

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**TALASEMİ HASTALARINDA, HEMOREOLOJİK
PARAMETRELER ÜZERİNE ÇİNKONUN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mukaddes SİNAN

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Nesrin Zeynep ERTAN**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
FİZYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Programında Doktora öğrencisi **Mukaddes SİNAN** tarafından Prof.Dr.Nesrin Zeynep ERTAN danışmanlığında hazırlanan “**Talasemi Hastalarında Hemoreolojik Parametreler Üzerine Çinkonun Etkisinin Araştırılması**” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından, 31 /01/2020 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı**

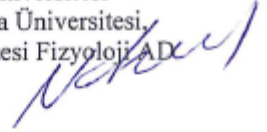
Prof. Dr. Zeynep KARAKAŞ
İstanbul Üniversitesi,
İstanbul Tıp Fakültesi,
Çocuk Sağ. ve Hast.A.D

**Jüri-Danışman**

Prof. Dr. Nesrin Zeynep ERTAN
İstanbul Aydın Üniversitesi
Tıp Fakültesi Fizyoloji A D

Jüri

Prof. Dr. Nuran DARIYERLİ
İstanbul Üniversitesi
Cerrahpaşa Üniversitesi,
Tıp Fakültesi Fizyoloji AD

**Jüri**

Prof.Dr. Mehmet KAYA
Koç Üniversitesi
Tıp Fakültesi Fizyoloji AD

Jüri

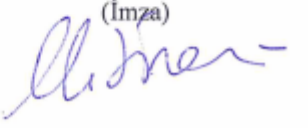
Prof.Dr.Hüsniye BİRMAN
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi
Fizyoloji AD



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Mukaddes Sinan

(İmza)


TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince bana her konuda yardımcı olup bölümün olanaklarından yararlanmamı sağlayan Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. F. Aytül UYAR'a, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, tavsiye ve eleştirileriyle beni yönlendiren, anlayış ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nesrin Zeynep ERTAN'a, teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin önemli bir kısmını çalıştığım Koç Üniversitesi'ndeki Hemoreoloji Laboratuvarının kapılarını bana seve seve açan ve tez çalışmam boyunca, bana çok değerli katkılarda bulunan aynı zamanda ikinci tez danışman hocam Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Doç. Dr. Özlem YALÇIN'a teşekkür ederim.

Bu çalışmanın projelendirilmesi ve gerçekleştirilmesindeki katkıyla yoğunluğuna rağmen bana yardımcı olan İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Onkoloji ve Hematoloji Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Zeynep KARAKAŞ'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca bana her türlü konuda sabırla yardımcı olarak güler yüzünü hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Elif UĞUREL'e ve Evrim GÖKSEL'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca bana yardımlarını esirgemeyen, İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları'nda görevli kıymetli hemşireler Dilek DOĞAN KABOĞLU'na, Sevda GÜNDAĞ'a, bölüm sekreteri Nurten YEŞİLDAĞ'a ve diğer tüm Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 31192

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Talasemi.....	3
2.1.1. Tarihçe ve Epidemiyoloji.....	3
2.1.2. Talaseminin Tanımı	4
2.1.3. Globin Zincir Yapımı.....	4
2.1.4. Talasemi Sendromunda Patofizyoloji	6
2.1.5. Talasemilerin Sınıflandırılması.....	7
2.1.5.1. Alfa Talasemiler.....	8
2.1.5.1.1. Alfa Talaseminin Klinik Tipleri.....	8
2.1.5.1.1.1. Sessiz Alfa Talasemi Taşıyıcılığı:.....	8
2.1.5.1.1.2. Alfa Talasemi Taşıyıcılığı:.....	8
2.1.5.1.1.3. HbH Hastalığı:	9
2.1.5.1.1.4. Hb Bart's Hydrops Fetalis (Alfa Talasemi Major):	9
2.1.5.2. Beta Talasemiler.....	10
2.1.5.2.1. Beta Talasemide Patofizyoloji	10
2.1.5.2.2. Beta Talaseminin Klinik Tipleri.....	10
2.1.5.2.2.1. Sessiz Beta Talasemi Taşıyıcılığı (β^{++}):.....	10
2.1.5.2.2.2. Talasemi Minör (β -Talasemi Taşıyıcılığı - Heterozigot β -Talasemi):...10	
2.1.5.2.2.3. β -Talasemi İntermedia (TI):.....	11
2.1.5.2.2.4. Beta Talasemi Major (TM):	12
2.1.5.2.2.4.1. Talasemi Majorde Klinik Tanı	13
2.1.5.2.2.4.2. Talasemi Majorde Hematolojik Tanı	13
2.1.5.2.2.4.3. Talasemi Majorde Tedavi	13
2.1.5.2.3. Hb Anomalileri ile İlişkili Beta-Talasemiler.....	14

2.1.5.2.3.1. HbE/ β -talasemi:.....	14
2.1.5.2.3.2. HbC/ β -talasemi:	14
2.1.5.2.3.3. HbS/ β -talasemi:.....	15
2.2. Çinko (Zn).....	15
2.2.1. Çinko Metabolizması	15
2.2.2. Günlük Gereksinim ve Çinkonun Besinlerdeki Dağılımı	16
2.2.3. Çinkonun Emilim, Taşınma ve Atılımı	17
2.2.4. Çinkonun Biyokimyasal ve Fizyolojik Rolü.....	18
2.2.5. Çinko Eksikliği	19
2.2.5.1. Çinko Eksikliğinin Klinik Belirtileri.....	19
2.3. Talasemi ve Çinko	20
2.4. Hemoreoloji	21
2.4.1. Reoloji ve İlgili Kavramlar	21
2.4.1.1. Viskozite:	22
2.4.1.2. Kayma Hızı-Viskozite İlişkisi:.....	23
2.4.2. Kan Akımı ve Özellikleri.....	24
2.4.3. Kanın akışkanlığını belirleyen faktörler	26
2.4.3.1. Hematokrit (Hct)	26
2.4.3.2. Plazma viskozitesi	26
2.4.3.3. Eritrositler	27
2.4.3.3.1. Eritrosit Deformabilitesi.....	27
2.4.3.3.1.1. Hücre Membranının Viskoelastisitesi	29
2.4.3.3.1.2. Hücre Geometrisi (Yüzey Alanı-Hacim İlişkisi)	30
2.4.3.3.1.3. Sitoplazmik Viskozite	31
2.4.3.3.1.4. Eritrosit Deformabilitesi Ölçme Yöntemleri.....	31
2.4.3.3.2. Eritrosit Agregasyonu	31
2.4.3.3.2.1. Eritrosit Agregasyonu Ölçme Yöntemleri	33
2.5. Talasemi ve Diğer Bazı Hematolojik Hastalılarda Hemoreolojik Değişiklikler	33
2.6. Hemoreoloji ve Çinko	34
2.7. Oksidatif Stres.....	34
2.7.1. Serbest Oksijen Radikaller.....	34
2.7.2. Antioksidan Savunma Mekanizmaları	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37

3.1. Çalışmaya Katılan Hastalar.....	37
3.2. Çalışma Protokolü.....	37
3.2.1. Kan Alınması ve Ölçümler:	37
3.2.2. Hct Tayini ve Ayarlanması:	38
3.2.3. Eritrositlerin Çinko ile İnkübasyonu:.....	38
3.2.4. Hemoreolojik Parametrelerin Ölçümü:	38
3.2.4.1. Eritrosit Deformabilitesi Ölçümü.....	39
3.2.4.2. Ozmotik Deformabilite Ölçümü	40
3.2.4.3. Eritrosit Agregasyon Ölçümü	42
3.2.5. Oksidatif Stres ve Antioksidan Durumun Belirlenmesi.....	43
3.2.5.1. Eritrosit Lizatının Hazırlanması	43
3.2.5.2. CAT Çalışma Planı	44
3.2.5.3. GPx Çalışma Planı	45
3.2.5.4. SOD Çalışma Planı	46
3.2.5.5. Lipid Peroksidasyon (MDA Enzim Aktivitesinin Tayini) Çalışma Planı....	47
3.3. Verileri Değerlendirmede Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	49
4. BULGULAR.....	50
4.1. Deneklerin Demografik Özellikleri	50
4.2. Hematolojik ve Biyokimyasal Ölçümler	50
4.3. Eritrosit Deformabilitesi:	52
4.4. Eritrosit Agregasyonu:	56
4.5. Ozmotik Deformabilite:	57
4.6. Antioksidan Enzim Aktiviteleri	58
5. TARTIŞMA	60
KAYNAKLAR	70
EK 1: ETİK KURUL KARARI.....	86
EK 2: GÖNÜLLÜ ONAY VE HASTA BİLGİLENDİRME FORMU	88
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	91
ÖZGEÇMİŞ	92

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1: Çeşitli gıdalarda, yaygın tüketim porsiyonlarına göre çinko içerikleri

Tablo 3.1: Ozmotik deformabilite parametreleri

Tablo 3.3: Formaldehit stok ve seyreltilmiş örnek tamponu miktarları

Tablo 3.4: SOD stok ve seyreltilmiş örnek tamponu miktarları

Tablo 3.5: MDA stok ve su miktarları

Tablo 4.1: Hastaların ve sağlıklı grubun demografik özellikleri

Tablo 4.2: TM hastalarının hematolojik ölçüm değerleri

Tablo 4.3: TM hastalarının biyokimyasal değerleri

Tablo 4.4: 10 farklı kayma kuvvetinde sağlıklı ve TM denek gruplarına ait elongasyon indeksi (EI) değerleri

Tablo 4.5: Sağlıklı ve TM denek gruplarına ait $SS \frac{1}{2}$ ve EI_{max} değerleri

Tablo 4.6: Sağlıklı ve TM denek gruplarına ait AMP, AI, $t \frac{1}{2}$ değerleri

Tablo 4.7: Sağlıklı ve TM denek gruplarına ait EI_{min} , EI_{max} , EI_{hyper} , Area, O_{min} , O_{max} ve O_{hyper} değerleri

Tablo 4.8: Sağlıklı ve TM denek gruplarının, eritrosit örneklerinde antioksidan enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyon biyobelirteçi

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2.1: Eritrositin O₂ bağlayan Hb molekülü
- Şekil 2.2: Moleküler seviyede globin sentezi
- Şekil 2.3: Talasemi sendromlu hastalarda patofizyoloji
- Şekil 2.4 Beta talasemide patofizyoloji
- Şekil 2.5 : Bir damar lümeninin şematik temsili.
- Şekil 2.6: Laminar ve türbülant akımda hız profili
- Şekil 2.7: Normal kanda kayma hızı-viskozite eğrisi
- Şekil 2.8: Damarın enine kesiti boyunca eritrositlerin akışı
- Şekil 2.9: Kan viskozitesi üzerine %Hct etkisi
- Şekil 2.10: Eritrositlerin üç boyutlu şekli ve bir eritrositin enine kesiti
- Şekil 2.11: Eritrosit olgunlaşma evreleri
- Şekil 2.12: Eritrosit membranının şematik yapısı ve içerdiği lipitler
- Şekil 2.13: Eritrosit membranının şematik yapısı ve içerdiği proteinler
- Şekil 2.14: Stazda otolog plazmada eritrosit agregatları
- Şekil 3.1: LO®RCA Ektasitometre
- Şekil 3.2: Eritrosit elongasyonu sırasında difraksiyon paterninde değişiklik, elongasyon indeksinin hesaplanması
- Şekil 3.3: Ölçüm yöntemiyle belirlenen parametreler ile elongasyon indeksi (EI) – ozmolalite (O[mOsm/kg]) eğrisi (osmoscan eğrisi)
- Şekil 3.4: Eritrosit agregasyonunun sylectogramı
- Şekil 3.5: Eritrosit agregasyon indeksleri
- Şekil 4.1: Sağlıklı grup ile TM hastalarının %Hct değerleri ortalamaları
- Şekil 4.2:Çinko inkübasyonundan önce (başlangıç), sağlıklı ve TM denek gruplarında, 10 değişik kayma kuvvetinde EI ortalamaları
- Şekil 4.3: A: Sağlıklı ve B:TM hastaları denek gruplarında 10 değişik kayma kuvvetinde çinko öncesi (kontrol) ve çinko sonrası EI ortalamaları
- Şekil 4.4: Sağlıklı ve TM hastaları denek gruplarında, çinko inkübasyonundan önce ve sonra ölçülen ozmotik deformabilite eğrileri

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Hb: Hemoglobin

α : Alfa

β : Beta

Zn: Çinko

RDW: Eritrosit Dağılım Genişliği

HbA: Hemoglobin A

HbA₂: Hemoglobin A2

HbF: Hemoglobin F

TI: β -Talasemi İntermedia

MCV: Ortalama Eritrosit Hacmi

MCH: Ortalama Korpusküler Hemoglobin

MCHC: Ortalama Korpusküler Hemoglobin Konsantrasyonu

TM: β -Talasemi Major

HIV: Human Immunodeficiency Virus / İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü

DFO: Deferoksamin

DFP: Deferipron

DFX: Defasirox

HLA: Human Leukocyte Antigens / İnsan Lökosit Antijenleri

μ : mikron

cP: centipoise

Pa: pascal

mPa.sec: miliPascal sec (miliPascal sn)

sn⁻¹: resiprok saniye

P: poise

Hct: Hematokrit

EPO: Eritropoietin

fL: femtolitre

ESH: Eritrosit Sedimentasyon Hızı

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

MDA: Malondialdehit

SOD: Süperoksit Dismutaz

CAT: Katalaz

GPx: Glutasyon Peroksidaz

TBARS: Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler

EDTA: Etilendiamin tetra asetik asit

LORRCA: Laser Optical Rotational Red Cell Analyzer

nm: nanometre

mW: milivolt

EI: Elongasyon İndeksi

ED: Eritrosit Deformabilitesi

SS: *Shear Stress* (Kayma Kuvveti)

PVP: Polivinilpirolidon

Isc: ışık geri yansıma yoğunluğu

AMP: amplitüd

$t_{1/2}$: tam agregasyonun yarısı kadar agregasyonun meydana geldiği süre

AI: agregasyon indeksi

ÖZET

Sinan M, Talasemi Hastalarında, Hemoreolojik Parametreler Üzerine Çinkonun Etkisinin Araştırılması, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul 2020.

