüre tedavisi gibi) veya profilaktik aspirin ile koruyucu önlemler alınmalıdır [62-65].
- 4) **Splenik Sekestrasyon Krizi:** Henüz otosplenektomi gelişmemiş OHA hastalarında dalağın ani ve hızlı olarak ileri derecede genişlemesi sonucu eritrosit kütesinin büyük bir kısmının dalakta tutulmasıdır. Akut splenik sekestrasyon krizi, OHA hastalarında önde gelen ölüm nedenlerinden birisidir. Sekestrasyon krizi her yaşta görülebilmekle birlikte homozigot OHA'de en yüksek prevelans 5-24 aylar arasındadır. En sık üst solunum yolu enfeksiyonu ve akut göğüs sendromu ile birlikte görülmektedir. İlk ataktan sonra hastaların %49'unda tekrar ettiği saptanmıştır. Klinik olarak hastalarda aniden başlayan halsizlik, solukluk solunum sıkıntısı, karın şişliği, karının sol tarafında ağrı, kusma ve şok görülmektedir. Klinik bulgular bazen hastanın hastaneye ulaştırılmadan kaybedilebileceği kadar hızlı ilerleyebilmektedir. Muayenede ağır hipotansiyon, kalp yetmezliği ve splenomegali bulunmaktadır.

Hemoglobin düzeyi hastanın normal değerlerinin yarısına kadar düşerken; retikülositoz ve trombositopeninin eşlik etmesi beklenir [66, 67].

- 5) **Aplastik Kriz:** Normal şartlar altında OHA hastaları kısalmış eritrosit ömrünü kemik iliğinde eritrosit üretimini 6-8 kat arttırarak kompanse etmektedirler. Kemik iliği aktivitesinin araya giren bir viral veya bakteriyel infeksiyon tarafından engellenmesi hemotokrit düzeyinde günlük %10-15 kadar düşmeye neden olmakta ve kompensatuar retikülositoz görülmemektedir. Aplastik kriz sırasında ilk olarak kısa yaşam süresine sahip Hb F'den fakir hücreler dolaşımdan kalkmaktadır. Daha yüksek oranda Hb F içeren hücreler daha uzun süre dolaşımda kalmaktadır. Bu doğal seleksiyon aplastik kriz sırasında HbF içeren hücrelerin daha yüksek oranda saptanmasına neden olmaktadır. Aplastik krizlerin büyük bir kısmı kısa ve hafif olduğundan tedavi gerektirmemektedir. Bazı hastalara eritrosit transfüzyonu yapılması gerekebilmektedir. İyileşme döneminde hastanın yeterli folik asit alması sağlanmalıdır. Aplastik krize neden olan viral infeksiyonların en önemlisi parvovirüs B19 infeksiyonudur. Parvovirüsün geç eritrosit öncülerinin farklılaşmasını engellediği ve hemolitik anemiler sırasında görülen geçici eritroid aplaziden sorumlu olduğu gösterilmiştir [68,69].
- 6) **Priapism:** Penisin ağrılı ve sürekli ereksiyonu olan priapismın ortalama görülme yaşı 12 olup OHA'de %30-45 sıklıkta gelişir. Genellikle sabah saatlerinde görülüp muhtemelen nokturnal asidoz ve dehidratasyon ile ilişkilidir. Tekrarlama olasılığı %50'dir. Çocukluk çağında priapism öyküsü olan kişilerin %10-50'sinde erişkin yaşlarda seksüel disfonksiyon ve impotans gelişir. Priapizmde corpus cavernosum oraklaşan hücrelerle tıkanmıştır, glans penis ve corpus spongiosum ise korunmuştur. Artmış intravasküler hemoliz ve NO biyoyaralanımındaki azalmanın da priapism patogenezindeki rolü gösterilmiştir. Tekrarlayan priapismi önlemek için oral pseudoefedrin, hidroksiüre, sildenafil, etilefrin preparatları ve GnRH analogu olan leuprolide enjeksiyonunun sınırlı etkileri gösterilmiştir. Ayrıca NO ve adenosin sinyal ileti yolları ile ilgili yoğun çalışmalar yapılmaktadır [70-72].

#### 2.2.4.2. Kronik komplikasyonlar ve hedef organ hasarı

- 1) **Büyüme ve Gelişme:** Büyüme geriliği boydan çok vücut ağırlığını etkiler ve görülme sıklığı açısından kadın veya erkek arasında belirgin bir fark yoktur. Erişkin döneminde genellikle normal boya ulaşılır fakat kilo normal seviyenin altında seyreder. Bu hastalarda büyüme hormonu seviyeleri ve stimülasyon testleri genelde normaldir. Hastalarda seksüel olgunlaşmada da gecikme vardır. Özellikle erkeklerde erişkin dönemde sperm motilite, morfoloji ve sayısına bağlı olarak fertilitate kaybı görülebilir [73,74].
- 2) **Santral Sinir Sistemi:** OHA'de %20-35 sıklığında fokal nörolojik kayba neden olmayan, sadece beyin MR'da bir veya daha fazla odakta T2 hiperintens sinyal değişiklikleri ve nöropsikolojik bozukluklarla seyreden sessiz enfarktlar görülmektedir. Bu çocukların okul başarısı düşüktür, nöropsikolojik testlerle akademik performansları takip edilmelidir [75].
- 3) **Kardiovasküler Sistem:** Kronik anemi ve kompensatuar artmış kardiak debiye bağlı olarak hastaların %50'sinde sol ventrikül hipertrofisi, birçoğunda da kardiyomegali görülmektedir. Hafif şiddette sistolik üfürüm genelde duyulur. EKO'da sağ ve sol ventrikül dilatasyonu, EKG'de uzun QT sendromu görülebilir. Pulmoner hipertansiyon en önemli kardiak komplikasyonlardan biridir, OHA'li çocuklarda prevalansı %10'dur. Patogeneizde artmış hemoliz ve NO biyoyaralanımında azalma sorumlu tutulmaktadır. Pulmoner arter sistolik basıncının > 35 mmHg, TRV (tricuspid regurgitant jet velocity) > 2.5 m/s olması ile tanı koyulur [76, 77].
- 4) **Solunum Sistemi:** OHA'li hastalarda gün içinde veya nokturnal hipoksemi gelişebilir ve PaO<sub>2</sub> (parsiyel oksijen basıncı) düşük seyreder. Pulmoner fibrozis, kronik akciğer hastalığı ve astım prevalansı artmıştır [78].
- 5) **Böbrekler:** OHA'de erken yaşlarda renal kan akımı ve GFR değerleri normalden yüksekken yaşla birlikte belirgin şekilde azalır. Renal medulladaki vasa rekta'ların harabiyetine bağlı olarak böbrek konsantrasyon yeteneğini kaybeder. Hipostenüri OHA'de en erken ve en sık görülen renal anomalidir. Hastaların idrar çıkışları 2000 ml/m<sup>2</sup>/gün'e kadar artabilir, dehidratasyona yatkınlık oluşur, nokturi gelişir, bu da klinikte genellikle enürezis şeklinde görülür. Renal kan akımının zamanla azalmasıyla renal tübüler asidifikasyon

defektleri ve papiller nekroz gelişir. Papiller nekroz makroskopik veya mikroskopik hematüri oluşumuna neden olur. Genelde hematüri etyolojisi benign olmakla birlikte OHA'de renal medullar karsinoma riski arttığı için ileri tetkiklerle bu tanı dışlanmalıdır. Ayrıca idrarla sodyum kaybı artmış (hiporeninemik hipoaldesteronizm), potasyum atılımı bozulmuştur. Proteinüri, nefrotik sendrom ve kronik böbrek yetmezliği gözlenebilen diğer böbrek anomalileridir [79,80].

- 6) **Karaciğer ve Safra yolları:** kronik hepatomegali, transaminaz yüksekliği, kronik anemiye bağlı pigmente safra taşlarında artış (18 yaşına kadar hastaların en az %30'unda kolelityazis gelişir), transfüzyon ilişkili hepatit (özellikle Hepatit C), intrahepatik oraklaşma krizi, tekrarlayan transfüzyonlara bağlı artmış demir yükü ve hepatik fibrozis, tekrarlayan vasküler obstruksiyon ve disfonksiyona bağlı hepatik nekroz, portal fibroz ve siroz görülebilir [81].
- 7) **Dalak:** Yaklaşık 6. ayda çocuklarda splenomegali belirginleşir ve erken çocukluk döneminde devam edebilir. Ancak kısa süre içinde tekrarlayan dalak içindeki oraklaşma krizlerine bağlı fonksiyonel hiposplenizm gelişir, ardından da dalak progresif fibroze gider (otosplenektomi). OHA'lı çocuklar pnömokok ve H.influenza pnömoni ve menenjitine normal çocuklardan 300-600 kat daha duyarlıdır. Ayrıca gram negatif enterik organizmalar ve Salmonella enfeksiyonuna yatkınlık artmıştır. OHA'de ölümlerin en büyük sebebi enfeksiyonlardır ve özellikle hayatın ilk 5 yılında gerçekleşir [74,82].
- 8) **Kemikler:** Femur başı avasküler nekrozunun en yaygın nedeni OHA'dir ve 35 yaşına gelmiş OHA olan hastaların %50'sinden fazlasında görülmüştür [83]. Humerus başı avasküler nekrozu ise daha nadirdir. Ayrıca kemiklerde meduller kavitede genişleme ve kortikal incelme görülür.
- 9) **Cilt:** OHA hastalarının yaklaşık %10-20'sinde bacak ülserleri görülür. Genellikle travmaya bağlı olarak, malleolusun iç veya dış tarafında, sıklıkla da iki taraflı oluşur. Bacak ülserleri iyileşmeye dirençlidir ve ayrıca dokuda iltihabın ilerlemesi sonucu osteomyelit veya tetanoz gibi sistemik enfeksiyonlara yol açabilir. Bacak ülserleri 10 yaşından önce nadiren oluşur. Tekrarlayan oraklaşma atakları ülserlerin gelişimi ve devamlılığına katkıda bulunurlar. İyileşmesi için haftalar gerekebilir [19,84].

### 2.2.5. Tanı

**İntrauterin dönem:** Orak hücre hastalığı için varolan tedavi yöntemlerinin yetersiz kalması nedeniyle doğum öncesi dönemde tanısının konulması önem kazanmıştır. Fetal dönemde birinci trimesterda yapılan koryon villus biyopsisi veya ikinci trimesterda yapılan amniyosentez ile elde edilen fetal DNA kullanılarak orak hücre mutasyonunun moleküler analizi ile prenatal tanı yapılabilir [19].

**Yenidoğan dönemi:** OHA'li yenidoğanlar genellikle anemik değildirler ve semptom vermezler. Ancak yenidoğan döneminde hastalığın tanınması mortalite ve morbiditeyi azaltabileceğinden önemlidir ve bu nedenle yenidoğanların taranması önerilir. Tanı yöntemleri olarak asit ve alkali elektroforez, HPLC (High-performance liquid chromatography) ve izoelektrik fokuslama (IEF) kullanılan yöntemlerdir. Bu sayede hastalığın tipini belirlemek ve taşıyıcıları saptamak mümkün olmaktadır. Günümüzde varyant hemoglobin tayininde HPLC ilk basamak olarak yerini almıştır. HPLC ile varyant hemoglobin saptanması durumunda IEF doğrulayıcı tetkik olarak uygulanmaktadır. Filtre kağıdından elde edilen DNA'nın PCR amplifikasyonu ile de orak hücre hastalığı belirlenebilir [19, 85, 86].

**Daha büyük yaş gruplarında:** Hastanın öyküsünde ırk, geldiği yöre, aile öyküsü, yakınmalarının başlangıç zamanı ve tetikleyen etkenler değerlendirilmelidir. Fizik muayenede solukluk, sarılık, splenomegali, infeksiyon bulguları, organ ve iskelet sistemindeki şekil bozuklukları değerlendirilmelidir [19].

Bebeklik döneminde Hb S oranı artıp Hb F düştükçe orak hücre hastalığının bulguları ortaya çıkmaya başlar. Yaklaşık 4. ayda hemolitik anemi bulguları ortaya çıkar. Periferik yayma bulguları çeşitlidir. Tipik orak hücrelerinin yanında hedef hücreler, sferositler, bikonkav diskler, dalak fonksiyon bozukluğunu gösteren Howel-Jolly cisimcikleri, normoblastlar, eritrositlerde bazofilik noktalanma, mikrositoz ve poikilositoz görülebilir [87, 88].

Artmış eritropoeze bağlı olarak retikülositoz, ortalama eritrosit hacmi (MCV) ve eritrosit dağılım genişliğinde (RDW) artış görülür. Retikülositler kemik iliğinden kısa bir süre önce kana salınan kırmızı kan hücreleridir. Ribozomal RNA'yı çökerten özel bir boya varlığında tanınırlar. Oluşan presipitatlar mavi veya siyah noktalanmalar olarak görünürler. Retikülositler içindeki kalıntı RNA'lar dolaşımdaki ilk 24-36 saat içinde

metabolize olurlar. Retikülosit sayısı kırmızı kan hücre yapımı ile ilgili olarak doğru bir ölçüm verir [87].

Laboratuar tetkiklerinde serum indirekt bilüribin ve laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyleri artmış, haptoglobin düzeyleri azalmıştır. Haptoglobin plazmada yüksek miktarda bulunur (~1g/L) ve hemolizle açığa çıkan hemoglobine bağlanır. Hemoglobin-haptoglobin kompleksi hızla mononükleer fagositler tarafından temizlenir. Bu nedenle hemoliz durumunda haptoglobin düzeyi azalır [87,89,90].

LDH'nın farklı dokular içerisindeki konsantrasyonu serumda bulunan enzim miktarının yaklaşık 500 katı kadardır. Bu sebeple hasarlı dokudan az miktarda enzim sızıntısı serumdaki LDH aktivitesini belirgin ölçüde artırır. LDH enzim aktivitesinin en yüksek olduğu organlar ve hücreler: iskelet kası, karaciğer, kalp, böbrek ve eritrositlerdir. LDH enzimleri M (kas) ve H (kalp) tipi peptidlerin oluşturduğu 4 tane subüniteden meydana gelir. LDH'nın 5 farklı izoenzimi vardır: LDH-1 (H4), LDH-2 (H3M), LDH-3 (H2M2), LDH-4 (HM3), ve LDH-5 (M4) [91].

- LDH-1
  - LDH-2
  - LDH-3
  - LDH-4
  - LDH-5
- } Kalp kası, böbrek, ve eritrositler (Artışı: Myokardial infarktüs, hemoliz, renal infarktüs)
- } Dalak, akciğer, lenf nodu, lökosit (Artışı: lenfoid doku enfeksiyonu, splenik nekroz, malignensi, pulmoner emboli)
- } İskelet kası, karaciğer (Artışı: KC hastalığı)

Özellikle intravasküler hemolizde hemoglobinüri ve hemosiderinüri görülür. Plazma serbest hemoglobin, methemalbümin, methemoglobin düzeyleri ve hemopeksin-hem kompleksi yükselmiştir [87, 88].

Orak hücre hastalıklarının ayırıcı tanısı Tablo 2.1'de özetlenen şekilde yapılabilir [74].

**Tablo 2.1.** Orak hücre sendromlarının ayırıcı tanısı [74].

| Sendrom <sup>a</sup>      | Klinik Şiddeti | Splenomegali         | Ortalama Hemoglobin (g/dl) | Ortalama Hematokrit (%) | MCV (fl) | Retikülosit (%) | Eritrosit Morfolojisi                                                         | Elektroforez                                                 |
|---------------------------|----------------|----------------------|----------------------------|-------------------------|----------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| AS                        | Asemptomatik   | (-)                  | Normal                     | Normal                  | Normal   | Normal          | Nadir hedef hücre                                                             | 35-45% S;<br>55-60% A; F <sup>b</sup>                        |
| SS                        | Şiddetli       | Erken çocuklukta (+) | 7.5                        | 22                      | 85       | 5-30            | Bol hedef hücre<br>ISCs (4+) ve NRBCs                                         | 80-96% S;<br>2-20% F <sup>b</sup>                            |
| SC                        | Hafif/Orta     | (+)                  | 11                         | 33                      | 80       | 2-6             | Bol hedef hücre<br>nadir ISCs (1+)                                            | 50-55% S;<br>45-50% C; F <sup>b</sup>                        |
| S/β <sup>0</sup> talasemi | Orta/Şiddetli  | (+)                  | 8.5                        | 28                      | 65       | 3-20            | Belirgin hipokromi<br>ve mikrositoz,<br>Bol hedef hücre<br>ISCs (3+) ve NRBCs | 50-85% S;<br>2-30% F <sup>b</sup> ;<br>>3.5% A2              |
| S/β <sup>+</sup> talasemi | Hafif/Orta     | (+)                  | 10                         | 32                      | 72       | 2-6             | Hafif mikrositoz<br>ve hipokromi,<br>Bol hedef hücre<br>Nadir ISCs            | 50-80% S;<br>10-30% A;<br>0-20% F <sup>b</sup> ;<br><3.5% A2 |
| SS/α talasemi             | Hafif/Orta     | (+)                  | 10                         | 27                      | 70       | 5-10            | Hafif hipokromi<br>ve mikrositoz<br>nadir ISCs (+2)                           | 80-100% S;<br>0-20% F <sup>b</sup>                           |
| S/YPHF                    | Asemptomatik   | (-)                  | 14                         | 40                      | 85       | 1-3             | Nadir hedef hücre<br>ISCs yoktur                                              | 60-80% S;<br>15-35% F <sup>c</sup>                           |

<sup>a</sup>bütün sendromlarda periferik yaymada orak hücre görülür, <sup>b</sup>Hb F dağılımı homojen, <sup>c</sup>Hb F dağılımı heterojen  
Kısaltmalar: YPHF: yüksek persistan fetal hemoglobin, ISC: irreversibl sickle cell, NRBC: nükleated red blood cell

## 2.2.6. Tedavi

OHA'li hastalar düzenli olarak takip edilmelidir. Hastaların stabil olduğu dönemdeki hemoglobin, retikülosit, beyaz küre sayısı, trombosit sayısı gibi temel laboratuvar bulguları ile fizik muayene bulgularının bilinmesi hastalık dönemlerinde tanının hızla konulup tedaviye erken dönemde başlanmasını sağlamaktadır. Hastaların ve ailelerinin özellikle ağırlı ataklar ve önlenmesi konusunda bilgilendirilmesi morbiditeyi ve hastaneye yatma oranlarını azaltacaktır. Tekrar çocuk sahibi olmayı planlayan ailelere genetik danışmanlık hizmetinin verilmesi hastalığın önlenmesi açısından önemlidir. Bütün hastalara *pnömokok*, *Haemophilus influenza*, *Hepatit B*, *meningokok* ve yıllık *influenza* aşılı yapılmalıdır. Beş yaşın altındaki çocuklara penisilin profilaksisi verilmelidir. Retinopati yönünden düzenli göz muayenesi, dalağı olmayan hastalarda diş veya diğer invaziv girişim yapılacaksa uygun profilaktik antibiyotik tedavisi başlanması, düzenli aralıklarla akciğer ve kardiyak fonksiyonların değerlendirilmesi, batin ve transkranyal ultrason taramaları, enfeksiyonların erken tanı ve tedavisi takipte önemlidir [73]. Folik asit yetmezliğinin önlenmesi için günlük 1 mg

folik asit verilmesi önerilmektedir. Çinko eksikliğinin oraklaşmayı arttırdığı tesbit edildiğinden hastalara düzenli çinko desteği sağlanmalıdır [92].

**Hidroksiüre tedavisi:** OHA hastalığının tedavisi oraklaşmanın önlenmesi prensibine dayanmaktadır. Hb F seviyesinin yüksek olması (>%20) OHA'de koruyucu etkiye sahiptir. Hb F, Hb S'in polimerizasyonunu inhibe etmektedir. Hb F'i artıran ajanlar arasında en yaygın olarak kullanılanı hidroksiüredir. Hidroksiüre eritroid kök hücrelerin terminal farklılaşmasını azaltarak Hb F sentezinin artmasına neden olur ve oraklaşmayı azaltarak eritrositlerin yaşam sürelerini uzatır. Hidroksiüre eritrositlerin hidrasyonunu ve NO üretimini arttırırken, eritrosit adezyon moleküllerinin sentezini azaltır. Hidroksiüre kullanılan hastalarda kullanmayan hastalara göre vazo-oklüzif ağrı, akut göğüs sendromu ve kan transfüzyonu insidansında anlamlı ölçüde azalma gözlenmiştir [93]. Fakat hastaların %40'ında ilacın kullanımına yanıt alınmayabilir. Yan etki olarak kemik iliğini baskılayarak lökosit, trombosit ve retikülosit sayılarını azaltır. Bu yüzden hastalar aylık hemogram takibi ile monitörize edilmelidir. Ayrıca saç dökülmesi, ciltte pigment değişikliği, gastrointestinal semptomlar, sperm sayı ve motilitesinde azalmaya neden olabilir [94]. Hidroksiürenin uzun dönemde oluşturduğu büyüme-gelişme üzerine etkileri, teratojenik ve karsinojenetik etkileriyle ilgili henüz yeterli bilgi yoktur. Toksikite bulguları; nötrofil sayısının  $< 1,000/\text{mm}^3$ , trombosit sayısının  $< 80,000/\text{mm}^3$ , absölü retikülosit sayısının  $< 80,000/\text{mm}^3$  olması ve Hb seviyesinde 2 g/dl'den fazla düşüş olmasıdır. Hidroksiüre tedavisi 15-20 mg/kg/gün dozunda başlanıp her 8 haftada bir 5 mg/kg/gün arttırılarak 35 mg/kg/gün dozuna kadar çıkılabilir [95].

Hb F yapımını arttıran bir diğer ajan 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine)'dir. Demetilasyon yapan bir antineoplastik ajan olan decitabine ile yapılan sınırlı sayıdaki klinik çalışmalarda hidroksiüreye cevapsız olan hastalarda Hb F düzeyini yaklaşık %14 oranında arttırdığı gösterilmiştir [96]. Kısa zincirli yağ asitleri (valproik asit gibi) ve eritropoetin Hb F yapımını uyaran diğer ajanlardır [97].