Amaç: Çalışmanın amacı, TM hastalarında hemoreolojik parametreler ile enzim aktiviteleri üzerine çinkonun etkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmaya, 28 TM hastası ile 30 sağlıklı gönüllü (SG) dahil edildi. Deneklerden venöz kan alınarak, çinko inkübasyonundan önce ve sonra olmak üzere; eritrosit deformabilitesi ve agregasyonu, ozmotik deformabilite ile CAT, GPx, SOD ve MDA ölçüldü. Bulgular, hem TM ile SG grupları arasında, hem de inkübasyondan önceki değerleri başlangıç olarak kabul edilerek kendi içinde karşılaştırıldı.

Bulgular: Bazı kayma kuvveti (SS) değerlerinde TM hastalarının başlangıç EI değerleri SG'ye göre anlamlı olarak düşük bulundu. İnkübasyondan sonra bazı SS değerlerindeki EI değerlerinde, TM ve SG de anlamlı olarak artış görüldü. Başlangıç AMP değeri, TM hastalarının SG'ye göre anlamlı olarak yüksek bulunurken, diğer eritrosit agregasyon parametrelerindeki farklar anlamlı görülmedi. İnkübasyondan sonra SG'nin AI değeri anlamlı olarak düşük, $t_{1/2}$ değeri yüksek bulunurken TM hastalarının AMP değeri anlamlı olarak düşük bulundu. TM hastalarının başlangıç O_{min} , O_{max} ve O_{hyper} değerleri SG'ye göre anlamlı olarak düşük bulundu. İnkübasyondan sonra, SG'nin ozmotik deformabilite parametrelerinde anlamlı bir fark görülmedi. Oysa, TM hastalarının EI_{max} , O_{max} ve Area değerlerinde, anlamlı bir azalma görüldü. TM ve SG gruplarının, başlangıç ve inkübasyondan sonra GPx, CAT, SOD ve MDA değerlerinde anlamlı bir değişiklik olmadı.

Sonuç: Çalışmamız bize, TM hastalarının eritrositlerinde sağlıklı eritrositlere göre daha düşük eritrosit deformabilitesi ve ozmotik deformabilitesi ile daha yüksek bir eritrosit agregasyonu bulguları ile ifade edebileceğimiz eritrosit reolojik bozuklukları olduğunu gösterdi. İnkübasyondan sonra ise; her iki grupta da eritrosit deformabilitesinde artış, eritrosit agregasyonunda azalma görüldü. Çinkonun eritrositler üzerine bu olumlu etkisinin, hastaların lehine kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:31192

Anahtar Kelimeler: talasemi, çinko, eritrosit deformabilitesi, eritrosit agregasyonu, ozmotik deformabilite

ABSTRACT

Sinan M, Investigation of The Effect of Zinc On Hemoreological Parameters In Thalassemia Patients, İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Physiology, Doktora Tezi, İstanbul 2020.

Purpose: The aim of this study was to investigate the effect of zinc on hemorheological parameters and enzyme activities in TM patients.

Materials and methods: Twenty eight TM patients and thirty healthy volunteers (HV) were included in this study. Venous blood samples were analyzed before and after the zinc incubation. We measured erythrocyte deformability, aggregation and osmotic deformability including enzyme activities. Data obtained from measurements before incubation were considered as initial and compared between groups also investigated TM and HV groups separately.

Results: In some *shear stresses* (SS), initial EI values of TM patients were significantly lower than HV group. After incubation, EI values at some SS, were found significantly increased in both groups. Initial AMP values were found significantly higher in TM patients than HV group, other erythrocyte aggregation parameters were not found significantly. After incubation, the AI value of HV group was found significantly decreased and the $t_{1/2}$ value was found increased, whereas the AMP value of TM patients were found significantly decreased. Initial O_{min} , O_{max} and O_{hyper} values of TM patients were found significantly lower than HV group. After incubation, no significant difference was observed in osmotic deformability parameters of HV group. However, there was a significant decrease in EI_{max} , O_{max} and Area values of TM patients. GPx, CAT, SOD and MDA enzyme activities also examined. But data showed that zinc had no significant effect on enzyme activities of both groups.

Conclusion: Our study showed that TM patients erythrocytes is associated with erythrocyte rheological disorders can be expressed by decreased erythrocyte deformability and osmotic deformability and increased erythrocyte aggregation compared to HV erythrocytes. After incubation; erythrocyte deformability was significantly increased while erythrocyte aggregation was significantly decreased in both groups. We think that this positive effect of zinc on erythrocytes can be used in favor of patients.

The present study was supported by the Research Fund of Istanbul University, Project No: 31192

Key Words: thalassemia, zinc, erythrocyte deformability, erythrocyte aggregation, osmotic deformability

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Talasemi, hemoglobinin (Hb) alfa (α)/beta (β) globin zincir oranında dengesizlik, etkisiz eritropoez, intestinal demir emilimi artışı ve kronik hemolitik anemi gibi bulgularla karakterize, otozomal resesif geçişli bir kan hastalığıdır. En sık görülen talasemi tipleri α -talasemi ve β -talasemidir (1-4). α zincir yapımı azlığı α -talasemiye, β zincir yapımı azlığı β -talasemiye neden olmaktadır (5). Kalıtsal Hb bozukluklarının α ve β -talasemi gibi major sınıflarından başka; HbS, HbC ve HbE gibi Hb anomalileri de farklı globinleri kodlayan gendeki veya yakınındaki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (3,4,6).

Çinko (Zn) ise, yeryüzünde en bol bulunan eser elementlerden biri olup sahip olduğu kimyasal özellikler sayesinde biyolojik sistemlerde önemli ve yararlı etkileri bulunmaktadır. Büyüme, gelişme ve immün sistem üzerine etkili bir eser elementtir (7,8). Zn'nin talasemi ile ilişkisi, çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (9-13). Talasemi hastalarında Zn eksikliğinin görüldüğü çalışmalarda; bu eksikliğin temel nedenleri, demir şelasyon tedavisine bağlı olarak idrarla fazla Zn atılımı, yüksek ferritin düzeyleri, karaciğer yetmezliği ve besinsel alımın yetersizliği olabilmektedir (9-13).

Hemoreoloji; plazmanın ve kanı oluşturan hücresel elemanların damar içerisindeki davranışını (deformasyon, agregasyon) ve kan akımını inceleyen bilim dalıdır (14,15). Kanın akış davranışı, uygun doku perfüzyonunun sürdürülmesinde önemli bir belirleyicidir. Birçok klinik çalışmada, kan akışkanlığı ile dolaşıma bağlı hastalıkların şiddeti arasındaki ilişki doğrulanmıştır. Yapılan araştırmalarla, kanın eritrosit deformabilitesinde azalma ile agregasyonunda artma, ayrıca kan ve plazma viskozitesinde artma gibi akış davranışında değişiklikler görüldüğü, bir dizi patolojik durumda gösterilmiştir (16-20). Bu patolojik durumlarda gözlemlenen değişiklikler, "hemoreolojik anormallik" olarak adlandırılır (21).

Talasemi hastalarında da, hemoreolojik anormallikler gösterilmiştir. Çeşitli çalışmalarda; α - talasemi taşıyıcılarının (22), ve farklı talasemi grubu hastalarının (23) eritrosit deformabilitesinin kontrol grubuna göre düşük olduğu, bir diğer çalışmada ise hem α - hem de β -talasemi hastalarında RDW (eritrosit dağılım genişliği) ile belirli kayma kuvveti etkilerindeki eritrosit elongasyon değeri arasında bir korelasyon olduğu (24) gösterilmiştir.

Zn ile ilgili hemoreolojik çalışmalarda, sporcularda Zn takviyesinin eritrosit deformabilitesini arttırdığı gösterilmiştir (25). Orak hücre anemileri ile yapılan in vitro bir çalışmada eritrosit deformabilitesinin Zn inkübasyonu sonrasında arttığı (26), bir diğer in vitro çalışmada da, ısıtma ile eritrosit rijiditesi artışı sağlanarak deformabilitesi azalan eritrositlerin çinko inkübasyonu sonrasında rijiditenin düzelerek deformabilitenin de arttığı gösterilmiştir (27). Başka bir çalışmada, çinkodan fakir beslenen sıçanlarda ozmotik fragilitenin arttığı, tekrar çinkodan zengin beslenme ile düzeldiği gösterilmiştir (28-30). Yine başka bir çalışmada da in vitro çinko inkübasyonunun eritrosit agregasyonunu azalttığı gösterilmiştir (31). Dolayısıyla, Zn ile eritrositlerin ilişkisi bazı parametrelerle gösterilse de çinko ile hemoreolojik parametreler arasındaki ilişki henüz tam aydınlatılamamıştır.

Bu bilgilerin ışığında, biz de çalışmamızda talasemi major hastalarında hemoreolojik parametreler ve bu parametrelerin çinko ile ilişkisini araştırmayı amaçladık. Böylece, yukarıda bahsedilen nedenlerden dolayı oluşan bir Zn eksikliğinin, hastada mikrodolaşımı etkileyecek olumsuz bir etkiye neden olup olmadığı, bu eksiklik tamamlandığı zaman ise bu etkinin ortadan kalkıp kalkmadığı araştırılacaktır. Ayrıca, daha önceki çalışmalarda gösterilen “eritrosit deformabilitesinde artışın” talasemi hastalarında da görülmesi, zaten şiddetli anemisi olan bu hastalarda, eritrositlerin dar sinüslerden geçerken, hemolizde azalma anlamına gelir.

Yaptığımız literatür taramasına göre, çinkonun talasemi hastalarının eritrositleri üzerine etkisini gösteren böyle geniş kapsamlı bir çalışmaya rastlamadık. O nedenle bütün literatür verilerinin ışığında, tezimizi, çinkonun sağlıklı kişilerdeki olumlu etkilerine dayanarak, talasemi hastalarının eritrositleri üzerine de olumlu katkısı olabileceği üzerine kurduk ve bunun bir ölçütü olarak da hemoreolojik parametreleri seçtik. Bu çalışma sonunda, çinkonun olumlu/yararlı etkisi görüldüğü takdirde, ileride talasemi hastalarındaki aneminin tedavisine katkıda bulunması ve çinkonun tedavi protokolünde yer alabilmesine katkısı açısından, bu çalışmanın değerli olacağını düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Talasemi

2.1.1. Tarihçe ve Epidemiyoloji

Talasemi ilk kez 1925’de, Thomas B. Cooley tarafından, İtalyan kökenli 4 çocukta gösterilmiştir. Ağır anemi, dalak ve karaciğer genişlemesi, cilt ve sklerada solukluk ile seyreden; hipotonik solüsyonlara dirençli eritrositlerin ve periferik kanda nükleuslu eritrositler ile orta derecede lökositozun görüldüğü bir kan hastalığı olarak tanımlanmıştır. 1932’de George Whipple ve Lesley Bradford, Akdeniz civarındaki ülkelerden geldiğini saptadıkları hastalığa Yunanca “deniz anemisi” anlamına gelen "Thalassanemia" adını vermişlerdir (1). 1938’de Caminopetros, talaseminin genetik geçişini, 1950’de ise Neel ve Itano hemoglobin elektroforezinde anormal hemoglobinleri tanımlamışlardır. 1950-1960 yılları arasında Minich, Vella, Aksoy, Whetherrall, Chernof ve daha birçok araştırmacı değişik ülkelere talasemi tanımlamış ve yayınlamışlardır. 1959’da Ingram ve Stretton, talasemileri α ve β olarak sınıflandırmışlardır. 1960-80 yılları arasında α , β , γ (gama) ve δ (delta) globinlerin, farklı genlerde olduğu yayınlanmıştır. 1960’lı yıllarda Wolman, talasemide farklı transfüzyon rejimleri uygulamış ve bunu yayınlamıştır. Kan transfüzyonu sonrasında biriken fazla demirin uzaklaştırılması için bir yol olan şelasyon ajanı Deferoksamin (DFO), Ciba tarafından elde edilmiş ancak ilk kullanımı 1970’li yıllarda başlamıştır. Talaseminin moleküler patolojisi ile ilgili çalışmalar ise, Southern blot tekniği kullanılarak 1980’li yıllarda gerçekleştirilmeye başlanmıştır (1,32).