**Transfüzyon tedavisi:** Kronik kan transfüzyon tedavisinin amacı eritropoezi etkili şekilde baskılamak ve transfüzyonlarla Hb S seviyesinin %30'un altında kalmasını sağlamaktır. Bu tedavi yaklaşımı OHA'ye bağlı inme, vazo-oklüzif kriz gibi komplikasyonların insidansında azalmaya neden olmaktadır. Ayrıca akut gelişen komplikasyonlarda (hemolitik kriz, aplastik kriz, iskemik atak, tedaviye yanıtsız priapizm gibi), yüksek riskli girişimlerden önce ve seçilmiş gebeliklerde de transfüzyon

ihtiyacı artmaktadır [73]. Genellikle hemoglobin düzeyi 7 gr/dl altına düşmedikçe transfüzyon yapılmaması ve hiperviskoziteye neden olmamak için de hemoglobin düzeyinin 10 gr/dl üzerine çıkarılmaması önerilmektedir. Hiperviskoziteye bağlı vazooklüzyon ve doku hasarı artmaktadır. Basit transfüzyon yapılmasının yararı olmadığı durumlarda Hb S oranının %30'un altına düşürülmesinin amaçlandığı parsiyel kan değişimi yapılmalıdır [98]. Ayrıca kan transfüzyonlarına bağlı viral enfeksiyonlar, transfüzyonel hemosiderozis ve minör eritrosit antijenlerine karşı alloimmünizasyon görülebileceği unutulmamalı ve gerekli önlemler alınmalıdır [99].

**Kök hücre nakli:** Günümüzde allojenik hematopoetik kök hücre nakli OHA için tam iyileşme sağlayan tek tedavidir. Genellikle ağır komplikasyonları olan Hb SS veya Hb S $\beta^0$  hastalarına uygulanır. Tam HLA uyumlu kardeş donörden yapılan kök hücre nakillerinde hayatta kalma oranı %90'ın üzerinde olup hastalıksız yaşam oranı yaklaşık %85'tir [100]. Belirgin kronik organ hasarı olmayan hastalara da HLA uygun kardeşlerden yapılan allojenik kök hücre nakli uygulamaları artmaktadır ve oldukça yüksek oranda başarı sağlamaktadır [101].

**Komplikasyonların tedavisi:** OHA'de komplikasyonların erken tanı ve tedavisi önemlidir. Vasooklüziv krizlerin tedavisinde temel prensipler oksijen desteğinin ve hidrasyonun sağlanması, ağrı kesicilerin uygun şekilde kullanılması (asetaminofen, non-steroidal antiinflatuarlar, oral veya iv opioidler gibi) ve tetikleyici nedenin tedavisidir. Ağrı ataklarında yardımcı tedaviler; trankilizanlar, laksatifler, antihistaminikler, antiemetikler ve psikoterapiden oluşmaktadır.

Akut göğüs sendromu mortal seyredebileceği için yakın takip edilmelidir. Oksijen saturasyonu takibi, hemoglobin düzeyinin monitorizasyonu, sıvı ve oksijen desteği ve ağrı yönetimi önemlidir (sedatif etkili analjeziklerden kaçınılmalıdır). Pnömoni ile ayırıcı tanı yapılınca kadar *Streptococcus pneumoniae* ve *Mycoplasma pneumoniae*'yi kapsayan geniş spektrumlu ampirik antibiyotikler başlanmalıdır. Şiddetli olgularda kan transfüzyonu ile hematokrit düzeyi %30'un üzerinde olacak şekilde kan verilmeli, transfüzyon sonrası hemoglobin düzeyi 10 g/dl'nin üzerine çıkmamalıdır. Transfüzyona yanıtız veya ciddi hipoksemik hastalarda kan değişimi yapılmalı, mekanik ventilasyon desteği açısından yakın takip edilmelidir. Akut göğüs sendromunda steroid kullanımı tartışmalıdır [102].

Santral sinir sistemi bulguları saptandığında vital bulguları düzeltildikten sonra nedeni araştırmaya yönelik ileri tetkik yapılmalı ve en kısa zamanda parsiyel kan

değişimi yapılmalıdır. Amaç HbS seviyesini %30'un altına çekmek ve hemoglobin seviyesini yaklaşık 10 g/dl'ye arttırmaktır [62,65].

Priapizmin tedavisi corpus cavernosumda biriken kanın cerrahi olarak boşaltılmasıdır. Bununla beraber ağrı kesiciler, ılık pansuman ve sıvı tedavisi uygulanıp kan verilebilir. Tedaviye dirençli olgularda kan değişimi yapılmalıdır [70,72].

Aplastik krizler genellikle kendini sınırlar ve kemik iliği bir hafta içinde tekrar eritrosit üretimine başlar. Aneminin aşırı arttığı bu dönemde temel tedavi eritrosit verilmesidir ve genellikle tek bir transfüzyon yeterli olur. Dalağın sekestrasyon krizinde damar yolu ile bol sıvı verilmelidir. Kan verilmesi veya değişim transfüzyonu gerekebilir. Kapsüllü bakteri infeksiyonlarına artan yatkınlık ve tekrarlayan sekestrasyonlar nedeniyle genelde ilk ataktan sonra dalağın alınması önerilir [69].

**Yeni tedavi yaklaşımları:** Yeni tedavi yaklaşımlarının en önemli basamağını NO biyoyararlanımını arttırmaya yönelik olan inhale NO tedavisi, L-arginin desteği ve sildenafil tedavisi oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar inhale NO tedavisinin akut göğüs sendromu gelişen OHA'li hastalarda pulmoner hipertansiyonu azalttığını ve ventilasyon-perfüzyon uyumsuzluğunu önlediğini göstermiştir [103,104]. Ayrıca VOK olan hastalarda inhale NO ile ağrı skorunun düştüğü ve opioid ihtiyacının azaldığı gösterilmiştir [105]. Bir çalışmada sekonder pulmoner hipertansiyon gelişmiş OHA'li hastalarda oral L-arginin tedavisi ile pulmoner arter sistolik basıncında %15.2 oranında düşüş, oksijen saturasyonunda %20 oranında düzelme olduğu gösterilmiştir [106]. Fosfodiesteraz-5 inhibitörü olan sildenafilin cGMP indirgenmesini inhibe ederek NO etkisini arttırdığı ve pulmoner hipertansiyonda fayda sağladığı gösterilmiştir [107].

Gardos kanal blokörü olan clotrimazol ve K:Cl kotransport inhibitörü olan magnezyum pidolat eritrositlerin dehidratasyonunu önleyerek oraklaşmayı azaltır. Bu ajanların tedavide etkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır [39,108].

Sulfosalazin, polinitroksil albumin, deksametazon, integrin ve p-selektin karşıtı moleküllerin antiinflamatuvar ve antiadeziv etkileri, düşük doz warfarin, düşük doz heparin ve aspirinin antikoagülan ve antiagregan etkileri, E vitamininin antioksidan etkilerinin OHA tedavisindeki etkinlikleri araştırılmaktadır [109].

İntravasküler hemoliz sonucu açığa çıkan ve oksidatif hasarı arttıran serbest demiri uzaklaştırmak için şelasyon tedavisi verilebilmektedir [110].

Ayrıca plazmadan serbest hem ve hemoglobinin klirensini sağlayan haptoglobin ve hemopeksin yapımını uyaran yaklaşımlar üzerinde durulmaktadır. Japonya'da

1985'ten itibaren insan plazması kaynaklı haptoglobin ekstrakorporeal dolaşıma bağı hemoliz gelişen hastalarda, travma sonrası masif transfüzyon alanlarda ve yanık tedavisinde kullanılmaktadır. Bu tedavinin esas terapötik etkisi serbest hemoglobin kaynaklı böbrek hasarını engellemektir [111,112]. Hemolitik anemilerde haptoglobin kullanımının hemoglobinüri ve böbrek hasarını azalttığını gösteren vaka bildirimleri de bulunmaktadır [113].

### **2.2.7. Prognoz**

OHA'de beklenen ortalama yaşam süresi erkekler için 42 yaş, bayanlar için 48 yaştır. Erişkinlerin %33'ü organ yetmezliği gelişmeden akut komplikasyonlar nedeniyle ölmektedir (%78'i AGS ve/veya VOK, %22'si inme nedeniyle). İkinci sıklıktaki ölüm nedeni ise kronik organ hasarına bağı olmaktadır (en sık böbrek yetmezliği nedeniyle). Tekrarlayan AGS geçirmek, böbrek yetmezliği gelişmesi, inme öyküsü, bazal beyaz küre sayısının > 15000/mm<sup>3</sup> olması ve düşük Hb F düzeyleri erken yaştaki mortalite riskini arttırmaktadır [58]. Çocuklarda ise dünya genelinde hala en sık ölüm nedeni enfeksiyonlardır [114].

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya, Akdeniz Üniversitesi ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji Bilim Dalında tanı almış 25 orak hücre anemili hasta ve kontrol grubu olarak 15 sağlıklı birey dahil edildi. Çalışmaya alınan hastaların:

- ✓ Homozigot Hb SS olmaları,
- ✓ Klinik durumlarının stabil olması ve
- ✓ Son 3 ay içinde transfüzyon almamış olmaları gerekli görüldü.

Orak hücre anemisi tanısı klinik, ailesel ve laboratuvar bulguları değerlendirilerek konuldu. Laboratuvar bulgularından özellikle Hb türlerinin belirlenmesi ve Hb F seviyeleri Hb SS tanısında değerlidir ve Akdeniz Üniversitesi Merkez Laboratuvarında bulunan Bio-Rad VARIANT fully automated high performance liquid Q5 chromatography sisteminde (HPLC) (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany) ölçülmüştür.

Çalışmaya katılan tüm hasta ve kontrol grubundan yazılı onam belgesi alındı. Çalışma Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı.

#### 3.1. Hemoliz Varlığının Değerlendirilmesi

Plazmada hemoliz varlığını değerlendirmek için hasta ve kontrol gruplarından elde edilen kandan 7 parametreye bakılmıştır.

- 1- Hemogram
- 2- Retikülosit sayısı
- 3- Plazma haptoglobin düzeyi
- 4- Plazma indirekt bilirubin düzeyi
- 5- Plazma laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitesi
- 6- LDH izoenzim tayini
- 7- Plazma serbest hemoglobin düzeyi

Yukarıdaki parametrelerden ilk altısını değerlendirmek için Akdeniz Üniversitesi Merkez Laboratuvarından hizmet alımı yapılmıştır.

**Hemogram ve retikülosit sayısı:** Siemens Advia 2120 cihazında yapılmıştır.

**Plazma haptoglobin düzeyi:** Haptoglobin nefelometrik olarak Akdeniz Üniversitesi Merkez Laboratuvarında bulunan Dade Behring cihazında çalışılmıştır.

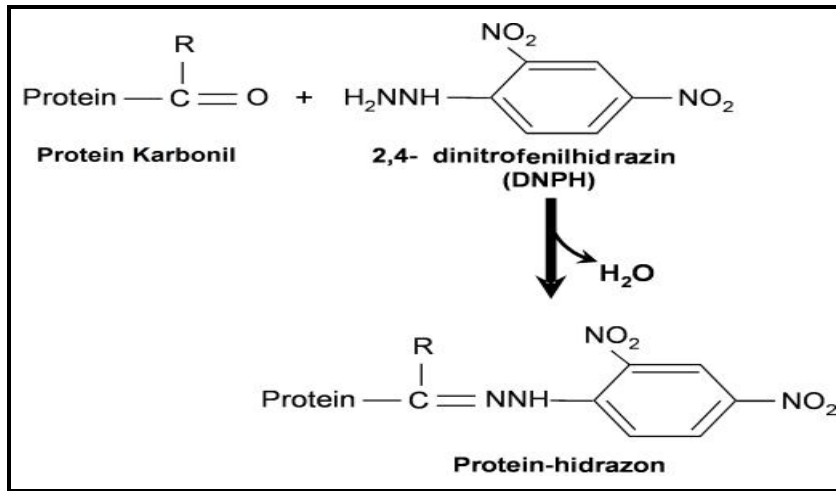
**Plazma Laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitesi ve bilirubin düzeyleri:** Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında bulunan otoanalizörde çalışılmıştır.

**LDH izoenzim tayini:** LDH izoenzim elektroforezi yöntemiyle yapılmıştır. Bunun için Merkez Laboratuvarında bulunan İnterlab Mikrogel otomatize elektroforez cihazı ve LDH izoenzim elektroforez kiti kullanılmıştır.

**Plazma serbest hemoglobin düzeyi:** Enzyme-linked immünoassay yöntemine dayanan ölçüm kitiyle belirlenmiştir.

### 3.2. Plazma Protein Karbonil Seviyelerinin Ölçümü

Protein örneklerinde karbonil miktarını belirleyip ölçmek için en uygun yöntem, protein karbonilleri ile 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) arasında reaksiyon oluşturmaktır (Şekil 3.1.) [48]. Son ürün olarak gösterilen protein hidrazon 360-385 nm’de absorbans vererek spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.



Şekil 3.1. Protein hidrazon oluşumu [48].

### 3.3. Plazma Lipid Oksidasyonunun Ölçümü

8-izoprostan tayininden önce elde edilen plazmalar afinite kolon purifikasyonuna tabi tutulmuşlardır. Bu sayede enzim immünoassay öncesi örnekler 8-izoprostandan zengin hale getirilmiştir. 8-izoprostan miktarının tayini kompetatif enzim immünoassay ile yapılmıştır. Reaksiyon ortamına izoprostan antikoru ile beraber alkalen fosfataza (ALP) bağımlı 8-izoprostan ve örnek ilave edilmiştir. Örnekte mevcut olan 8-izoprostan, antikoru bağlanmak için ALP-bağımlı 8-izoprostan ile yarışır. Daha sonra

alkalen fosfatazın substratını içeren reaktif ilave edilmiştir. Reaktif ALP ile reaksiyona girdikten sonra 412 nm’de ölçülen sarı renk oluşumuna neden olur. 412 nm’de ölçülen absorbans, örnekteki izoprostan miktarı ile ters orantılıdır.

### **3.4. Plazma Nitrit ve Nitrat Ölçümü**

Nitrik oksit metabolitlerinin ölçülmesinde sistemde var olan tüm nitrat, nitrat redüktaz enzimi ile nitrite dönüştürülür. Oluşan nitrit 2,3,-diaminoaphthalene (DAN) ile reaksiyona girerek 1-naphthotriazole oluşturur. Oluşan ürün florometrik olarak ölçülür.

### **3.5. Plazma Protein Nitrasyonunun Ölçümü**

Plazmada protein nitrotirozin miktarı enzyme-linked immünoassay yöntemine dayanan ölçüm kitiyle belirlenmiştir.

### **3.6. İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel analiz için Sigma Stat 2.03 istatistik programı kullanıldı. Hemoglobin, direkt bilirübin, lökosit, trombosit, MCV, MCH, LDH izoenzimi, protein karbonil, nitrotirozin ve nitrit/nitrat seviyelerinin p değerleri hesaplamak için student t-testi kullanılırken, retikülosit sayısı, total bilirübin, LDH, haptoglobin, hemoglobin varyant analizi, plazma serbest hemoglobini ve 8-izoprostan düzeylerinin p değerlerini hesaplamak için Mann-Whitney Rank Sum testi kullanıldı. Serbest plazma hemoglobininin plazma karbonil ve nitrotirozin seviyeleri ile korelasyonunu değerlendirmek için lineer regresyon analizi kullanıldı. P değerinin <0.05 olması tüm veriler için istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Çalışmamıza 25 OHA hastası ile benzer yaş ve cinsiyette 15 sağlıklı kontrol alındı. 25 hastanın 10'u kız (%40), 15'i erkek (%60) idi. Yaş dağılımı ortalaması 21,48 yıl idi. Kontrol grubunun 8'i kız (%53,3), 7'si erkek (%46,7) idi. Yaş dağılımı ortalaması 20,53 yıl idi (Tablo 4.1.).

**Tablo 4.1.** Yaş ve cinsiyet dağılımı.

|         | CİNSİYET    |              | YAŞ*         | TOPLAM |
|---------|-------------|--------------|--------------|--------|
|         | Kız         | Erkek        | (yıl)        |        |
| OHA     | 10'u (%40)  | 15'i (%60)   | 21.48 ± 9.01 | 25     |
| KONTROL | 8'i (%53,3) | 7'si (%46,7) | 20.53 ± 7.89 | 15     |

\*ortalama ± SDS

Kontrol ve çalışma grubu arasında cinsiyet ve yaş dağılımı açısından fark saptanmadı.

OHA hastalarında tanıyı desteklemek, kontrol grubunda normal değerleri saptayabilmek için Hemoglobin türleri elektroforez yöntemi ile değerlendirildi (Tablo 4.2.).

**Tablo 4.2.** Hasta ve kontrol grubunda variant hemoglobin değerleri.

|                       | KONTROL*    | OHA*         | P      |
|-----------------------|-------------|--------------|--------|
| Hb F (%)              | 1.03 ± 0.51 | 10.37 ± 6.79 | <0.001 |
| Hb A <sub>2</sub> (%) | 2.87 ± 0.17 | 4.11 ± 0.66  | <0.001 |
| Hb A (%)              | 96.1 ± 0.5  | Yok          |        |
| Hb S (%)              | Yok         | 85.52 ± 6.63 |        |

\*ortalama ± SDS

OHA grubunda Hb A, kontrol grubunda Hb S saptanmazken OHA grubunda Hb F ve Hb A<sub>2</sub> seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (p<0.001).

OHA ve kontrol grubunda hemoliz varlığını gösterebilmek için tam kan sayımı ve biyokimyasal veriler değerlendirildi (Tablo 4.3.).

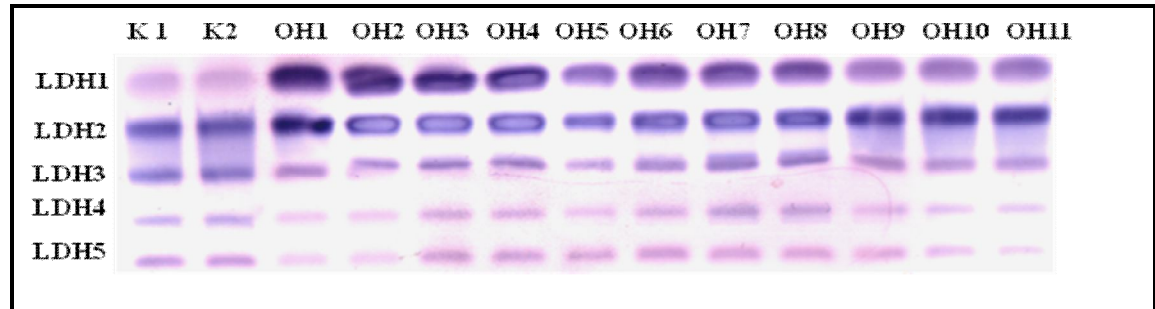
**Tablo 4.3.** Hasta ve kontrol grubunda tam kan sayımı ve biyokimyasal veriler.

|                                 | KONTROL*       | ORAK HÜCRE ANEMİSİ* | P       |
|---------------------------------|----------------|---------------------|---------|
| Hemoglobin (g/dl)               | 14.03 ± 1.08   | 9.15 ± 1.31         | < 0.001 |
| Retikülosit Sayımı (%)          | 0.87 ± 0.26    | 11.34 ± 4.46        | < 0.001 |
| MCV(fL)                         | 86.33 ± 5.16   | 101.76 ± 15.47      | < 0.001 |
| MCH (pg/hücre)                  | 29.43 ± 1.60   | 34.31 ± 5.87        | 0,003   |
| Total Bilirubin (mg/dl)         | 0.56 ± 0.36    | 3.40 ± 2.00         | < 0.001 |
| Direkt Bilirubin (mg/dl)        | 0.16 ± 0.07    | 0.63 ± 0.26         | < 0.001 |
| LDH (U/L)                       | 205.40 ± 50.13 | 491.80 ± 190.83     | < 0.001 |
| Haptoglobin (mg/dl)             | 128.35 ± 71.37 | 26.49 ± 0.13        | < 0.001 |
| Lökosit (bin/mm <sup>3</sup> )  | 7.08 ± 2.23    | 10.52 ± 3.56        | 0,002   |
| Platelet (bin/mm <sup>3</sup> ) | 277.07 ± 77.06 | 567.12 ± 192.51     | < 0.001 |

\*ortalama ± SDS

OHA grubunda hemolize bağlı olarak tam kanda hemoglobin ve plazmada haptoglobin düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmışken, MCV, MCH, retikülosit, plazma LDH, total ve direkt bilirubin düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak artış göstermiştir.

Şekil 4.1.'de kontrol (K) ve hasta grubunun (OH) örnek bir LDH izoenzim elektroforez sonucu verilmiştir. Tablo 4.4'de kontrol grubunda ve orak hücre anemisi hastalarında ölçülen LDH-1 ve LDH-2 enzim yüzdeleri verilmiştir.



**Şekil 4.1.** LDH izoenzim tayini.

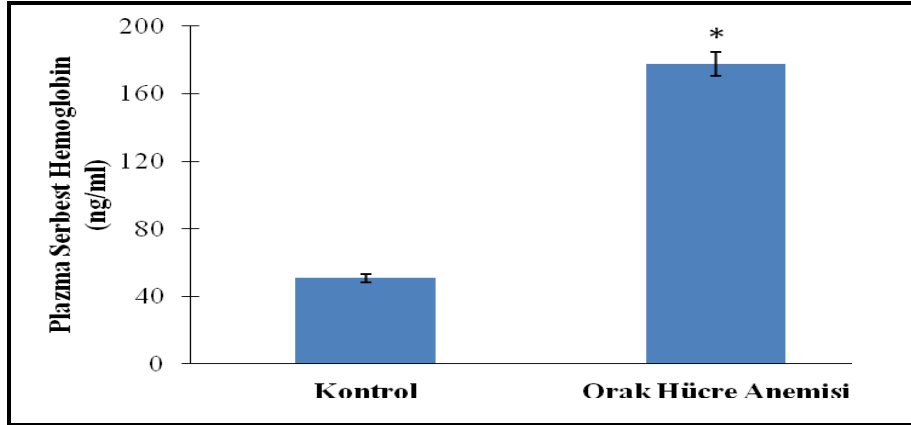
**Tablo 4.4.** LDH izoenzim değerleri.

|           | KONTROL*     | ORAK HÜCRE ANEMİSİ* | P       |
|-----------|--------------|---------------------|---------|
| LDH-1 (%) | 22,2 ± 4.50  | 35.70 ± 7.33        | < 0.001 |
| LDH-2 (%) | 33.20 ± 3.20 | 33.40 ± 4.28        | > 0.05  |

\*ortalama ± SDS

OHA grubunda LDH-1 izoenzim yüzdesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek saptandı (p < 0.001).