Talasemi ve diğer hemoglobin anomalileri, ülkemizde olduğu gibi tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunudur. Toplum taraması, halk eğitim programları, genetik danışma ve rehberlik hizmetleri kullanılarak, anormal hemoglobin hastası doğumunun, uygun strateji ile önlenmesi çalışılmaktadır (1,33). Hb bozuklukları dünya genelinde %5 sıklıktadır. Talasemi; Afrika, Uzak Doğu, Orta Doğu, Batı Pasifik de artan göçler nedeniyle de Amerika ve Avrupayı içine alan kuşakta sık görülür (32). Ülkemizde ise Çukurova ve Akdeniz kıyı şeridi başta olmak üzere, Ege ve Marmara bölgelerinde talasemi taşıyıcılığı çok sık görülmektedir. Sağlıklı Türk popülasyonunda β -talasemi taşıyıcı sıklığı % 2,1 olup Türkiye’de 1,3-1,4 milyon taşıyıcı ve 5.000 civarında hasta bulunmaktadır (32,34).

1970'lerde ülkemizde talasemi ve hemoglobinopati ile ilgili çalışmalar başlamış, 1987'de Akar ve ark. tarafından Türk toplumunda talasemiye ait ilk moleküler çalışmalar gerçekleştirilmiş ve 2002'de Başak ve ark. tarafından Türk toplumunda β -talaseminin moleküler spektrumu yayınlanmıştır. 2002'de Altay ve ark. son 40 yılda yapılan anormal Hb çalışmalarını taramış ve en sık HbS, sonrasında HbD ve HbE olduğunu ve bunlardan başka 42 anormal Hb'nin ülkemizde bulunduğunu yayınlamışlardır (32,35-37).

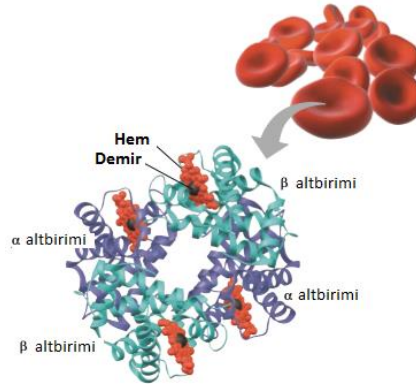
2.1.2. Talaseminin Tanımı

Talasemi, Hb sentezindeki bozukluk sonucunda gelişen, otozomal resesif geçişli bir kan hastalığıdır. Hastalığın ayırt edici özellikleri; α/β globin zincir oranında dengesizlik, etkisiz eritropoez, kronik hemolitik anemi ve intestinal demir emilimi artışıdır. En sık görülen talasemi tipleri α -talasemi ve β -talasemidir (2-4). Bu tanımlamaya göre, α zincir yapımı azlığı α -talasemiye, β zincir yapım azlığı β -talasemiye neden olmaktadır. β zincir yapımı hiç yoksa buna (β^0), β zincir yapımı az yapılıyorsa buna (β^+), kısmen yapılıyorsa (β^{++}) talasemi adı verilmektedir (5).

2.1.3. Globin Zincir Yapımı

Hb, omurgalıların eritrositlerinde bulunan, oksijen taşıyan bir proteindir (38). Görevi; akciğerlerde oksijenle bağlanmak, doku kapillerlerinde bu oksijeni bırakmaktır (39).

Hb, dört alt birimden oluşan küresel bir moleküldür. Her alt birim, bir polipeptide birleşik hem kısmı içerir. Hem, demir içeren bir porfirin türevidir. Polipeptitler toplu olarak, Hb molekülünün globin kısmı olarak adlandırılır (38). Hem molekülü, globin adlı uzun polipeptit zinciri ile bağlanarak Hb alt birimi olan Hb zincirini oluşturur. Dört Hb zinciri gevşekçe bağlanarak bütün bir Hb molekülünü oluşturur. Her bir Hb zincirinde, bir demir atomu içeren bir hem prostetik grubu ve her Hb molekülünde de dört Hb zinciri olduğu için, her Hb molekülünde, dört demir atomu bulunur. Bunların her biri de bir molekül oksijen ile bağlanabildiğinden, her Hb molekülü ile dört molekül oksijen (sekiz atom oksijen) taşınabilir (Şekil 2.1) (39).

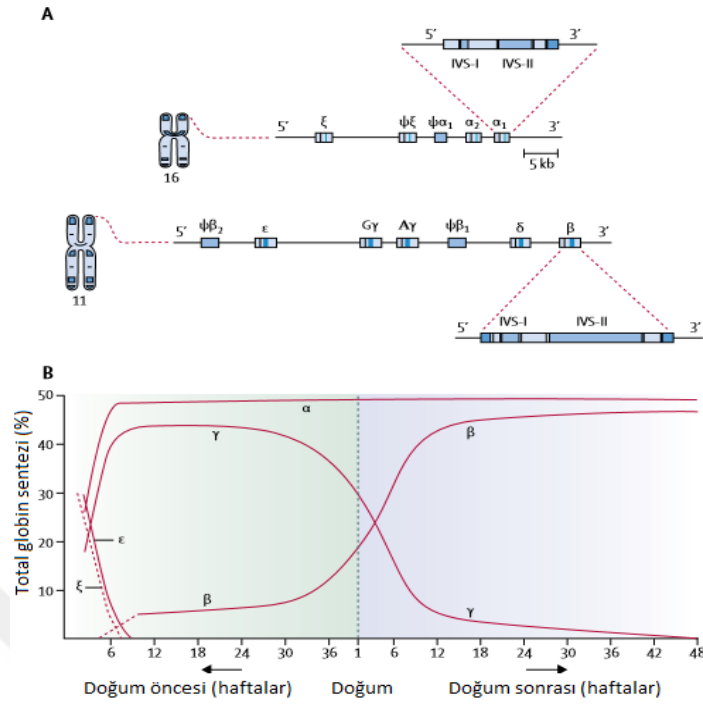


Şekil 2.1: Eritrositin O₂ bağlayan Hb molekülü (40)

Farklı Hb zinciri alt birimleri arasında, polipeptit kısmın aminosit içeriğine bağlı olarak bazı küçük değişiklikler bulunur. Farklı zincir tipleri; α , β , γ ve δ zincirleri olarak tanımlanmıştır (39).

Erişkin insanda en sık rastlanan Hb çeşidi olan Hemoglobin A (HbA) toplamın yaklaşık % 97'sini oluşturur ve 2 α ile 2 β zincirinin birleşmesinden oluşmaktadır ($\alpha_2\beta_2$). α zinciri 141, β zinciri 146 aminoasit içerir. Toplamın yaklaşık % 2-3'ünü oluşturan diğer bir erişkin insan Hb çeşidi de Hemoglobin A₂ (HbA₂) dir. Burada β ile δ zincirleri yer değiştirmiştir ($\alpha_2\delta_2$). Normal fetal yaşamda bulunan ana Hb çeşidi ise Hemoglobin F (HbF, $\alpha_2\gamma_2$) dir. HbF'den başka üç embriyonik Hb daha vardır. Bunlar; Hb Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$), Hb Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) ve Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$) dır (2).

Spesifik genler, farklı Hb zincirlerinin üretimini sağlamaktadır. Hb sentezi, kromozom 16 (α - benzeri globinleri kodlayan) ve kromozom 11 (β - benzeri benzeri globinleri kodlayan) üzerinde, iki çok genli küme tarafından kontrol edilir. α ve ζ zincirleri 16. kromozomun kısa kolunda (16p13.3) kodlanırken, δ , ϵ , G γ , A γ ve β zincirleri 11. kromozomun kısa kolunda (11p15.5) kodlanır (Şekil 2.2) (4,41).



Şekil 2.2: Moleküler seviyede globin sentezi (4)

A- Kromozom 16'da α globin ailesinin ve kromozom 11'de β globin ailesinin organizasyonu

B- Eritropoez bölgeleri ve gelişim sırasında globin sentezi modeli

(ψ : eksprese edilmeyen psödogenleri, IVS: intronları göstermektedir. Globin genlerinin üç ekzonu soluk mavi renkte gösterilmiştir.)

Gebeliğin ilk ayında Hb Gower 1, Hb Gower 2 ve Hb Portland esas olarak vitellüs kesesinde bulunan eritroid hücrelerinde oluşur. Fetal yaşamın geri kalanında, eritropoez bölgesi, karaciğer ve dalaktan kemik iliğine doğru kayar ve burada esas Hb, HbF dir. γ - globinden β globin ekspresyonuna geçiş doğumdan önce başlar ve bebek 6 aylıktan tamamlanır. Bu sürenin sonunda normal eritrosit Hb'nin % 95'inden fazlası yetişkin HbA dır. Geri kalan Hb, iki küçük bileşen olarak HbA₂ ve HbF'den oluşur (4,42,43).

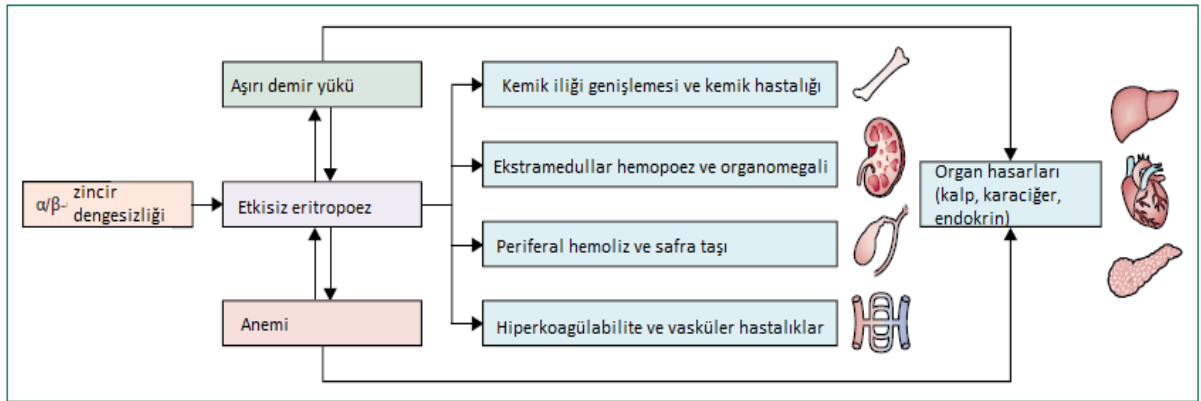
2.1.4. Talasemi Sendromunda Patofizyoloji

Talaseminin en önemli özelliği; etkisiz eritropoez ve hemolize, bununla birlikte bir dizi patofizyolojik mekanizmaya yol açan α ya da β globin zinciri dengesizliğidir (2-4,44).

β -talasemide, eritroid hücrelerde dengesiz α globin zinciri tetramerlerinin birikmesi; reaktif oksijen türlerinin oluşumuna ayrıca etkisiz eritropoez ve periferik hemolize yol açar (45). En önemli belirtisi; kolelitiazis gibi akut komplikasyonlara ve büyüme ile organ ve vasküler fonksiyon üzerinde zararlı etkilere neden olabilen kronik

hemolitik anemidir (46). Kemik iliğinde eritroid öncüllerinin proliferasyonun artması, kemik iliğinde genişlemenin ardından kemik hastalıklarına yol açar (45). Kemik iliğine ilaveten, dalak (splenomegali) ve karaciğer (hepatomegali) de aktive olur. Son olarak, etkisiz eritropoez; demir emilimi artışına ve aşırı demir birikimine neden olur. Aşırı demir yükü, çeşitli organ sistemlerinde, özellikle de karaciğerde morbiditelere yol açabilir (Şekil 2.3) (47).

α -talasemili hastalarda, α/β zincir dengesizliği ve etkisiz eritropoez kavramları β -talasemi ile benzerdir. β globin zincirleri; eritrosit zarına zarar veren Heinz cisimcikleri oluşturan, hücre içinde çöken $\beta 4$ veya HbH tetramerleri oluşturabilir. Her ne kadar aşırı demir yükü ve hiperkoagülabilite gibi belirtiler görülse de, α -talasemili hastalarda görülen belirtiler, β -talasemili hastalarda görülen belirtilerden daha hafiftir. α -talaseminin ana patolojik mekanizması, β -talasemi hastalarında görülen etkisiz eritropoezden ziyade periferik hemoliz ve kronik anemidir (44).



Şekil 2.3: Talasemi sendromlu hastalarda patofizyoloji (4)

2.1.5. Talasemilerin Sınıflandırılması

Talasemi sendromları; Hb'nin bir veya daha fazla globin alt biriminde üretim hızındaki azalma ile karakterize edilen bir genetik bozukluklar ailesidir. Kalıtsal Hb bozukluklarının α ve β -talasemi gibi major sınıflarından başka, yapısal varyantları da (HbS, HbC, HbE) bulunmaktadır ve bu farklı alt gruplar, farklı globinleri kodlayan gendeki veya yakınındaki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. α ve β -talasemi ile yapısal varyantlar birlikte hemoglobinopatileri oluşturur (3,4).