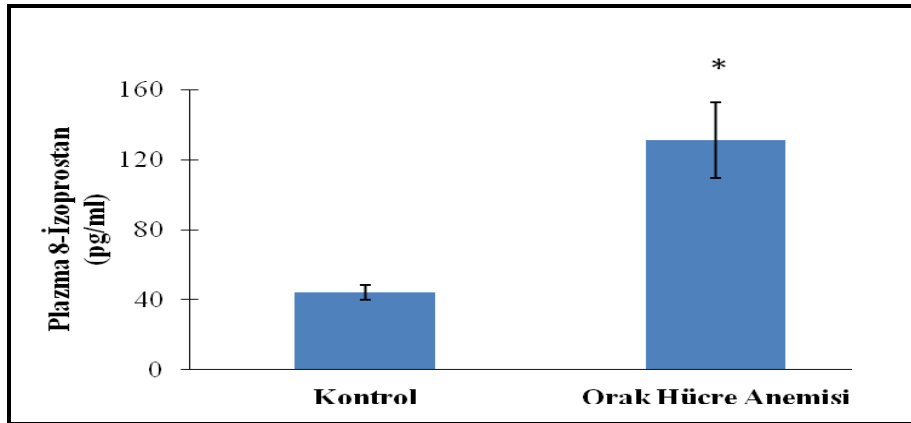
Hasta ve kontrol grubunda serbest plazma hemoglobin düzeyleri Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Serbest plazma hemoglobin düzeyleri.

OHA grubunda serbest plazma hemoglobin düzeyleri  $177,36 \pm 7,05$  ng/ml, kontrol grubunda ise  $50,78 \pm 2,40$  ng/ml saptandı. OHA hastalarında bu değer anlamlı olarak daha yüksek saptandı (\* $p < 0.001$ ).

Plazmada fosfolipidlerin oksidasyon ürünü olan 8-izoprostan düzeyleri Şekil 4.3.'te gösterilmiştir.

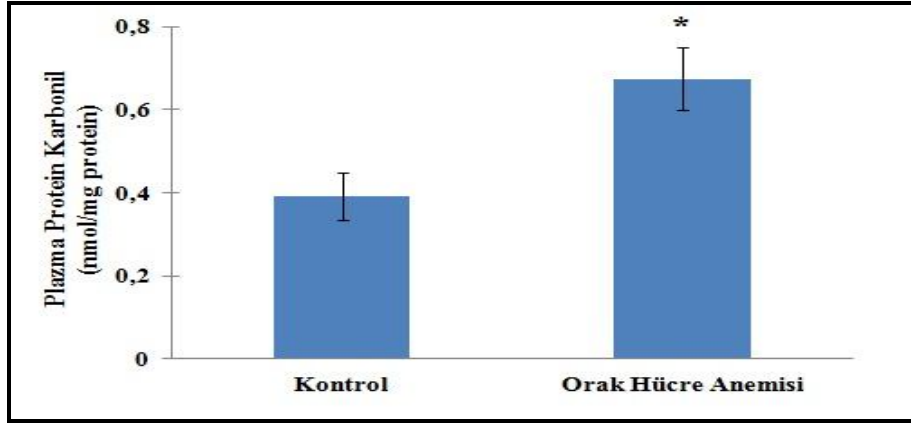


Şekil 4.3. Plazma 8-izoprostan düzeyleri.

OHA grubunda plazma 8-izoprostan düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek saptandı (kontrol:  $44,26 \pm 4,04$  pg/ml, OHA:  $131,39 \pm 21,6$  pg/ml.

\*  $p = 0.006$ ).

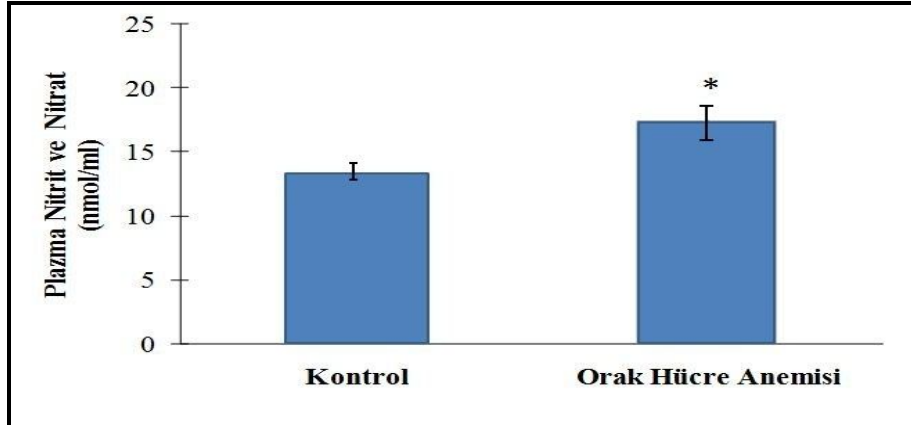
Protein oksidasyonunun göstergesi olan plazma protein karbonil miktarları Şekil 4.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Plazma protein karbonil düzeyleri.

OHA grubunda plazma protein karbonil düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek saptandı (kontrol:  $0,39 \pm 0,06$  nmol/mg protein, OHA:  $0,67 \pm 0,07$  nmol/mg protein \* $p = 0.011$ ).

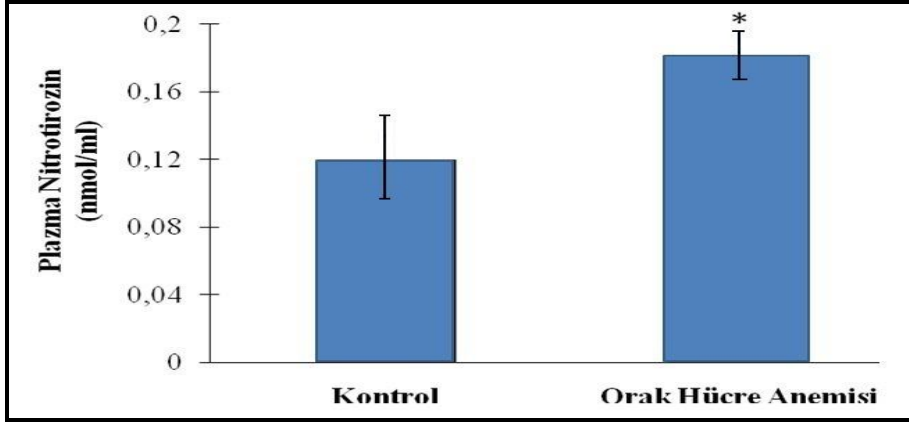
Nitrik oksitin son metabolik ürünleri olan nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) ve nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) düzeyleri Şekil 4.5.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Plazma nitrit ve nitrat seviyeleri.

OHA grubunda nitrit ve nitrat düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır (kontrol:  $13,10 \pm 0,70$  nmol/ml, OHA:  $17,5 \pm 1,30$  nmol/ml, \* $p = 0.03$ ).

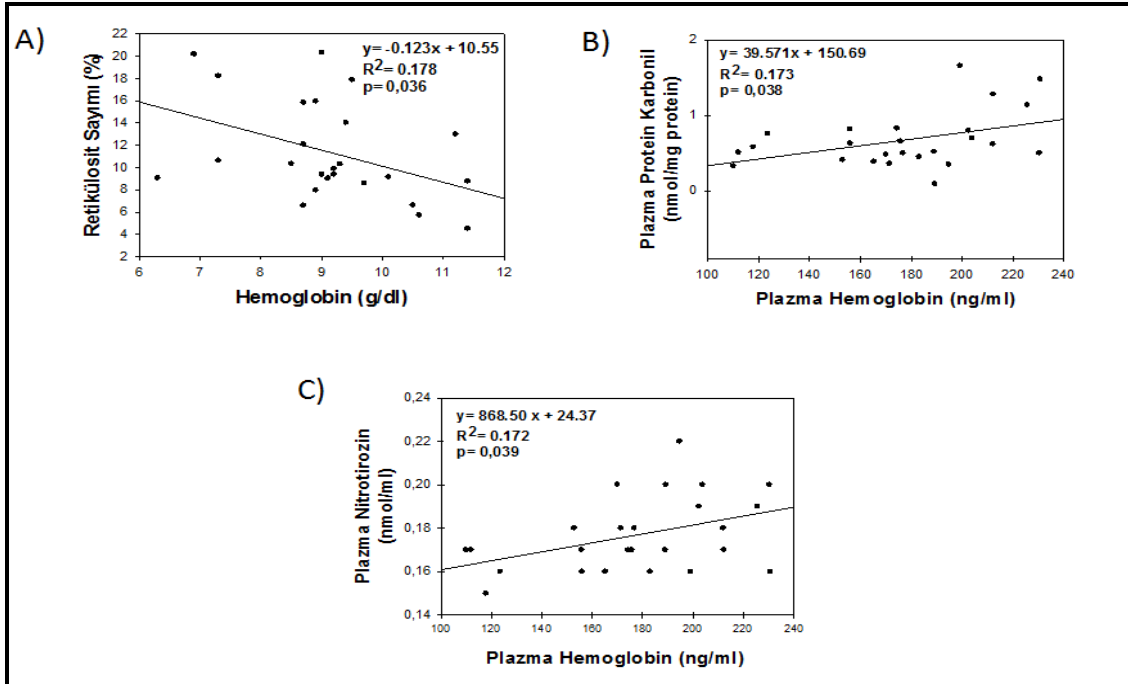
Hasta ve kontrol grubunda plazma protein nitrasyon (nitrotirozin) düzeyleri Şekil 4.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Plazma nitrotirozin düzeyleri.

Orak hücre anemisi grubunda plazma nitrotirozin düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek saptandı (kontrol: 0,12 ± 0,026 nmol/ml, OHA: 0,18 ± 0,016 nmol/ml, \*p < 0.001).

Hasta ve kontrol grubunda korelasyon gösteren biyokimyasal veriler Şekil 4.7.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Korelasyon gösteren biyokimyasal veriler.

İstatistiksel olarak anlamlı korelasyon A) Retikülosit sayımı ve hemoglobin düzeyleri, B) Plazma protein karbonil ile plazma serbest hemoglobin düzeyleri ve C) Plazma nitrotirozin ile plazma serbest hemoglobin düzeyleri arasında görülmüştür.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Orak hücre hastalığı en yaygın görülen kalıtsal hemoglobinopati olup dünya genelinde önemli bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır. Ülkemizde de özellikle Çukurova bölgesinde bazı yörelerde sıklık %3-44 arasında saptanmış olup yaklaşık 1200 OHA hastası olduğu bilinmektedir [32,33]. Hastalığın fatal seyredebilen birçok akut ve kronik komplikasyonu vardır ve hastaların yaşam kalitesini ve süresini azaltmaktadır. Ortalama beklenen yaşam süresi erkeklerde 42, bayanlarda 48 yıl olup tek küratif tedavisi kök hücre naklidir [58]. Bu yüzden hastalık hakkında toplumun (özellikle de taşıyıcıların) bilgilendirilmesi, prenatal tanının koyulabilmesi, hastalığın patogenezinin iyi anlaşılması ve bu sayede hastaların yaşam kalitesini ve süresini arttıran yeni tedavi yaklaşımları üzerinde çalışılması önemlidir.

Deoksi durumundaki Hb S hızlı bir şekilde polimerize olur. Oraklaşmış hücreler küçük kapillerleri geçmek için gerekli şekil değiştirme yeteneğini kaybederler ve mikrovasküler oklüzyonlara neden olurlar. Oraklaşmış hücrenin reoksijenasyonu ise kararsız bir form oluşturur, hücre otooksidasyona uğrayarak oraklaşmayı geri dönüşümsüz kılar ve orak hücreler kapillerlerden geçerken hemolize uğrar [3]. Orak hücre hastalığında hemoliz değişmez bir bulgudur. Eritrositlerin yaklaşık üçte biri intravasküler hemolize giderler. Yapılan çalışmalarda intravasküler hemolizin eritrositlerden simultan hemoglobin ve arginaz salınımına neden olarak NO'nin fizyolojik etkisini kaybetmesine neden olduğu gösterilmiştir [15,18]. Böylece vasküler inflamasyon süreci başlar.

Ayrıca OHA'lı hastalarda artmış ksantin dehidrogenaz (XO) ve vasküler NADPH oksidaz aktivitesi intravasküler  $O_2^-$  (süperoksit anyonu) salınımına neden olur. Artmış oksidatif stres altında NO antioksidan özelliğini kaybeder, süperoksit anyonu ile reaksiyona girerek peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) oluşturur. Peroksinitritin kendisi çok kuvvetli bir oksidan olup protein ve lipid oksidasyonuna sebep olur [6,54].

Çalışmaya alınan hasta ve kontrol grubunun hemoglobin varyantları Bio-Rad VARIANT fully automated high performance liquid Q5 chromatography sisteminde ölçülmüştür. HPLC sisteminin Hb S'i taramak için duyarlı, özgün ve güvenilir bir yöntem olduğu gösterilmiştir [115]. Hasta grubunda Hb S oranı  $85.52 \pm 6.63$  olup, Hb A saptanamamıştır. Bu durum OHA tanısını desteklemektedir. Ayrıca OHA grubunda Hb F ( $10.37 \pm 6.79$ ) ve Hb A<sub>2</sub> ( $4.11 \pm 0.66$ ) oranları hasta grubuna göre

belirgin yüksek saptanmıştır. OHA'de yüksek Hb F seviyesinin (>%20) hastalığın şiddetini ve komplikasyon gelişme riskini azalttığı bilinmektedir ve Hb F'i artıran ajanlar arasında en yaygın olarak kullanılanı hidroksiüredir [95,116]. Bizim de hastalarımızın tamamı hidroksiüre tedavisi almaktaydı ve son 3 ay içinde akut komplikasyon geçirmemişlerdi. Daha önceki çalışmalarda da Hb A<sub>2</sub> düzeyinin de OHA'de yüksek olduğu ve bu durumun Hb S'in polimerizasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [117,118].

Orak hücre hastalıklarında değişken şiddette hemoliz görülmektedir. Kliniğin ve hemoliz bulgularının en ağır olduğu grup homozigot Hb SS (OHA) olan gruptur. Hasta grubumuzda hemoliz göstergesi olarak hemoglobin ve haptoglobin düzeyleri belirgin olarak düşük iken, retikülosit, ortalama eritrosit hacmi (MCV), ortalama eritrosit hemoglobini, plazma serbest hemoglobini, total ve direkt bilirübin düzeyleri, total LDH ve LDH-1 izoenzim düzeyi belirgin yüksek saptanmıştır. LDH düzeyi intravasküler hemoliz için kullanışlı bir belirteçtir. Özellikle LDH-1 izoenzimi başta eritrositler olmak üzere kalp kası ve böbrek hücrelerinde bulunduğu için iyi bir hemoliz göstergesidir [91,119].

OHA'li hastalarda yapılan çalışmalarda LDH düzeyinin esas alındığı hemolitik hız ile NO tüketiminin ve NO metabolizmasındaki değişiklik sonucu pulmoner hipertansiyon prevelans ve şiddetinin korele seyrettiği gösterilmiş [15,120]. Aynı şekilde serebrovasküler olaylar, priapizm ve bacak ülserasyonu ile hemoliz ve vasküler disfonksiyon ilişkisini gösteren çalışmalar da mevcuttur [121,122]. Ayrıca yüksek hemoglobin ve beyaz küre değerlerinin ve düşük Hb F düzeyinin vaso-oklüziv kriz ve akut göğüs sendromu ile ilişkisi gösterilmiştir.

OHA grubunda beyaz küre sayısı ( $10.52 \pm 3.56$  bin/mm<sup>3</sup>) ve trombosit sayısı ( $567.12 \pm 192.51$  bin/mm<sup>3</sup>) belirgin yüksek saptanmıştır. Daha önceki çalışmalarda da OHA'li hastalarda bazal beyaz küre ve trombosit değerlerinin yüksek olduğu, koagülasyon aktivitesinin arttığı, lökositozun akut göğüs sendromu ve sessiz serebral enfarkt riskini arttırdığı gösterilmiştir [58,61,123]. Literatürde granülosit koloni stimule edici faktör (G-CSF) uygulaması sonrası fatal seyreden ve multiorgan yetmezliği gelişen olgular bildirilmiştir [124,125].

Plazma lipid oksidasyonunun dolayısı ile oksidatif stresin bir göstergesi olan plazma serbest 8-iso prostoglandin F<sub>2α</sub> (8-isoprostan) düzeyleri ( $131,39 \pm 21,6$  pg/ml) OHA grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. Klings ve

arkadaşları yaptıkları bir çalışmada 90 orak hücre hastasından (Hb SS veya SC) akut göğüs sendromu sırasında, akciğer dışı vazo-okluziv kriz sırasında ve semptomsuz dönemde 8-izoprostan düzeyi bakmışlar ve kontrol grubu ile karşılaştırmışlar. AGS sırasında 8-izoprostan düzeyi kontrol grubundan yaklaşık 8 kat daha yüksek saptanmış. Vazo-okluziv kriz sırasında ise bazal değerlere göre 8-izoprostan düzeyleri anlamlı farklılık göstermemiş. Bizim çalışmamız ile uyumlu olacak şekilde bazı hastalarda ise asemptomatik dönemdeki 8-izoprostan düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmış [49]. Çalışmamızda serbest hemoglobin değerleri ile 8-izoprostan arasında anlamlı istatistiksel korelasyon saptanmadı. Bunun nedeni 8-izoprostan düzeyinin sadece lipid peroksidasyonunun göstergesi değil, aynı zamanda OHA'de artmış olan siklooksijenaz (COX) enzim aktivitesinin de bir göstergesi olması olabilir [126].

Protein karbonil miktarının ölçümü protein oksidasyonunu göstermek ve protein hasarının derecesini ölçmek için en yaygın kullanılan göstergedir [127]. Reaktif oksijen ürünleri ile reaksiyona giren proteinlerin amin grubu karbonillere dönüşerek biyolojik aktivitesini kaybeder [128]. Daha önceki çalışmalar ile benzer şekilde OHA grubunda plazma protein karbonil seviyesi ( $0,67 \pm 0,07$  nmol/mg protein) belirgin yüksek saptanmıştır. Ayrıca plazma protein karbonil düzeyi ile plazma serbest hemoglobin düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmuştur. Bu veriler hemoliz şiddeti arttıkça plazma oksidasyonunun da arttığını desteklemektedir. Plazma protein oksidasyonu ile hemoliz arasındaki ilişkiye ait veriler ilk kez bizim çalışmamızda gösterilmiştir.

OHA grubunda NO metabolitleri olan nitrit ve nitrat ( $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ) seviyelerini önceki çalışmalara benzer şekilde kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptadık [129]. NO, intravasküler hemoliz sonucu plazmada düzeyi artan serbest hemoglobinin hem grubu ile etkileşerek hızlı bir şekilde inaktif ve stabil ürünler olan nitrit ve nitrata metabolize olur, bu arada methemoglobin de oluşur. Böylece NO fizyolojik etkisini gösteremez [8].

OHA'de görülen vasküler disfonksiyon doku düzeyinde inflamasyon ve hiperkapniye neden olur. Bu koşullarda dokularda iNOS gen ekspresyonu artar ve peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) oluşumu artar.  $\text{ONOO}^-$  ortamdaki  $\text{CO}_2$  ile reaksiyona girerek nitrozoperoksokarbonat ( $\text{ONOOCO}_2$ ) oluşumuna neden olur.  $\text{ONOOCO}_2$  peroksinitritin aromatik nitrasyonuna aracılık eder, protein tirozin rezidülerinin nitrasyonuna sebep

olur. Böylece proteinlerin yapı ve fonksiyonunda değişiklik meydana gelir [130,131]. Protein nitrasyonunun en iyi göstergesi plazma 3-nitrotirozin düzeyinin ölçümüdür. OHA'de artmış myeloperoksidaz aktivitesi sonucu NO<sub>2</sub> okside olarak bir nitrojen radikali olan nitrojen dioksidi (<sup>•</sup>NO<sub>2</sub>) oluşturur. Asidik ortamda <sup>•</sup>NO<sub>2</sub> nitroz aside (HNO<sub>2</sub>) dönüşerek bir diğer yolla tirozin nitrasyonu sağlar. Biz de OHA grubunda daha önceki çalışmalarla uyumlu olacak şekilde 3-nitrotirozin düzeyini (0,18 ± 0,016 nmol/ml) anlamlı olarak yüksek saptadık [50]. 3-nitrotirozin seviyelerinin yüksek olması OHA hastalarında klinik durumları stabil iken bu oksidatif mekanizmalardan bir veya birden fazlasının aktif olduğunu göstermektedir. Ayrıca hasta grubunda 3-nitrotirozin düzeyi ile serbest hemoglobin düzeyleri arasında istatistiksel olarak korelasyon saptandı. Bu veriler hemolizin şiddeti ile oksidatif hasarlanmanın aynı oranda arttığını işaret etmektedir.

***Sonuç olarak;*** bu çalışmada plazma serbest hemoglobin düzeyleri ile protein karbonil seviyeleri ve plazma 3-nitrotirozin seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmıştır. Bu veriler intravasküler hemoliz sonucu açığa çıkan serbest hemoglobininin NO biyoyaralanımını da azaltacak şekilde plazma oksidasyonunu arttırdığını gösteren ilk çalışmadır.

## 6. ÖZET

### ORAK HÜCRE ANEMİSİNDE HEMOLİZİN PLAZMA OKSİDASYONUNA VE NİTRİK OKSİT METABOLİZMASINA ETKİLERİ

Nitrik oksit'in (NO) reaktif oksijen metabolitleriyle ve serbest plazma hemoglobiniyle reaksiyona girmesi, fizyolojik NO sinyal iletilişinde bozulma meydana getirerek endotelial disfonksiyona neden olur. Bu sebepten dolayı OHA olan hastalardan ve kontrol grubundan alınan tam kanda hemoliz varlığı değerlendirilerek, plazma lipid oksidasyonu, protein oksidasyonu, protein nitrasyonu ve nitrik oksit metabolitleri çalışılmıştır.

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji Bilim Dalına başvuran 25 homozigot HbSS hastası ve bu hastalarla yaş ve cinsiyet uyumlu 15 sağlıklı kontrol çalışmaya alınmıştır. Hastaların klinik durumları stabildi ve son 3 ay içinde transfüzyon almamışlardı. Orak hücre anemisi tanısı klinik, ailesel ve laboratuvar bulguları değerlendirilerek konulmuştur. Laboratuvar bulgularından özellikle Hb türlerinin belirlenmesi ve HbF seviyeleri HbSS tanısında değerlidir. Plazmada hemoliz varlığını değerlendirmek için hasta ve kontrol gruplarından elde edilen kanda hemogram, retikülosit sayımı, plazma haptoglobin düzeyi, plazma indirekt bilirubin düzeyi, plazma laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitesi ve LDH izoenzimlerine bakılmıştır. Bu parametrelerin haricinde plazma protein karbonil seviyeleri, plazma lipid oksidasyonu ve plazma nitrik oksit metabolitleri ölçülmüştür.

Orak hücre anemisi grubunda hemolize bağlı olarak tam kanda hemoglobin ve plazmada haptoglobin düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmışken, MCV, MCH, retikülosit, plazma LDH, total ve direkt bilirubin düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. Plazma nitrik oksit metabolitleri, protein ve lipid oksidasyon ürünleri de orak hücre anemisi grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükselmiştir. Plazma protein oksidasyonu ve nitrasyonu serbest plazma hemoglobin düzeyleri ile anlamlı olarak korelasyon göstermiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler, orak hücre anemisi olan grupta hemoliz olduğunu ve hemolize bağlı olarak da plazma protein oksidasyonunun ve nitrasyonunun arttığını göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** Orak hücre anemisi, hemoliz, nitrik oksit, plazma, oksidasyon.