Talasemiler, azalmış oranda sentezlenen globin alt birimini ifade edecek genetik temele göre sınıflandırılır. Hangi globin veya globinlerin yetersiz üretildiğine bağlı olarak; α , β , γ , $\delta\beta$ ve $\epsilon\gamma\delta\beta$ çeşitlerine ayrılır (3).

2.1.5.1. Alfa Talasemiler

α globin geni, 16. kromozomun kısa kolunda yer alır. Normal bireylerde α globin sentezi, kromozom 16'nın her bir kopyasında iki tane olan dört α globin geni tarafından düzenlenir. Normal bir α globin genotipi, ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) olarak gösterilebilir. α genleri üzerinde meydana gelen delesyonlar veya nokta mutasyonları (tek veya birkaç baz değişimleri) sonucu, globin zincir sentezi azalmakta veya tamamen engellenmektedir (3,4).

Bir kromozomdaki her iki α globin geninin delesyona uğraması veya devre dışı bırakılması durumuna (α^0) talasemi denir; bu heterozigot genotip, ($--/\alpha\alpha$) ile gösterilir. Bu durumda α globin gen ekspresyonu ortadan kalkmıştır. Bir kromozomdaki her iki α globin geninde delesyon olması veya bağlı α genlerinden biri inaktive olduğunda ise, duruma (α^+) talasemi denir. Genotip; α globin genlerinden birinin delesyonu durumunda ($-\alpha/\alpha\alpha$) olarak yazılırken bu genlerden biri, bir mutasyon ile etkisiz hale getirilmişse ($\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$) şeklinde yazılır. Klinik bulgu, etkilenen gen sayısı ile ilişkili olarak görülmektedir (3).

α -talasemi hastalarının çoğunun klinik fenotipleri çok hafiftir ve yaşam boyunca fark edilmeyebilir. HbH hastalığı olan hastalar, değişken bir fenotipe sahiptir. Hb Bart's hydrops fetalis hastaları ise öldürücü bir anemi formuna sahiptir (48).

2.1.5.1.1. Alfa Talaseminin Klinik Tipleri

2.1.5.1.1.1. Sessiz Alfa Talasemi Taşıyıcılığı:

Dört α geninden birinde delesyon veya fonksiyonel bozukluk vardır ($\alpha\alpha/\alpha-$). En hafif formudur. Hematolojik ve klinik olarak normaldirler.

2.1.5.1.1.2. Alfa Talasemi Taşıyıcılığı:

Dört α geninden ikisinin etkilendiği tiptir. Tek kromozomda iki α geninde delesyon ($--/\alpha\alpha$) veya her iki kromozomda birer α geninde delesyon ($\alpha-/ \alpha-$) nedeni ile meydana gelir.

Rutin kan sayımı ile tespit edilen hafif veya orta şiddette mikrositik hipokromik aneminin dışında, α -talasemi taşıyıcıları (heterozigotlar), klinik olarak asemptomatiktir.

Tanı, genellikle sağlık kontrolü veya doğum öncesi tarama sırasında yapılır. Yorgunluk, halsizlik ve nefes darlığı gibi daha ciddi anemilerle ilgili şikayetler nadirdir (3,4,48).

2.1.5.1.1.3. HbH Hastalığı:

HbH hastalığı, en sık olarak iki farklı mutasyon için bileşik heterozigotlu hastalarda, daha az sıklıkta ise orta derecede şiddetli moleküler bir eksiklikten dolayı homozigotlarda görülür. α globin miktarı %30 daha az üretilir (48).

Üç α geninin delesyonu veya inaktivasyonu sonucu, ($--/\alpha-$) oluşur ve β_4 tetramerlerinin oluşması ile büyük miktarda β zinciri üretimi ile sonuçlanır. Bu β_4 tetramerleri, β zincirinin oldukça dengesiz bir varyantıdır ve eritrositlerde çökeltiler oluşturur. Bu çökeltiler “*Heinz body*” olarak isimlendirilir (4).

Hafif veya orta derecede hemolitik anemi, dalak genişlemesi, sarılık ve eritrosit parametrelerinde anormallik ile karakterizedir (48).

2.1.5.1.1.4. Hb Bart's Hydrops Fetalis (Alfa Talasemi Major):

Hb Bart's hydrops fetalis sendromlu yenidoğanlar, 16. kromozom üzerindeki α globin ekspresyonunda çok ciddi eksikliklere sahiptir. En sık olarak; her iki ebeveyn α globin geninin kalıtılmamasından kaynaklanırken bazı durumlarda bir ebeveyn şiddetli bir delesyonel olmayan mutasyonun kalıtımından, diğer ebeveyn ise α genlerinin kalıtılmamasından kaynaklanır (48). Diğer bir deyişle her iki kromozomda α geninde tam delesyon mevcuttur ($--/--$) (4). α zinciri üretimi intrauterin dönemde de olmadığı için fetal Hb sentezi de yoktur. Fizyolojik olarak fonksiyonel olmayan γ_4 , Bart's hydrops fetalis sendromlu yenidoğanların eritrositlerindeki Hb'nin çoğunu oluşturur, yani sadece dört γ globin sentezi söz konusudur. Ayrıca, tek fonksiyonel Hb, embriyonik Hb Portland'dır (48).

Hb Bart's hydrops fetalis sendromlu bebeklerde utero kalp yetmezliği ve anemi görülür. Hepatosplenomegali, beyin büyümesinde gerilik, iskelet ve kardiyovasküler bozukluklar ve plasenta genişlemesi hastalığın karakteristik özelliklerdir. Hasta bebekler, genellikle utero (23-38 hafta) içinde veya doğumdan kısa bir süre sonra doku hipoksisi nedeniyle ölür. Bununla birlikte, yoğun yaşam destek tedavisi verilen ve kan transfüzyonu ile tedavi edilen, birkaç yenidoğan vaka tanımlanmıştır (6,48).

2.1.5.2. Beta Talasemiler

β -talasemiler, Hb'nin β zincirlerinin sentezindeki azalma ile karakterize, kalıtsal kan hastalıkları grubudur (49). β globin zincirindeki azalma, α/β globin zincir dengesizliğine yol açar (50). Ciddi anemiden, klinik olarak asemptomatik bireylere kadar, değişken fenotiplere neden olur (53).

Şimdiye kadar, β globin geninde neredeyse 200 mutasyon karakterize edilmiştir. β -talasemilerin büyük çoğunluğuna β globin genleri içindeki nokta mutasyonları neden olur. Birkaç β -talasemi mutasyonu da, birkaç bazın eklenmesi veya delesyonu şeklindedir (6). β globin geninde hastalığa neden olan bu 200 mutasyondan bazıları sessiz mutasyonlara (sessiz β), bazıları β globin zincir üretiminde nispi bir azalmayla olan hafif mutasyonlara (β^+) neden olurken bazıları da, β globin zincir üretiminde tam bir azalmaya (β^0) neden olur (4).

2.1.5.2.1. Beta Talasemide Patofizyoloji

β globin zincirlerinin üretiminin az yapılması (β^+) veya hiç yapılmaması (β^0), dengesiz globin sentezine ve dolayısıyla fazla miktarda α zincirinin üretimine yol açar. β -talaseminin tüm ciddi formlarında HbF sentezi bir dereceye kadar devam etse de; HbA sentezi, β globin zincir üretimindeki eksiklikten dolayı yetersizdir. Başka bir deyişle, β ve γ zincirlerinin üretimi, α zincirleri ile eşleşmek için yeterli değildir. Bu, β globin zinciri ile birleşemeyip açıkta kalan fazla miktardaki α globin zincirleri kemik iliğinde bulunan eritroid öncüllerde çökerler. Sonuç olarak, hatalı eritroid ölçül olgunlaşması, etkisiz eritropoez ve eritrositlerin yaşam süresinin kısalması görülür (Şekil 2.4) (49,51).

2.1.5.2.2. Beta Talaseminin Klinik Tipleri

2.1.5.2.2.1. Sessiz Beta Talasemi Taşıyıcılığı (β^{++}):

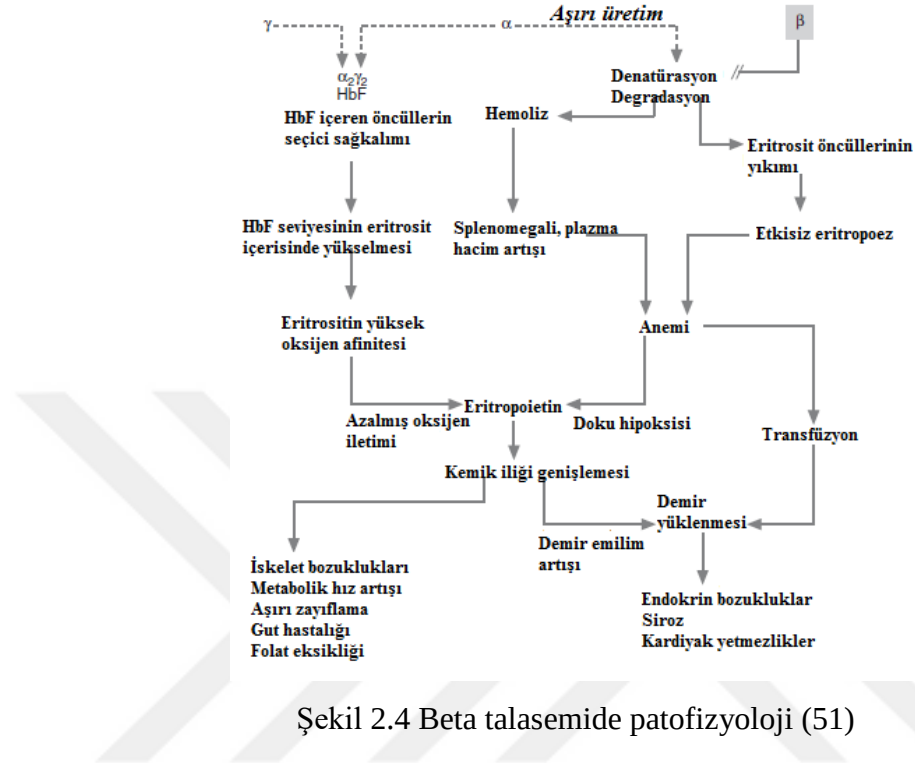
Neden olan mutasyon hafiftir. Klinik ve hematolojik olarak normaldirler (52,53).

2.1.5.2.2.2. Talasemi Minör (β -Talasemi Taşıyıcılığı - Heterozigot β -Talasemi):

Genellikle klinik olarak asemptomatiklerdir ancak bazen hafif bir anemi ile birlikte eritrosit parametrelerinde anormaliteye sahip olabilirler. β -talasemi minör için tedavi gerekmez. Her iki ebeveyn de taşıyıcı olduğunda, %25 homozigot talasemili çocuğa sahip olma riski vardır (49,53).

β -talasemi minörde karakteristik bulgu, Hb düşüklüğü ile eritrosit sayısı yüksekliği ve hafif anemidir. Karakteristik olarak eritrositlerin boyut ve şekillerinde

mikrositoz ve hipokrom vardır. β -talasemi minorün önemli bir özelliği de HbA_2 seviyesinin yükselmesidir. Ayrıca HbF seviyesi de hafifçe yükselebilir (53).



Şekil 2.4 Beta talasemide patofizyoloji (51)

2.1.5.2.2.3. β -Talasemi İntermedia (TI):

TI, β globin üretimini etkileyen gen mutasyonlarından kaynaklanır. Çoğu hasta β -talasemi için homozigot veya bileşik heterozigottur. Daha az yaygın olarak sadece bir β globin geni etkilenir. TI'li hastaların farklı fenotipleri, hafif ila şiddetli α/β globin zincirlerinde dengesizliğe neden olan farklı gen kusurlarından kaynaklanmaktadır (50).

TI, talasemi major ile talasemi minor arası klinik ile karakterizedir. Heterojen bir klinik vardır. Hastalar erişkin hayata kadar tamamen asemptomatik olup hafif bir anemi ile transfüzyon gereksimi olmaksızın yaşamını devam ettirir. Daha ağır klinik ile (yani büyüme ve gelişmede yavaşlamaların olabildiği) karakterize hastalar ise nadiren transfüzyon alabildikleri gibi transfüzyon almadan da yaşamlarını devam ettirebilirler (44,50,54,55).

TI teşhisi genellikle, >2 yaş, $Hb >7$ gr/dl olup, enfeksiyonu olmayan ve folik asidi yeterli düzeyde olan β -talasemili hastalarda yapılır. Ebeveynlerinden biri, normal veya sınır değerde HbA_2 veya artmış HbF (genellikle % 10'a kadar) ile karakterize β -talasemi taşıyıcısıdır. Bu hastalara genellikle mikrositik-hipokromik anemi (düşük MCV ve düşük

MCH) denir. Periferik yaymada; hafif ila şiddetli mikrositoz ve hipokrom, anizopoikiloitoz, polikromasi, *bazofilik stippling* (noktalanma) ve çekirdekli eritrositler (eritroblastlar) görülür. Serum demir, ferritin ve transferrin doygunluğu da artmış olabilmektedir (50).

2.1.5.2.2.4. Beta Talasemi Major (TM):

TM; "Cooley Anemisi" ve "Akdeniz anemisi" olarak da adlandırılır (49).