## **7. ABSTRACT**

### **THE EFFECT OF HEMOLYSIS ON PLAZMA OXIDATION AND NITRATION IN PATIENTS WITH SICKLE CELL DISEASE**

Reduced nitric oxide (NO) bioavailability, NO resistance and endothelial dysfunction in sickle cell disease (SCD) results from consumption of NO by plasma cell-free hemoglobin and reactive oxygen species. The aim of this study was to determine the influence of increased hemolysis on plasma oxidation and nitration in SCD patients.

Blood was collected from healthy hemoglobin (Hb A) volunteers and steady state homozygous HbSS patients who had not received blood transfusions in the last 3 months. All patients and healthy volunteers enrolled in the study were free from nonsteroidal anti-inflammatory drugs for over 14 days. Diagnosis of SCD patients was based on clinical, familial, and laboratory data, including Hb electrophoresis and estimation of HbF and A<sub>2</sub> levels. Hemolysis was characterized by low levels of hemoglobin and haptoglobin and high levels of reticulocyte, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), plasma cell-free hemoglobin, bilirubin, total LDH and dominance of LDH-1 isoenzyme. Plasma 8-isoprostane, protein carbonyl and nitrotyrosine levels were measured to evaluate oxidized lipids, oxidized and nitrated proteins, respectively. Plasma nitrite and nitrate levels were also determined to assess NO production in both SCD patients and controls.

Markers of hemolysis were significantly evident in SCD patients compared to controls. Plasma 8-isoprostane, protein carbonyl and nitrotyrosine levels were markedly elevated in SCD patients as compared to the control group. Linear regression analysis revealed a significant inverse correlation between hemoglobin and reticulocyte counts and a significant positive correlation of plasma cell-free hemoglobin with protein carbonyl and nitrotyrosine levels. The obtained data reveals that increased hemolysis observed in SCD influences both plasma protein oxidation and nitration reactions.

**Keywords:** Sick cell disease, hemolysis, nitric oxide, plasma, oxidation.

## 8. KAYNAKLAR

1. Kuross SA, Rank BH, Hebbel RP. *Excess heme in sickle erythrocyte inside-out membranes: possible role in thiol oxidation*. Blood 1988; 71(4): 876-82.
2. Hebbel RP. *Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes*. J Clin Invest 1982; 70(6): 1253-9.
3. Hebbel RP. *The sickle erythrocyte in double jeopardy: autoxidation and iron decompartmentalization*. Semin Hematol 1990; 27(1): 51-69.
4. Tatum VL, Chow CK. *Antioxidant status and susceptibility of sickle erythrocytes to oxidative and osmotic stress*. Free Radic Res 1996; 25(2): 133-9.
5. Natta CL, Tatum VL, Chow CK. *Antioxidant status and free radical-induced oxidative damage of sickle erythrocytes*. Ann N Y Acad Sci 1992; 669: 365-7.
6. Aslan M, Thornley-Brown D, Freeman BA. *Reactive species in sickle cell disease*. Ann N Y Acad Sci 2000; 899: 375-91.
7. Aslan M. *Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease*. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98(26): 15215-20.
8. Moncada S, Higgs EA. *Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance*. Eur J Clin Invest 1991; 21(4): 361-74.
9. Rubbo H. *Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives*. J Biol Chem 1994; 269(42): 26066-75.
10. Aslan M, Freeman BA. *Oxidant-mediated impairment of nitric oxide signaling in sickle cell disease--mechanisms and consequences*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 2004; 50(1): 95-105.
11. Radi R. *Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide*. Arch Biochem Biophys 1991; 288(2): 481-7.
12. O'Donnell VB. *Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide, and nitronium ion*. Chem Res Toxicol 1999; 12(1): 83-92.
13. Beckman JS. *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide*. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87(4): 1620-4.
14. Aslan M, Freeman BA. *Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease*. Free Radic Biol Med 2007; 43(11): 1469-83.
15. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. *Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes*. Blood Rev 2007; 21(1): 37-47.
16. Bain BJ. *Haemoglobin and the genetics of haemoglobin synthesis*. 2nd ed. Haemoglobinopathy Diagnosis, ed. BJ Bain 2006; Blackwell Publishing Ltd.: 1-25.

17. Kulozik AE. *Hemoglobin variants and the rarer hemoglobin disorders*. 3rd ed. Pediatric Hematology, ed. I.M.H. Robert J. Arceci, Owen P Smith 2006; Blackwell Publishing Ltd.: 231-54.
18. Gross SS, Lane P. *Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink*. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96(18): 9967-9.
19. McMahon C. *Sickle cell disease*. 3rd ed. Pediatric Hematology, ed. I.M.H. Robert J. Arceci, Owen P Smith 2006; UK: Blackwell Publishing Ltd.: 213-30.
20. Bain BJ. *Sickle cell haemoglobin and its interactions with other variant haemoglobins and with thalassaemias*. 2nd ed. Haemoglobinopathy Diagnosis, ed. BJ Bain 2006; Blackwell Publishing Ltd.: 139-89.
21. Adelaye A. *Some early Nigerian doctors and their contribution to modern medicine in West Africa*. Med Hist 1974; 18(3): 275-93.
22. Herrick JB. *Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia*. 1910. Yale J Biol Med 2001; 74(3): 179-84.
23. Pauling L, Itano HA. *Sickle cell anemia a molecular disease*. Science 1949; 110(2865): 543-8.
24. Ingram VM. *Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin*. Nature 1957; 180(4581): 326-8.
25. Aidoo M. *Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality*. Lancet 2002; 359(9314): 1311-2.
26. Williams TN. *Sickle cell trait and the risk of Plasmodium falciparum malaria and other childhood diseases*. J Infect Dis 2005; 192(1): 178-86.
27. Diallo D, Tchernia G. *Sickle cell disease in Africa*. Curr Opin Hematol 2002; 9(2): 111-6.
28. Ashley-Koch A, Yang Q, Olney RS. *Sickle hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease: a HuGE review*. Am J Epidemiol 2000; 151(9): 839-45.
29. Hickman M. *Mapping the prevalence of sickle cell and beta thalassaemia in England: estimating and validating ethnic-specific rates*. Br J Haematol 1999; 104(4): 860-7.
30. Alouch Jr KY, Aksoy M. *Sickle cell anemia among Eti-Turks: hematological, clinical and genetic observations*. Brit J Haematol 1986; 64(1): 45-9.
31. Antmen B. *Orak Hücre Anemisi*. Türk Pediatri Arşivi 2009; 44(özel sayı): 39-42.
32. Kılınç M, Yüreğir G, Aksoy K. *İçel İlinde Orak Hücre Anemisi ve  $\beta$ -Talasemi Taşıyıcılık Sıklığı*. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 1999; 64: 62.
33. Arcasoy A. *Dünya'da ve Türkiye'de talasemi ve hemoglobinopatiler. Hemoglobinopati ve Talasemi Önlem-Tanı-Tedavi*. Ulusal Hemoglobinopati Konseyi-Sağlık Bakanlığı 2003 2.Baskı; Antalya: 11-19.
34. May A. *The concentration dependence of the oxygen affinity of haemoglobin S*. Br J Haematol 1975; 30(3): 317-35.
35. Briehl RW. *Effects of pH, 2,3-diphosphoglycerate and salts on gelation of sickle cell deoxyhemoglobin*. J Mol Biol 1973; 80(3): 445-58.
36. Wang WC. *Sickle Cell Anemia and Other Sickling Syndromes*. 12th ed. Wintrobe's Clinical Hematology, ed. FJ Greer JP, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Arber DA , Means Jr RT. Philadelphia,USA: Lippincott Williams & Wilkins 2009; 1039-83.

37. Eaton JW, Swofford HS. *Elevated erythrocyte calcium in sickle cell disease*. Nature 1973; 246(5428): 105-6.
38. Bookchin RM. *Sickle red cell dehydration: mechanisms and interventions*. Curr Opin Hematol 2002; 9(2): 107-10.
39. Brugnara C. *Therapy with oral clotrimazole induces inhibition of the Gardos channel and reduction of erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease*. J Clin Invest 1996; 97(5): 1227-34.
40. Shartava A. *Irreversibly sickled cell beta-actin: defective filament formation*. Am J Hematol 1997; 55(2): 97-103.
41. Kaul DKH. *Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice*. J Clin Invest 2000; 106: 411-20.
42. Test ST, Lubin B. *Characterization of the complement sensitivity of density-fractionated sickle cells*. Blood 1991; 78(suppl): 202a.
43. Moncada S. *The L-arginine: nitric oxide pathway, cellular transduction and immunological roles*. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res 1993; 28: 97-9.
44. Palmer RM, Moncada S. *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from Larginine*. Nature 1988; 333(6174): 664-6.
45. Marsden PA. *Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene*. J Biol Chem 1993; 268(23): 17478-88.
46. Stamler JS, Loscalzo J. *Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms*. Science 1992; 258: 1898-902.
47. Gewaltig MT, Kojda G. *Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential*. Cardiovasc Res 2002; 55(2): 250-60.
48. Aslan M, Yucel I. *Oxidative and nitrative stress markers in glaucoma*. Free Radic Biol Med 2008; 45(4): 367-76.
49. Klings ES, McClung J, Stucchi AF, McMahon L, Brauer M, Farber HW. *Increased F2 isoprostanes in the acute chest syndrome of sickle cell disease as a marker of oxidative stress*. Am J Respir Crit Care Med 2001; 164(7): 1248-52.
50. Aslan M, Townes TM, Coward L, Kirk MC, Barnes S, Alexander CB, et al. *Nitric oxide-dependent generation of reactive species in sickle cell disease. Actin tyrosine induces defective cytoskeletal polymerization*. J Biol Chem 2003; 278(6): 4194-204.
51. Schopfer FJ. *NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response?* Trends Biochem Sci 2003; 28: 646-54.
52. van der Vliet A, Halliwell B, Cross CE. *Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity*. J Biol Chem 1997; 272: 7617-25.
53. Rongen GA, Smits P, Thien T. *Endothelium and the regulation of vascular tone with emphasis on the role of nitric oxide. Physiology, pathophysiology and clinical implications*. Neth J Med 1994; 44(1): 26-35.
54. Wood KC, Hsu LL, Gladwin MT. *Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance*. Free Radic Biol Med 2008; 44(8): 1506-28.