Her iki β globin geninin bozuk olduğu TM, (β^0) veya (β^+) genleri için homozigot veya bileşik heterozigottur (56). TM, otozomal resesif kalıtılır. Etkilenen bir çocuğun ebeveyni zorunlu heterozigottur ve hastalığa neden olan bir β globin gen mutasyonunun bir kopyasını taşır. Bu heterozigot ebeveynlerden doğacak her bir çocukta etkilenme olasılığı % 25, asemptomatik bir taşıyıcı olma olasılığı % 50 iken etkilenmemiş ve taşıyıcı olma olasılığı % 25 olur (49,56).

TM bireyler, genellikle 6-24 aylarda tıbbi destek için başvurur ve bireylerin hayatta kalmak için düzenli kan transfüzyonu alması gerekmektedir (49,53).

Etkilenen bebeklerde gelişme geriliği ve renk solukluğu görülür. Aynı zamanda; beslenme problemleri, ishal, tekrarlayan ateş nöbetleri ve dalak genişlemesi sebebiyle meydana gelen karın büyümesi görülebilir (56).

Kaynakların yetersizliği nedeniyle tedavi edilemeyen veya transfüzyonun yetersiz yapıldığı bireylerde, TM'un klinik tablosu; büyüme geriliği, solukluk, sarılık, kas sisteminde zayıflık, çarpık bacaklık, hepatosplenomegali, bacak ülseri ve kemik iliğinin genişlemesinden kaynaklanan iskelet değişiklikleridir. Bu iskelet değişiklikleri; bacakların uzun kemiklerinin deformitesini ve osteoporozu içerir. Kan transfüzyonu yetersiz bireyler, genellikle kalp yetmezliğinden ölürlür. Hb değerini minimum 9-10,5 gr/dl de tutan düzenli bir transfüzyon programı başlatılırsa, etkisiz eritropoez engellenir. Büyüme ve gelişme 10-12 yaşlarında normale döner. Bununla birlikte, düzenli transfüzyon alan hastalar, şelasyon tedavisine uygun olarak, aşırı demir yüküne bağlı komplikasyonlar geliştirebilirler. Çocuklarda aşırı demir yükü komplikasyonları arasında, büyüme geriliği ve cinsel olgunlaşmada başarısızlık görülür. Erişkinlerde ise karaciğer fibrozu ve sirozu, diyabet ayrıca paratiroid, tiroid, hipofiz ve daha az yaygın olarak adrenal bezlerin yetersizliği görülür (49).

Diğer komplikasyonlar hipersplenizm, kronik hepatit (hepatit B ve/veya hepatit C'ye neden olan virüslerin enfeksiyonu kaynaklı), siroz (aşırı demir yükü ve kronik hepatit kaynaklı), HIV enfeksiyonu ve venöz trombozdur (49,56).

2.1.5.2.2.4.1. Talasemi Majorde Klinik Tanı

TM'den genellikle, <2 yaşında bir bebekte şiddetli mikrositik anemi, hafif sarılık ve hepatosplenomegali varlığı ile şüphelenilir (49).

2.1.5.2.2.4.2. Talasemi Majorde Hematolojik Tanı

Mikrositik aneminin görüldüğü TM de Hb<7 gr/dl, ortalama korpüsküler hacim (MCV)>50<70 fl ve ortalama korpüsküler Hb (MCH)>12<20 pg dir.

Periferik yaymada görülen morfolojik değişiklikler; mikrositoz, hipokromi, anizositoz, poikilositoz (spiküle gözyaşı damlası ve elonge hücreler) ve eritroblastlardır. Eritroblast sayısı, anemi derecesi ile ilişkilidir ve splenektomiden sonra belirgin şekilde artmaktadır.

2.1.5.2.2.4.3. Talasemi Majorde Tedavi

1- Transfüzyon

Transfüzyon uygulamasındaki amaç; aneminin düzeltilmesi, etkisiz eritropoezin baskılanması, artmış gastrointestinal demir emiliminin inhibisyonu ve buna bağlı gelişen kemik ve kalpteki yan etkileri önlemektir (56,57).

TM için önerilen güncel kan transfüzyon rejimi, transfüzyon öncesi Hb seviyesini 9–10,5 gr/dl'nin üzerinde tutmak için 2–5 haftada bir şeklindedir. Bu rejim, transfüzyonel demir birikimini en aza indirir. Kan hacminin hızlı artışından kaçınmak için transfüzyon hızı, saatte 5 ml/kg'lık bir hızda damar içine verilecek şekilde, günde 15 ila 20 ml/kg'ı geçmemelidir (56).

2- Splenektomi

Splenektomi, operasyon sonrasında ortaya çıkabilecek yan etkiler nedeniyle, sadece birkaç durumda uygulanabilmektedir. <5 yaş çocuklarda uygulanması önerilmez iken, yıllık eritrosit transfüzyon ihtiyacı; >200-250 ml/kg ve >5 yaş çocuklara splenektomi önerilir (56).

3- Aşırı Demir Yükünün Tedavisi

Aşırı demir yüklenmesi, düzenli transfüzyonların kaçınılmaz bir sonucudur, çünkü insan vücudunda aşırı demiri atmak için bir mekanizma yoktur. Bununla birlikte,

demir şelasyonu; vücuttan fazla demirin alınması sağlanır iken; kalp yetmezliği, siroz ve büyüme geriliği gibi transfüzyonel hemosideroz ile ilgili en yaygın komplikasyonlar da önlenmektedir (56).

Deferoksamin (DFO), deferipron (DFP) ve defasiroks (DFX), vücuttan aşırı demir yükünün alınması amacıyla kullanılan demir şelatörlerindendir (12,13,56,58,59).

4- Kemik İliği Transplantasyonu (KİT):

Yaşı küçük olup (<17) insan lökosit antijen (HLA) uygun donörü olan, hepatomegali ve karaciğer fibrozisi olmayan ve iyi şelasyon alan hastalarda transplantasyonun %90'dan fazla vakada başarılı olduğu bildirilmiştir (56,60).

2.1.5.2.3. Hb Anomalileri ile İlişkili Beta-Talasemiler

2.1.5.2.3.1. HbE/β-talasemi:

Yapısal değişken hemoglobin E ile β-talasemi etkileşimi, farklı talasemi fenotiplerine yol açar. Ortaya çıkan bu klinik formlar; yaşa, aneminin derecesine ve semptomların ciddiyetine bağlı olarak üç kategoride tanımlanabilir (4, 49). Hafif, orta ve şiddetli olarak sınıflandırılır; şiddetli formu, TM'e benzerlik gösterirken, hafif ve orta formlar TI'ya benzerlik gösterir (4).

- Hafif HbE/β-talasemi: Bu hastalarda Hb seviyeleri, 9-12 gr/dl dir ve genellikle klinik normaldir. Herhangi bir tedavi gerekmez.
- Orta derecede şiddetli HbE/β-talasemi: HbE/β-talasemi vakalarının çoğu bu kategoriye girer. Hb seviyeleri 6-7 gr/dl dir ve klinik semptomları TI'ya benzerdir. Enfeksiyon, daha fazla anemiye neden olmadıkça transfüzyon gerekmez. Aşırı demir yüklenmesi oluşabilir.
- Ağır HbE/β-talasemi: Hb seviyesi 4-5 gr/dl kadar düşük olabilir. Bu gruptaki hastalar TM'e benzer semptomlar gösterir ve aynı tedavi protokolü uygulanır.

2.1.5.2.3.2. HbC/β-talasemi:

Hastalar asemptomatiktir ve teşhisleri ancak rutin testler sırasında konulur. Klinik bulgular; anemi ve dalağın genişlemesi olabilir. Kan transfüzyonu nadiren gereklidir. Her durumda mikrositoz ve hipokromi görülür. Periferik yaymaları; düz paralel kenarlara, hedef hücrelere ve mikrositoz gibi düzensiz hücrelere sahip farklı HbC kristalleri gösterir (49).

2.1.5.2.3.3. HbS/ β -talasemi:

Orak hücre geninin β -talasemi alleli ile birlikte kalıtımı söz konusudur ve bu hastalar orak hücre anemisine benzeyen bir hastalığa sahiptirler. Kan transfüzyonu gerektirmezler (49,61).

2.2. Çinko (Zn)

Zn; yeryüzünde en bol bulunan elementlerden biridir ve sahip olduğu kimyasal özellikler sayesinde, biyolojik sistemlerde önemli ve yararlı etkileri vardır.

İnsan organizması için esansiyel olarak kabul edilen çinkonun biyolojik gerekliliği ilk olarak 1869'da Raulin tarafından "Aspergillus Niger" adlı siyah ekmek mantarında tanımlanmıştır. Bu araştırmacı, çinkonun büyüme için gerekli bir element olduğunu göstermiştir. 1934'de Todd ve ark. tarafından çinkonun sıçan büyümesi için gerekli olduğu bildirilmiştir (7,8). Çinkonun insan sağlığı için önemi ilk kez 1963'de belgelenmiştir (7).

Çinko eksikliğinin klinik önemi, ilk kez Prasad ve ark. tarafından gözlenmiş ve bunu izleyen çalışmalarda, gelişme geriliği, anemi ve seksüel gelişme geriliği (hipogonadizm) ile çinko eksikliği arasında yakın ilişki olduğu gösterilmiştir (62).

2.2.1. Çinko Metabolizması

Çinko; mavimsi-beyaz renktedir, atom numarası 30, atom ağırlığı 65,4'tür. "Zn" ile sembolendirilen ve periyodik tabloda 2. grupta yer alan iki değerli bir metaldir. Hem organik hem de inorganik bileşiklerle reaksiyona girebilir ayrıca asidik solüsyonlarda çözünebilir (63).

Yetişkin bir insanda ortalama 2-3 gr çinko bulunmaktadır. Zn, esas olarak kas, kemik, karaciğer, prostat, semen, böbrek, retina, beyinde hipokampus ve eritrositlerde yer almak üzere çeşitli organ, doku ve vücut sıvılarında bulunur. Bunun %60-90'ı çizgili kas, karaciğer ve kemikte, %1-2'si beyinde geriye kalanı da diğer dokularda bulunur. Fizyolojik olarak, organizmadaki toplam çinkonun yaklaşık %98'i hücre içinde bulunur (64).

Tam kanda 900 $\mu\text{g/dl}$ kadar çinko bulunmaktadır. Bunun %85'i eritrositlerde, %3'ü lökositlerde, %1'i trombositlerde, geri kalan kısmı da plazmada bulunmaktadır. Plazmada ortalama 80-120 $\mu\text{g/dl}$ çinko bulunur. Plazmadaki çinkonun %80'i albumine ve %15'i makroglobuline bağlı olarak bulunur. Transferrin, seruloplasmin, haptoglobulin ve gamma globuline de bağlanır. Ayrıca, amino asitlerden histidin, glutamin, threonin,

sistein ve lisin en çok çinko bağlayanlardır (7,64). Eritrositlerde Zn konsantrasyonu; $40,67 \pm 3,6 \mu\text{g}/\text{gr Hb}$ dir (7,65).

Vücutta çinko seviyesinin saptanmasında plazma veya serum çinko düzeylerinin ölçümü, eritrosit çinko düzeylerinin ölçümü, saç ve 24 saatlik idrarda çinko düzeylerinin tayini yöntemleri kullanılmaktadır (65).

Plazma çinko düzeyinin alt sınırı; 60–70 $\mu\text{g}/\text{dl}$ kabul edilmektedir. Çinko düzeyinin, bu değerlerin altında bulunması ile çinko eksikliği tanısı konunabilir (66).

2.2.2. Günlük Gereksinim ve Çinkonun Besinlerdeki Dağılımı

Çinko için günlük alınması tavsiye edilen miktar; yenidoğan, bebek ve çocuklarda 3-10 mg, yetişkinlerde 10-15 mg dır (7).

Çinko, oldukça fazla besinde bulunur. Kırmızı et, tavuk, balık, deniz ürünleri, tüm tahıllar ve süt ürünleri; çinko için ana besin kaynaklarıdır. Beslenmedeki çinkonun kalitesi, elde edildiği kaynağa ve biyoyararlılığına göre değişmektedir. Tablo 2.1’de çeşitli gıdalarda, yaygın tüketim porsiyonlarına göre çinko içerikleri gösterilmektedir.

Tablo 2.1: Çeşitli gıdalarda, yaygın tüketim porsiyonlarına göre çinko içerikleri (ons: bir kağıt bardak kadar) (7,67)

Gıda	Porsiyon	Çinko miktarı (mg)
Balık, tavuk eti, kabuklu deniz ürünü (yengeç ve istiridye hariç)	3 ons	<2.0
Tavuk karaciğeri, koyu renkli tavuk eti	3 ons	2.0-3.0
Domuz, dana eti, yengeç ve koyu renkli hindi eti	3 ons	3.0-4.0
%77 yağsız kıyma		
İstiridye	3 ons	>5.0
Bütün yumurta	1 adet	0.5
Fıstık ezmesi	2 yemek kaşığı	0.9
Kuru fasulye, mercimek, nohut, ayıklanmış bezelye (haşlanmış, süzölmüş)	1/2 fincan	0.9-1.0
Börölce (haşlanmış, süzölmüş)	1/2 fincan	1.5
Tam yağlı süt	1 fincan	0.9
Evapore süt	1/2 fincan	1.0
Yağsız süt tozu	1/3 fincan	1.0
Dondurma	1 1/2 fincan	1.0
Kaşar peyniri	3 dilim (1 1/2 ons)	1.6
Pişmiş yulaf ezmesi	1 fincan	1.2
Pişmiş kepekli tahıl	1 fincan	1.2
Buğday gevreği	1 ons	0.6
Kepek gevreği, %40	1 ons	1
Kavrulmuş buğday tohumu	2 yemek kaşığı	0.9
Mısır gevreği	1 ons	0.08
Pişmiş mısır unu	1 fincan	0.3
Buğday ekmeği	1 dilim	0.2
Tam buğday ekmeği	1 dilim	0.5
Pişmiş esmer pirinç, sıcak	1 fincan	1.2
Pişmiş beyaz pirinç, sıcak	1 fincan	0.8
Ön pişirme uygulanmış beyaz pirinç, sıcak	1 fincan	0.4

2.2.3. Çinkonun Emilim, Taşınma ve Atılımı

Ağız yoluyla alınan çinkonun yaklaşık olarak %30'u, duodenum ve proksimal jejunum olmak üzere bağırsaklardan emilir. Hayvansal proteinlerden gelen çinko daha iyi emilmektedir (7,67).

Tahıl ve bitkilerde bulunan fitat, çinkonun emiliminin olumsuz yönde etkilenmesine ve biyoyararlılığının düşmesine neden olmaktadır. Fitattan başka; fosfat, karbonat, tannat, oksalat ve polifenollerin diyetle bulunması emilimi zorlaştırırken, karboksilik asit, glikoz, histidin ve sistein gibi aminoasitler, B6 ve D vitamini ve yağ asitlerinin bulunması emilimi kolaylaştırır (64,67). Ayrıca, bir gıdanın içerdiği demir miktarının çinko miktarından fazla olması, çinko emilimini negatif yönde etkilemektedir (7,67).

Çinko, ince bağırsak mukozası fırçamsı kenar epitelinden taşıyıcı aracılığıyla aktif taşınma ile emilmektedir (7). Emilme işlemi gerçekleşmeden önce çinkonun, aminoasit ve nükleik asitlerden ayrışması gerekmektedir. Çinkonun sindirim esnasında muhtemelen mide ve ince bağırsaktaki proteaz ve nükleaz enzimleri tarafından besinlerden ayrıştırıldığına inanılmaktadır (68). Mukozal hücreye alım, bağırsak lümeninde ve zar taşıyıcısında çinko bağlayıcı ligandların çinko bağlama afinitesine bağlıdır. Bu ligandların bazıları (örn. histidin) diyetle kökenlidir ancak metalotiyonin gibi diğer ligandlar ekzojen kökenlidir. İntestinal hücreye girdikten sonra çinko, metalotiyonin ve diğer proteinlerle ilişkili hale gelir (7).

Metalotiyonin, çinko için önemli bir ligandır. Küçük bir protein olan metalotiyonin, hücre içi sitosolik bir moleküldür ancak plazma ve idrar gibi hücre dışı sıvılarda da bulunabilir. Metalotiyonin, yüksek miktarda sistein içerir ve proteinin her bir molü başına 7 mol çinko bağlar. Bu proteinin normal işlevi henüz tam açıklanmamakla birlikte serbest radikal temizleyicisi olabileceği düşünülmektedir (7,69).

Çinko, mukozal hücrelerden emilip hücrelere girdikten sonra, bu hücreler çinkoyu kendi metabolizmalarında kullanabilir ya da çinko kana geçip transferine bağlı olarak karaciğer başta olmak üzere pankreas, böbrek, dalak ve vücudun diğer bölümlerine gönderilir. Kemikler ve sinir sistemi tarafından çinko alımı daha yavaş olmaktadır (70).

Çinkonun biyolojik yarılanma ömrü 250 gün–1 yıldır. Vücuttan atımı bağırsaklar başta olmak üzere böbrek ve ter ile olmaktadır. Normal idrarla 0,5 mg/gün, terle 0,5 mg/gün ve bağırsak yoluyla 2-3 mg/gün çinko kaybı olmaktadır (64,71).

2.2.4. Çinkonun Biyokimyasal ve Fizyolojik Rolü

Çinko insan vücudunda demirden sonra en çok bulunan ikinci eser elementtir ve yaklaşık 300 enzimin optimum fonksiyonu için gereklidir. Bu enzimlerde bulunan çinko; katalitik fonksiyonlara katılma, yapısal bütünlüğü sürdürme gibi fonksiyonları gerçekleştirmektedir (67,72).

Çinko metaloenzimler, ana endojen bileşik sınıflarının her birinin (karbonhidrat, protein, lipit ...) yapımında veya hidrolizinde rol alır ve bundan dolayı vücutta bir çok reaksiyonun katalize edilmesinde etkindir. Çinko metaloenzimlerin başlıcaları olarak karbonik anhidraz, alkalin fosfataz, alkol dehidrogenaz ve karboksipeptidazlar gibi enzimler sayılabilir. Çinkonun bu enzimlere yapısal bütünlük sağladığı düşünülmektedir (7,73).

Çinko, DNA'ya bağlanmada belirleyici olan çinko parmak, *çinko - twist* veya *çinko - cluster* gibi birçok düzenleyici protein ve hormon reseptörünün doğru kuaterner yapısını oluşturmak için gereklidir. DNA sentezinin düzenlenmesini sağlayan çinko, DNA'ya bağlanarak, transkripsiyon ve gen ekspresyonunu başlatmaktadır (72,74).

Son yıllarda çinko metabolizmasında sorumlu olduğu düşünülen bazı insan genleri saptanmıştır. Bu genler; Metalotiyoninler, ZNT4 (SLC30A4), ZIP gen ailesi ve çinko parmak proteindir (75).

Çinko parmak protein, transkripsiyonda görevli olan TF-IIIa (transkripsiyon faktör IIIa)'da çinkonun yerleştiği bölgedir. DNA çift heliksinin büyük oluğuna yerleşir ve DNA bazları ile temasa geçer. Nükleik asitler ve diğer regülatör proteinlerde yapısal olarak görev alır. Nükleik asit polimeraz ve süperoksit dismutazın yapısında yer alır. DNA'da özgün bağlanma bölgesine bağlanarak gen regülasyonunda görev alır. Çinkonun, hormonların reseptörleri ile bağlanma etkileşiminde de rolü vardır (7,75).

Çinkonun bir diğer özelliği de, biyolojik membranların ve iyon kanallarının bütünlüğünü korumaktır. Çinko, kalsiyumu doğal bağlanma yerinden başka bir yere taşıyabilir ve kalsiyum bağımlı hücre süreçlerini değiştirebilir (7,72,75).

Çinko, biyolojik sistemlerde in vitro koşullar altında, makromoleküllerin sülfidril grupları ile etkileşime girerek antioksidan olarak hareket edebilir, böylece oksidasyonlarını inhibe edebilir. Bakır ve demir gibi metallerle, membran üzerindeki bağlanma bölgeleri için rekabet ederek elektron transfer yeteneklerini azaltır. Çinkonun in vivo kaynaklı antioksidan etki mekanizmalarından biri de, bir serbest radikal süpürücüsü olan metalotiyoninin uyarılmasıdır (7,72,74,75).

Hem hücre büyümesi hem de sitokinez, hücresel çinko içeriğine ve bunun hücre içinde taşınmasına bağlıdır. Büyüme ve gelişme üzerine etkili bir eser elementtir (7,8,72).

Çinko, bağışıklık sisteminin birçok yönünü de etkiler. Doğal immünite, nötrofil ve doğal öldürücü (NK-*natural killer*) hücrelerin gelişimi ve fonksiyonu için önemlidir. Makrofajlar, fagositoz ve sitokin üretimi, T ve B hücrelerinin büyümesi ve işlevi de çinko eksikliğinden etkilenir (8,67).

2.2.5. Çinko Eksikliği

Son 40 yıldır insanlarda, çinko eksikliğinin oldukça yaygın ve ciddi bir sorun olduğu anlaşılmıştır (8).

Çinko eksikliği görülmesinin en önemli nedeni, beslenmede mineralleri bağlayan fitat bakımından zengin tahılların yüksek miktarlarda tüketilmesidir (7). Çinko eksikliğinin diğer nedenleri ise; yağ bezlerinde salgı artışı/yağlı dışkı ve enterit gibi bağırsaktan anormal kayıplar, karaciğer hastalıkları, kronik böbrek hastalığı, orak hücreli anemi, malabsorbsiyon (emilim bozukluğu) sendromları ve uzun süre parenteral beslenme gibi patolojik nedenler, alkolizm, diüretiklerle zorlanan fazla idrar çıkarılması ve sıcak ortamda fazla terleme ile olan kayıplar olabilir (7,8,64,75).

2.2.5.1. Çinko Eksikliğinin Klinik Belirtileri

Çinko eksikliğinin klinik belirtileri hafif ila şiddetli arasında değişen bir spektrum sergiler ve düzeltilmediği takdirde ölümcül olabilir.

Ağır çinko eksikliği olan kişilerin klinik belirtileri arasında; büllöz püstüler dermatit, diyare, alopesi, zihinsel bozukluklar ve immün bozukluklara bağlı enfeksiyonlar bulunur. Bu ciddi bulgular, doğuştan çinko emilimine bağlı ikincil akrodermatit enteropatika hastalarında, çinkosuz total parenteral beslenme alan hastalarda ve penisillamin tedavisi alan hastalarda görülür. Büyüme geriliği, erkek hipogonadizmi, cilt değişiklikleri, iştahsızlık, zihinsel uyuşukluk, anormal karanlık adaptasyon ve gecikmiş yara iyileşmesi; orta derecede çinko eksikliğinin olağan belirtileridir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, insanlarda çinkoda hafif bir eksikliğin; nörosensoryel değişiklikler, erkeklerde oligospermi (normalden az sperm sayısı) ve serum testosteron azalması, hiperammonemi (kanda amonyak düzeyinin artması), serum timin aktivitesinde azalma, IL-2 üretiminde azalma ve NK hücre aktivitesinde azalma gibi bulgular ile karakterize edildiğini göstermiştir (7,8,76).

2.3. Talasemi ve Çinko

Talasemi sendromlarının homozigot olduğu tipleri, ciddi anemi ile sonuçlandığından düzenli kan transfüzyonu gerektirir. Bu tür tedaviler, hastanın ömrünü arttırsa da, vücutta aşırı demir yüklenmesi, insan vücudunda aşırı demiri atmak için özel bir mekanizma olmaması nedeniyle; endokrin, metabolik, iskelet ve büyüme bozuklukları gibi çeşitli komplikasyonlar gelişmesi ile sonuçlanır. Bununla birlikte, demir şelasyonu ile aşırı demir yükü azaltılabileceği gibi kalp yetmezliği, siroz ve büyüme geriliği gibi transfüzyona bağlı komplikasyonlar önlenabilmektedir (56,77). TM hastalarında kullanılan DFP ve DFO gibi şelatörler, demir şelasyonu yanında çinko gibi metalik iyonların da şelasyonuna neden olabilmektedir (12,13,78).

TM hastalarında demir şelasyon tedavisine bağlı olarak görülen idrarla fazla Zn atılımı (hiperzinküri); yüksek ferritin seviyeleri, karaciğer bozuklukları ve Zn emilim bozuklukları gibi çok faktörlü nedenlerden kaynaklanabilir (9).

Çinkonun talasemi ile ilişkisi, çeşitli çalışmalarla gösterilmiş ve bu çalışmalarda, talasemi sendromlu hastaların serum çinko seviyelerinin, sağlıklı kontrol grubuna göre düşük olduğu görülmüştür (9,10,12). Bu, demir şelatörlerinin demire ek olarak idrarla çinko atımı eğilimini artırması ve besinsel alımın yetersizliği ile açıklanabilir (10,12). Aynı zamanda bu çinko seviyesi düşüklüğünün, çinko takviyesi ile tersine çevrilebileceği düşünülmüştür (10).

TM hastalarında hiperzinküri ve diyet ile çinkonun az alınması gibi sebeplerle kronik çinko eksikliği söz konusudur (10,12). Bunun sonucunda sekonder olarak gelişen, endokrin komplikasyonlar görülmektedir.

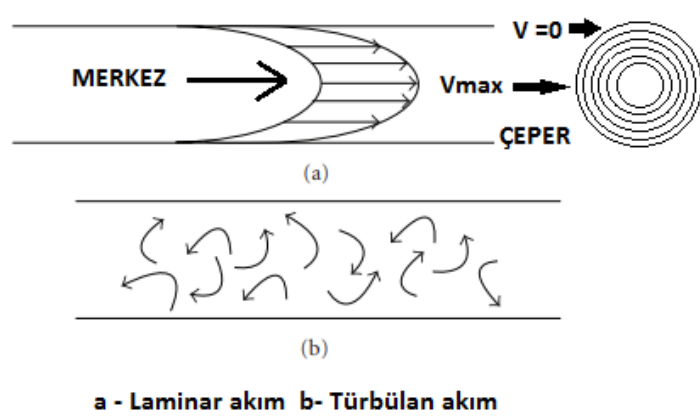
Büyüme geriliği de düzenli transfüzyon tedavisi ile birlikte demir şelasyon tedavisi alan TM hastalarının önemli bir komplikasyonudur. Büyüme geriliği aynı zamanda, çinko eksikliğinin de bir klinik komplikasyonudur (10). Arcasoy ve ark. tarafından yapılan bir çalışma, çinko eksikliğinin TM de görülen doğrusal büyüme geriliğinden sorumlu faktörlerden biri olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak da, çinko takviyesinin hastaların doğrusal büyümesini olumlu yönde etkilediğini bildirmişlerdir (10,79).