55. Spiecker M. *Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants.* J Leukoc Biol 1998; 63(6): 732-9.
56. Ballas SK, Mohandas N. *Pathophysiology of vaso-occlusion.* Hematol Oncol Clin North Am 1996; 10(6): 1221-39.
57. Bunn HF. *Pathogenesis and treatment of sickle cell disease.* N Engl J Med 1997; 337(11): 762-9.
58. Platt OS. *Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death.* N Engl J Med 1994; 330(23): 1639-44.
59. Ballas SK, Luchtman-Jones L, Benjamin L. *Secretory phospholipase A2 levels in patients with sickle cell disease and acute chest syndrome.* Hemoglobin 2006; 30(2): 165-70.
60. Vichinsky EP. *Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group.* N Engl J Med 2000; 342(25): 1855-65.
61. Castro O, Thorington B. *The acute chest syndrome in sickle cell disease: Incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease.* Blood 1994; 84: 643-9.
62. Balkaran B. *Stroke in a cohort of patients with homozygous sickle cell disease.* J Pediatr 1992; 120(3): 360-6.
63. Ohene-Frempong K. *Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors.* Blood 1998; 91(1): 288-94.
64. Adams RJ. *Discontinuing prophylactic transfusions used to prevent stroke in sickle cell disease.* N Engl J Med 2005; 353(26): 2769-78.
65. Adams RJ, Hsu L. *Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography.* N Engl J Med 1998; 339: 5-11.
66. Rezende PV, Murao M, Chaves AC, Ribeiro AC. *Acute splenic sequestration in a cohort of children with sickle cell anemia.* J Pediatr (Rio J) 2009; 85(2): 163-9.
67. Emond AM. *Acute splenic sequestration in homozygous sickle cell disease: natural history and management.* J Pediatr 1985; 107(2): 201-6.
68. Smith-Whitley K. *Epidemiology of human parvovirus B19 in children with sickle cell disease.* Blood 2004; 103(2): 422-7.
69. Borsato ML. *[Aplastic crisis in sickle cell anemia induced by parvovirus B19].* J Pediatr (Rio J) 2000; 76(6): 458-60.
70. Kato GJ. *Priapism in sickle-cell disease: a hematologist's perspective.* J Sex Med 2012; 9(1): 70-8.
71. Crane GM, Bennett Jr. NE. *Priapism in sickle cell anemia: emerging mechanistic understanding and better preventative strategies.* Anemia 2011; 2011: 297364.
72. Broderick GA. *Priapism and sickle-cell anemia: diagnosis and nonsurgical therapy.* J Sex Med 2012; 9(1): 88-103.
73. Claster S, Vichinsky EP. *Managing sickle cell disease.* BMJ 2003; 327(7424): 1151-5.
74. Lanzkowsky P. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology.* Fifth Edition ed. Hemoglobinopathies, ed. JL Kwiatkowski 2011: Elsevier.
75. Daly B, Kral MC, Tarazi RA. *The role of neuropsychological evaluation in pediatric sickle cell disease.* Clin Neuropsychol 2011; 25(6): 903-25.

76. Bunn HF. *Pulmonary hypertension and nitric oxide depletion in sickle cell disease*. Blood 2010; 116(5): 687-92.
77. Gladwin MT, Sachdev V. *Cardiovascular abnormalities in sickle cell disease*. J Am Coll Cardiol 2012; 59(13): 1123-33.
78. Knight J, Murphy TM, Browning I. *The lung in sickle cell disease*. Pediatr Pulmonol 1999; 28(3): 205-16.
79. Ataga KI, Orringer EP. *Renal abnormalities in sickle cell disease*. Am J Hematol 2000; 63(4): 205-11.
80. da Silva GB Jr., Liborio AB, Daher Ede F. *New insights on pathophysiology, clinical manifestations, diagnosis, and treatment of sickle cell nephropathy*. Ann Hematol 2011; 90(12): 1371-9.
81. Ebert EC, Nagar M, Hagspiel KD. *Gastrointestinal and hepatic complications of sickle cell disease*. Clin Gastroenterol Hepatol 2010; 8(6): 483-9; quiz e70.
82. Battersby AJ, Knox-Macaulay HH, Carrol ED. *Susceptibility to invasive bacterial infections in children with sickle cell disease*. Pediatr Blood Cancer 2010; 55(3): 401-6.
83. Milner PF, Sebes JJ. *Sickle cell disease as a cause of osteonecrosis of the femoral head*. N Engl J Med 1991; 325: 1476-81.
84. Ladizinski B, Mistry N, Alavi A, Sibbald RG, Salcido R. *Sickle cell disease and leg ulcers*. Adv Skin Wound Care 2012; 25(9): 420-8.
85. Bain BJ. *Laboratory techniques for the identification of abnormalities of globin chain synthesis*. 2nd ed. Haemoglobinopathy Diagnosis, ed. BJ Bain 2006; Blackwell Publishing Ltd.
86. Guideline N. *The laboratory diagnosis of haemoglobinopathies*. Br J Haematol 1998; 101(4): 783-92.
87. IA, T. *Hemolytic anemias. Diagnosis and management*. Med Clin North Am 1992; 76(3): 649-68.
88. Dhaliwal G, Tierney LM Jr. *Hemolytic anemia*. Am Fam Physician 2004; 69(11): 2599-606.
89. Azarov I, Jeffers A, Basu S, Ucer B, Hantgan RR, Levy A, Kim-Shapiro DB. *Rate of nitric oxide scavenging by hemoglobin bound to haptoglobin*. Nitric Oxide 2008; 18(4): 296-302.
90. Andersen CB, Nielsen MJ. *Structure of the haptoglobin-haemoglobin complex*. Nature 2012; 489(7416): 456-9.
91. Kopperschläger G. *Methods for the separation of lactate dehydrogenases and clinical significance of the enzyme*. J Chromatogr B Biomed Appl 1996; 684(1-2): 25-49.
92. Canatan D. *Orak Hücre Anemisi*. XXX. Ulusal Hematoloji Kongresi, Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu 2003; 93-100.
93. Charache S. *Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia*. N Engl J Med 1995; 332(20): 1317-22.
94. Heeney MM, Ware RE. *Hydroxyurea for children with sickle cell disease*. Hematol Oncol Clin North Am 2010; 24(1): 199-214.

95. Trompeter S, Roberts I. *Haemoglobin F modulation in childhood sickle cell disease*. Br J Haematol 2009; 144(3): 308-16.
96. DeSimone J. *Maintenance of elevated fetal hemoglobin levels by decitabine during dose interval treatment of sickle cell anemia*. Blood 2002; 99(11): 3905-8.
97. Atweh GF, Loukopoulos D. *Pharmacological induction of fetal hemoglobin in sickle cell disease and beta-thalassemia*. Semin Hematol 2001; 38(4): 367-73.
98. Piomelli S. *Planning an exchange transfusion in patients with sickle cell syndromes*. Am J Pediatr Hematol Oncol 1990; 12(3): 268-76.
99. Rosse WF. *Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease*. Blood 1990; 76(7): 1431-7.
100. Bhatia M, Walters MC. *Hematopoietic cell transplantation for thalassemia and sickle cell disease: past, present and future*. Bone Marrow Transplant 2008; 41(2): 109-17.
101. Vermynen C, Cornu G. *Bone marrow transplantation for sickle cell disease. The European experience*. Am J Pediatr Hematol Oncol 1994; 16(1): 18-21.
102. Paul RN. *Acute chest syndrome: sickle cell disease*. Eur J Haematol 2011; 87(3): 191-207.
103. Atz AM, Wessel DL. *Inhaled nitric oxide in sickle cell disease with acute chest syndrome*. Anesthesiology 1997; 87(4): 988-90.
104. Oppert MJ, Barckow D, Eckardt KU, Frei U, Kaisers U. *Inhaled nitric oxide for ARDS due to sickle cell disease*. Swiss Med Wkly 2004; 134: 165-7.
105. Weiner DL. *Preliminary assessment of inhaled nitric oxide for acute vaso-occlusive crisis in pediatric patients with sickle cell disease*. JAMA 2003; 289(9): 1136-42.
106. Morris CR. *Arginine therapy: a new treatment for pulmonary hypertension in sickle cell disease?* Am J Respir Crit Care Med 2003; 168(1): 63-9.
107. Machado RF. *Sildenafil therapy in patients with sickle cell disease and pulmonary hypertension*. Br J Haematol 2005; 130(3): 445-53.
108. De Franceschi L. *Oral magnesium supplements reduce erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease*. J Clin Invest 1997; 100(7): 1847-52.
109. Vichinsky E. *New therapies in sickle cell disease*. Lancet 2002; 360(9333): 629-31.
110. Shalev O, Goldfarb A, Grinberg L, Abrahamov A, Olivieri NF, Rachmilewitz EA, Heibel RP. *Deferiprone (L1) chelates pathologic iron deposits from membranes of intact thalassemic and sickle red blood cells both in vitro and in vivo*. Blood 1995; 86: 2008-13.
111. Kanamori Y, Shimono T. *[The effects of administration of haptoglobin for hemolysis by extracorporeal circulation]*. Rinsho Kyobu Geka 1989; 8(5): 463-7.
112. Gando S. *The effects of massive transfusion and haptoglobin therapy on hemolysis in trauma patients*. Surg Today 1994; 24(9): 785-90.
113. Ohga S, Nomura A. *Haptoglobin therapy for acute favism: a Japanese boy with glucose-6-phosphate dehydrogenase Guadalajara*. Br J Haematol 1995; 89(2): 421-3.
114. Gill FM. *Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease*. Blood 1995; 86(2): 776-83.
115. Ou CN, Rognerud CL. *Diagnosis of hemoglobinopathies: electrophoresis vs. HPLC*. Clin Chim Acta 2001; 313(1-2): 187-94.

116. Eridani S, Mosca A. *Fetal hemoglobin reactivation and cell engineering in the treatment of sickle cell anemia*. Journal of Blood Medicine 2011; 2: 23-30.
117. Nagel RL, Johnson J, Labie D, Wajcman H, Isaac-Sodeye WA, Honig GR, et al. *Structural bases of the inhibitory effects of hemoglobin F and hemoglobin A2 on the polymerization of hemoglobin S*. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76(2): 670-2.
118. Shokrani M, Turner EA, Aguinaga MD. *Chromatographic measurements of hemoglobin A2 in blood samples that contain sickle hemoglobin*. Ann Clin Lab Sci 2000; 30(2): 191-4.
119. Kato GJ, Machado RF, Little JA, Taylor J 6th, Morris CR, Nichols JS, et al. *Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension and death in patients with sickle cell disease*. Blood 2006; 107(6): 2279-85.
120. Reiter CD. *Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease*. Nat Med 2002; 8(12): 1383-9.
121. Hillery CA. *Pathophysiology of stroke in sickle cell disease*. Microcirculation 2004; 11(2): 195-208.
122. Gladwin MT, Kato GJ. *Cardiopulmonary complications of sickle cell disease: role of nitric oxide and hemolytic anemia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2005: 51-7.
123. Mohan JS, Bareford D, Blann AD. *Platelet P-selectin and platelet mass, volume and component in sickle cell disease: relationship to genotype*. Thromb Res 2006; 117(6): 623-9.
124. Adler BK, Carabasi MH, Vaughan WP, Reddy VV, Prchal JT. *Fatal sickle cell crisis after granulocyte colony-stimulating factor administration*. Blood 2001; 97(10): 3313-4.
125. Grigg A. *Granulocyte colony-stimulating factor-induced sickle cell crisis and multiorgan dysfunction in a patient with compound heterozygous sickle cell/beta+ thalassemia*. Blood 2001; 97(12): 3998-9.
126. Aslan M. *Modulation of redox pathways in neutrophils from sickle cell disease patients*. Exp Hematol 2008; 36(11): 1535-44.
127. Stadtman ER, Oliver CN. *Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences*. J Biol Chem 1991; 266(4): 2005-8.
128. Shacter E. *Protein oxidative damage*. Methods Enzymol 2000; 319: 428-36.
129. Rees DC. *The metabolites of nitric oxide in sickle-cell disease*. Br J Haematol 1995; 91(4): 834-7.
130. Lang JD. *Hypercapnia via reduced rate and tidal volume contributes to lipopolysaccharide-induced lung injury*. Am J Respir Crit Care Med 2005; 171(2): 147-57.
131. Baldus S, Eiserich JP, Freeman BA. *Is \*NO news bad news in acute respiratory distress syndrome?* Am J Respir Crit Care Med 2001; 163(2): 503-10.