Talasemili hastalarda görülen bir endokrin komplikasyon olan osteoporoz, düşük kemik kütlesi ve kemik dokusunun mikro-mimarisinin bozulması ile sonuçlanan ve kemiklerde kırılmaya yatkınlık ile karakterize, sistemik bir iskelet hastalığıdır. β -talasemili kişilerde osteoporozu tedavi etmek için bir dizi tedavi stratejisi uygulanmıştır.

çeperi ile aralarındaki sürtünme kuvveti nedeniyle daha zor hareket etmesidir (15,38). Laminar akımda oluşan hız profili paraboliktir. Sıvının akım hızı arttırıldığında, akım karakteristiğinin düzensizleştiği ve girdaplı bir hale geldiği gözlenir. Bu tipteki akıma türbülans akım adı verilir. Akım hızı arttıkça türbülansın derecesi de artar (15,85). Bu türbülans akım koşulları altında, akıma karşı olan direnç, laminar akımdan büyüktür (15).

2.4.1.1.Viskozite:

Şekil 2.5’de görüldüğü gibi, laminar akım koşulları altında, sıvıların akışkanlığını tanımlamak için *shear stress/shear rate* ilişkisi kullanılır. Bu ilişki; akışkan tabakalar (laminalar) arasındaki iç direnci yani akışkanın viskozitesini yansıtır. Böylece; bir sıvının viskozitesi; *shear stress*: bir sıvı tabakasının komşu sıvı tabakası üzerinde, yüzeye paralel olarak (teğet) hareket etmesini sağlayan, birim alan başına etki eden kuvvetin (kayma kuvveti), *shear rate*; iki komşu sıvı tabakası arasındaki hız farkının bu tabakaların arasındaki uzaklığa bölünmesi ile elde edilen, bu tabakaların ilerleyici bir şekilde birbirine paralel olarak hareket ettiği, hız gradyanına (kayma hızı) oranı olarak tanımlanır (15,81,84).



Şekil 2.5: Laminar ve türbülans akımda hız profili (86)

Sıvılar reolojik açıdan; Newton tipi olan (Newtonian) ve Newton tipi olmayan (Non-newtonian) sıvılar olmak üzere 2 gruba ayrılır.

Newtonian bir sıvının viskozitesi, sabit bir sıcaklık ve basınçta kayma kuvveti ve kayma hızından bağımsızdır. Bu sıvılar için kayma kuvveti ve kayma hızı arasındaki eğim sabittir ve böylece viskozite de sabit olur. Örn. su ve plazma Newtoniandır.

Non-Newtonian sıvılarda sıvı viskozitesi sabit değildir ve kayma hızına bağlı olarak değişir. Sıvının cinsine göre de kayma hızı artıkça viskozite azalır (*shear-thinning*) veya artar (*shear-thickening*). Non-Newtonian sıvılar, sınırlı bir stresin olduğu, ancak kayma hızının sıfır (akızsız) olduğu, belirli bir viskozite için sonsuz bir değerle sonuçlanan “*yield stress*”e sahip olabilirler (87). Kan; ‘Non-Newtonian/*shear-thinning*’ özellik gösteren bir sıvıdır, yani viskozitesi, kayma hızı artıkça azalır. Ayrıca, sıvıların her iki sınıfı için viskozite sıcaklığa bağlıdır. Çoğu sıvıların viskozitesi artan sıcaklıkla birlikte azalmaktadır (15,81).

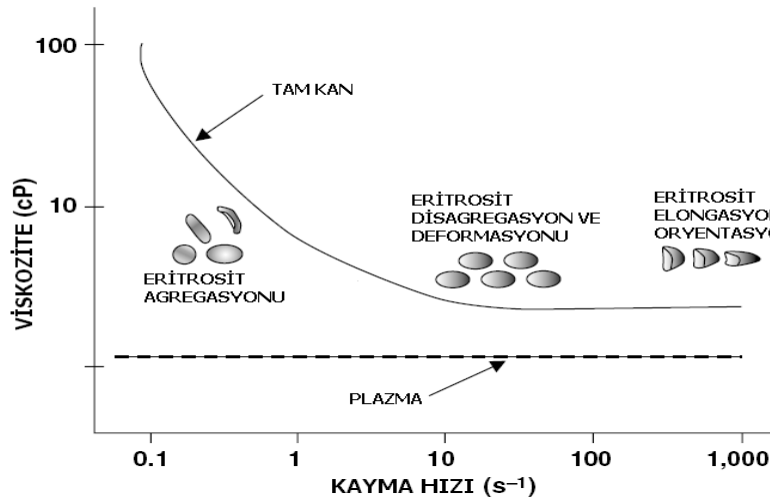
Viskozite için birçok birim kullanılabilir, en yaygın olarak centipoise (cP) 'ye eşit olan millipascals.sec (mPa.sec) kullanılır. 20°C'deki su, 1 mPa.sec veya 1 cP'lik bir viskoziteye sahiptir. Aynı zamanda, 1 resiprok saniye (1 s^{-1}) *shear rate* oluşturmak için 1 dyn/cm² *shear stress* gereken bir madde, 1 poise (P) viskoziteye sahiptir (15).

2.4.1.2. Kayma Hızı-Viskozite İlişkisi:

Yüksek kayma hızlarında kan, çapı ≥ 3 mm den büyük arterlere özgü bir akış düzeninde, yüksek hızda hareket ettiği zaman daha az visköz olur ve eritrositler dağılır. Burada, tam kan viskozitesi suyun yaklaşık 3-5 katıdır ve eritrositler akış direncini azaltmak için eliptik şekle deforme (eritrosit deformabilitesi) olurlar (18,88,89).

Düşük kayma hızlarında ise kan, daha yavaş hareket eder ve eritrositler para dizisi şeklinde kümeleşmeye (eritrosit agregasyonu) başlar. Bu durumda kan daha visköz hale gelir. Bazen makromoleküllerin artması nedeniyle artan eritrosit agregasyonu sonucu tam kan viskozitesi suyun 20–30 katına çıkabilir (88). Eritrosit agregasyonu, normal koşullarda geri dönüşümlüdür (18).

Kayma hızı ile kan viskozitesi arasındaki ilişki Şekil 2.7’de gösterilmiştir. Viskozite değişimleri, yüksek kayma hızlarında eritrosit deformabilitesi ile ilişkili iken, düşük kayma hızlarında eritrosit agregasyonu ile ilişkilidir (84,89,90).



Şekil 2.7: Normal kanda kayma hızı-viskozite eğrisi (90)

Şekil 2.7’de görüldüğü gibi kan viskozitesi için yaklaşık değerler; $0,1 \text{ sn}^{-1}$ de 100 cP iken 1 sn^{-1} de 9-10 cP’dir. $100\text{-}200 \text{ sn}^{-1}$ üzerindeki yüksek kayma hızlarında, 37°C ’de ölçülen normal kanın viskozitesi yaklaşık 4-5 cP’dir, daha yüksek kayma hızlarında viskozite sabit kalır. Bununla birlikte viskozite, 100 sn^{-1} ’nin altındaki kayma hızlarına karşı daha hassastır ve kayma hızı azaldıkça viskozite artışı da katlanarak artar (14,15,81,87,91).

2.4.2. Kan Akımı ve Özellikleri

Kan akımı, dolaşımın belli bir noktasından belirli bir sürede geçen kan miktarıdır. Uygun doku/organ fonksiyonunun sürdürülebilmesi, yeterli kan akışına bağlıdır. “Yeterlilik” sadece kararlı bir durumu belirtmez, aynı zamanda belirli bir dokuya olan talebi karşılayabilme yeteneğidir. Dokulara yeterli düzeyde kan akımı sağlanması; kalbin pompalama gücüne, damar yapısına ve kanın akışkanlık özelliklerine bağlıdır (92).

Ohm yasasına göre; damar sisteminde kan akışı; basınç farkı (yani perfüzyon basıncı), kan damarlarının hidrolük iletkenliği ve kan akışkanlığı ile belirlenir. Son iki faktör, bir direnç parametresi (R) olarak birleştirildiğinde; aralarındaki ilişki aşağıdaki formül ile ifade edilebilir:

$$Q = \frac{\Delta P}{R}$$

Q: Kan akımı
 ΔP : Damarın iki ucu arasındaki basınç farkı
 R: Direnç

$\Delta P = Q \times R$ ilişkisi vardır.

Başka bir deyişle, belirli bir perfüzyon basıncı altındaki kan akışı, hidrolik dirençle ters orantılıdır. Belirli bir dokuya yeterli kan akışı, yeterli bir basınç gradyanının korunmasını gerektirir (91,92).

Poiseuille yasasına göre; kan akımı, damar yarıçapının dördüncü kuvveti ile doğru, damar uzunluğu ve kan viskozitesi ile ters orantılıdır (81).

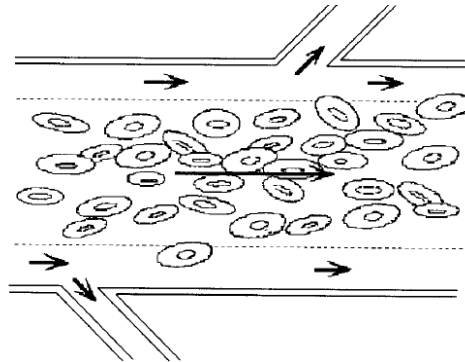
$$Q = \frac{\Delta P \cdot \pi \cdot r^4}{8 \cdot L \cdot \eta}$$

Q= Kan akımı
 ΔP =Damarın iki ucu
arasındaki basınç farkı
r=Damarın yarıçapı
L=Damarın uzunluğu
 η =Viskozite

Poiseuille Yasası

20. yüzyılın başlarında akışkan dinamiği üzerine yapılan çalışmalarda, kılcal boruların içinden akan kanın viskozitesinin, boru çapı küçüldükçe azaldığı (*Fahraeus-Lindqvist etkisi*), 6-8 μm civarında minimum bir değere ulaştığı ancak çap daha da küçüldükçe keskin bir şekilde arttığı gösterilmiştir (15).

Şekil 2.8'de görüldüğü gibi; eritrositlerin akış sırasında damarın enine kesiti boyunca eşit olarak dağılmadığı, bunun yerine, aksenel göç olarak bilinen, merkezi bölgede tek sıra halinde birikme eğiliminde oldukları ve damarın çeperine yaklaştıkça hücreden fakir, plazma açısından zengin alanlar oluşturdukları bildirilmiştir. Bunun sonucunda hematokrit (Hct) merkezde en yüksek, periferde en düşüktür (*Fahraeus etkisi*) (15,93). Bu düşük Hct değeri, in vivo koşullarda kanın viskozitesini de düşürür. Aynı zamanda merkezde hız en yüksek iken, boru çeperinin yakınındaki kısımlarda en düşük seviyeye sahiptir (93).



Şekil 2.8: Damarın enine kesiti boyunca eritrositlerin akışı (15)

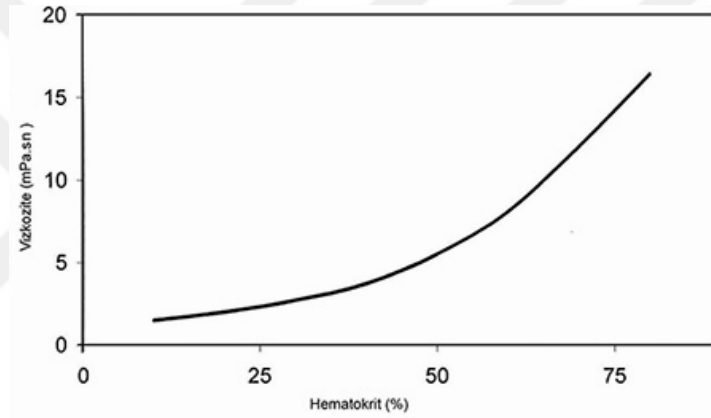
Kan akışı sırasında kan damarının merkezi bölgesinde eritrositler birikirken, yan dallar, plazma bakımından zengin, hücre bakımından fakir tabaka tarafından beslenir ve böylece doku hematokriti azalır.

2.4.3. Kanın akışkanlığını belirleyen faktörler

Kanın akışkanlığı; kan hücreleri ve plazmanın reolojik davranışlarının yanında Hct değerinden de etkilenir (15,94).

2.4.3.1. Hematokrit (Hct)

Laminar akım koşullarında, kanın akışkanlığını belirleyen faktörlerin başında hücresel elemanların oransal miktarı gelir. Hct, kanın şekilli elemanlarından biri olan eritrositlerin hacim yüzdesidir. Şekil 2.9'da görüldüğü gibi kan viskozitesi ile Hct arasında, %20-60 Hct değerlerinde etkisi daha az görülen, >%60 Hct değerlerinde ise etkisinin daha fazla olduğu logaritmik, doğrusal bir ilişki vardır (15).



Şekil 2.9: Kan viskozitesi üzerine %Hct etkisi (15)

2.4.3.2. Plazma viskozitesi

Plazma kandaki hücresel elemanlar için süspansiyon ortamı olarak görev yaptığından viskoziteyi; Hct ve hücresel elemanların özelliğinden bağımsız olarak etkiler (84).

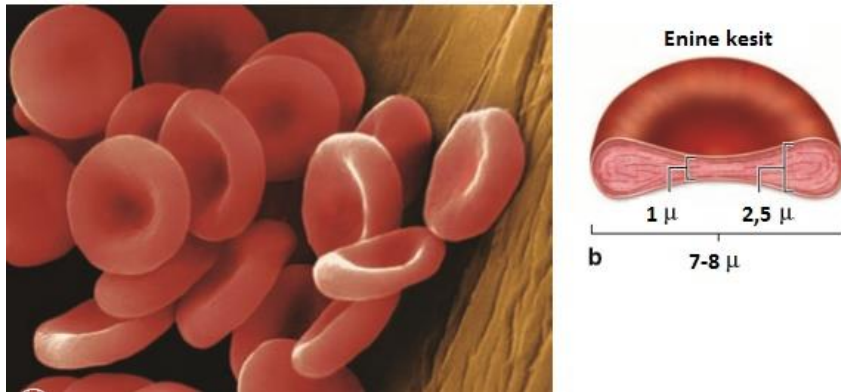
Fizyolojik koşullarda plazma viskozitesi 37°C'de 1,10-1,35 cP arasındadır. Plazma viskozitesindeki artış, herhangi bir Hct düzeyinde kan viskozitesinin artışına neden olur. Fibrinojen, gama globulin gibi akut faz reaktanlarının artışı plazma viskozitesinin hastalık sürecindeki artışında önemli ölçüde rol oynarlar. Plazma Newtonian bir sıvı olduğundan, viskozitesi kayma hızından bağımsızdır (15,95).

2.4.3.3. Eritrositler

Eritrositler, kanın hücresel elemanlarının büyük çoğunluğunu oluşturur (93). Eritrosit üretimi; kemik iliğindeki pluripotent kök hücrelerden kaynaklanan dinamik bir süreçtir ve böbrekler tarafından üretilen eritropoietinin (EPO) kontrolü altındadır. Dokulara taşınan oksijen miktarının azalmasına neden olan her koşul, eritrosit üretim hızını EPO'yu uyararak artırır. Eritrositler, başlangıçta çekirdekli olarak üretilir ve periferik dolaşıma katılmadan önce çekirdeklerini kaybettikleri için dolaşımdaki olgun eritrositlerin çekirdeği bulunmaz (39,96).

Eritrositlerin esas işlevi, dokulara oksijeni ileten Hb'i ve solunum gazlarını taşımaktır. Şekil 2.10'da görüldüğü gibi normal eritrositler, bikonkav disk şeklinde olup, ortalama çapları yaklaşık 7-8 μ m (mikronmetre)'dir. Kalınlıkları ise en kalın noktada 2,5 μ m, merkezde ise 1 μ m veya daha azdır. Hücrenin yüzey alanı 140 μ m², hacmi ise ortalama 90fl (femtolitire) kadardır (39).

Eritrositlerin bikonkav disk şeklinin korunması, fonksiyonel yönden çok önemlidir. Beş temel faktörün, bu özel şeklin korunmasında etkili olduğu ileri sürülmüştür. Bu faktörler; membran içindeki elastik kuvvetler, yüzey gerilimi, membran yüzeyindeki elektriksel kuvvetler, ozmotik ve hidrostatik basınçlar ve eritrosit membranı iç yüzeyindeki membran iskeletini oluşturan proteinler olarak sayılabilir (96-99).



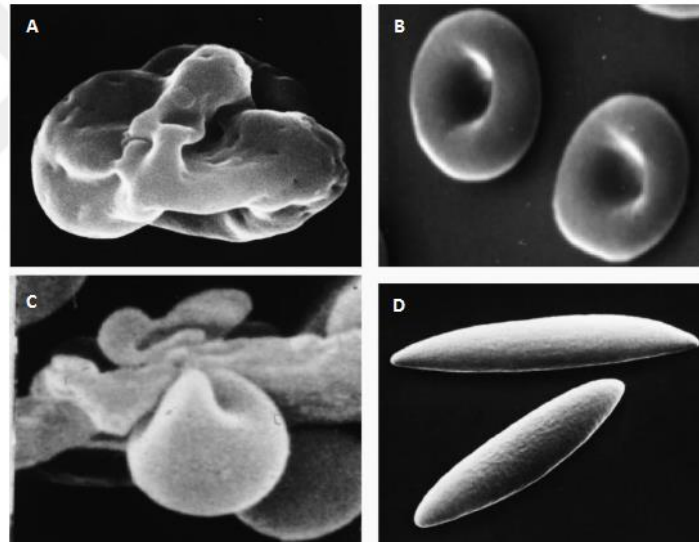
Şekil 2.10: Eritrositlerin üç boyutlu şekli ve bir eritrositin enine kesiti (100)

2.4.3.3.1. Eritrosit Deformabilitesi

Eritrosit deformabilitesi, kan akımı sırasında kendisine uygulanan kuvvetlere yanıt olarak, eritrositin tersinir olarak şekil değiştirebilme yeteneğidir. Bu şekil değiştirebilme yeteneği sayesinde 7-8 μ m çapındaki eritrositler, 2-3 μ m çapındaki

kapillerlerden geçebilirler. Bikonkav disk şeklinden uzaklaştıkça, eritrositlerin deformabilite yeteneği azalmaktadır (98,99). Şekil değişikliğinin miktarı; eritrositlerin hücresel özellikleri, onlara uygulanan kuvvetlere oryantasyonları ve bu oryantasyonun büyüklüğü tarafından belirlenir (15).

Şekil 2.11’de görüldüğü gibi, eritrositin diskoid şekli, ilk önce kemik iliğinde ve daha sonra dolaşımında 48 saatlik olgunlaşma sırasında, multilobülleşmiş retikülositten evrimleşir. Diskoid eritrositin önemli bir özelliği; damar sisteminin, kendi çapının üçte biri kadar dar kılcal kısımlarından, 120 günlük ömrü boyunca tekrarlanan geçişleri sırasında, pasif deformasyonlara uğramasıdır. Bu özellik en çok, in vivo olarak dalak sinüslerine geçişi sırasında görülürken, in vitro olarak da akışa bağlı deformasyon sırasında görülür. Deformabilitenin azalması ile birlikte anormal eritrositlerin splenik sekestrasyonu, birkaç hematolojik hastalıkta hemolitik anemi oluşmasına yol açar (97).



Şekil 2.11: Eritrosit olgunlaşma evreleri (97)

A- Multilobüler retikülosit, B- Olgun diskoid eritrosit, C- Splenik korddan splenik sinüse geçen bir eritrosit - Bu geçiş sırasında görünen belirli deformabilite, D- Akış sırasında oluşan deformabilite nedeniyle görülen elipsoid hücreler

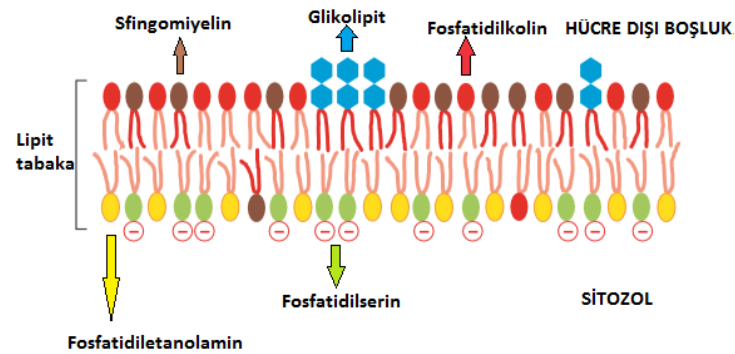
Eritrosit deformabilitesini; hücre membranının viskoelastisitesi, hücre geometrisi ve sitoplazmik viskozite belirlemektedir (97).

2.4.3.3.1.1. Hücre Membranının Viskoelastisitesi

Eritrosit membranının viskoelastisitesini temel olarak, membran iskeletinin yapısı ile membran proteinleri arasındaki ilişkiler belirler ve hücrenin dinamik mekanik yapısından sorumludur (101).

Şekil 2.12’de görüldüğü gibi, eritrosit membranı hidrofilik başları dışarıya, hidrofobik başları ise içeriye bakan, iki katlı fosfolipid tabakadan oluşmaktadır. Membranın bu iki katlı lipit tabakası, tamamen viskozdur ve eritrosit membranının elastik davranışına neredeyse hiç katkı yapmaz (15,97). İki katlı lipit tabaka, eşit oranlarda kolesterol ve fosfolipidlerden oluşur. Kolesterol, iki kat arasında eşit dağılırken, fosfolipidler asimetrik olarak yerleşmiştir. Fosfatidilkolin ve sfingomyelin ağırlıklı olarak dış tabakaya bağlanırken, çoğu fosfatidiletanolamin ve tüm fosfatidilserin (PS) ile küçük fosfatidilinositol bileşenleri, iç tabakaya bağlanır (97,102).

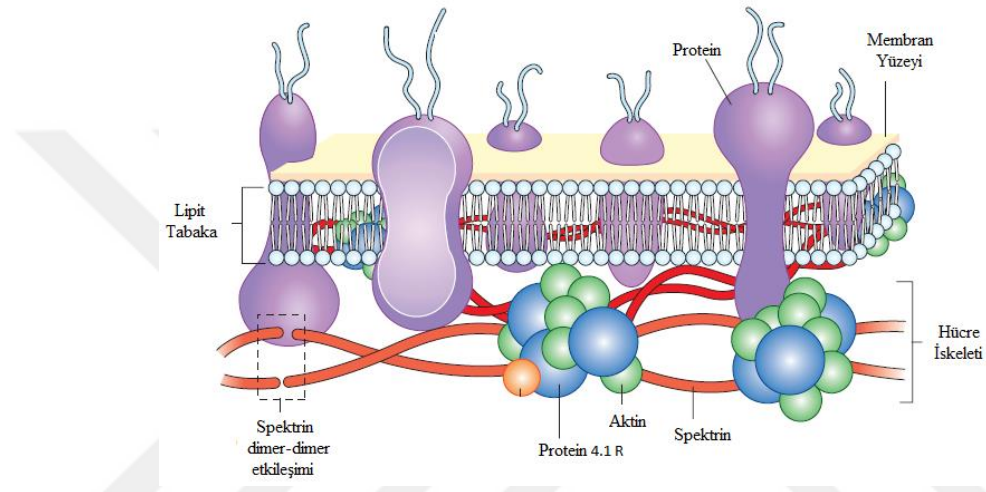
Şekil 2.13’de görüldüğü gibi, membrandaki lipit tabakanın altında; spektrin, ankrin, band 3 gibi proteinlerin hegzogonal dizildiği güçlü, esnek, daha az hareketli membran iskeleti vardır (103,104). Bu, eritrosit membran hücre iskeleti, esas olarak bikonkav-disk şeklinin korunmasından sorumludur (15,39,97,103,104). Spektrin proteini, eritrosit iskeletinde başrolü oynayan fibröz yapıdaki proteindir. Spektrin ağı, band 3 ve glikoforin gibi membran integral proteinlerine bağlanır. Spektrin, eritrosit membranında doğal hallerde katlanmış durumda bulunur. Kuvvet uygulandığı zaman kuvvetin yönüne göre bazı spektrin molekülleri açılıp uzarken bir kısmı büzülür ve bu, eritrositlerin şekil değiştirmesini sağlar (97,98,103,106). Eritrosit membranının mekanik stabilitesinin ana düzenleyicileri; spektrin dimer-dimer etkileşimi ve spektrin-aktin-protein 4.1R birleşme kompleksidir. Eritrositler dolaşımında yüksek kayma kuvvetleri ile karşılaştığında, membran parçalanmasının önlenmesinde kritik bir rol oynarlar (97).



Şekil 2.12: Eritrosit membranının şematik yapısı ve içerdiği lipitler (105)

2.4.3.3.1.2. Hücre Geometrisi (Yüzey Alanı-Hacim İlişkisi)

Normal eritrositlerin, bikonkav disk şekillerinden dolayı, hacimlerine göre daha büyük yüzey alanına sahip olmaları, onlara yüzey alanını genişletmeksizin şekil değiştirme (deformabilite) olanağı sağlar. Öte yandan, eritrosit hacminde bir değişiklik olmaksızın yüzey alanındaki % 3-4'lük bir artış, eritrositin parçalanmasına neden olur (98).



Şekil 2.13: Eritrosit membranının şematik yapısı ve içerdiği proteinler (96)

Membran yüzey alanının korunmasına, iki katlı lipit tabaka ile membran iskeleti arasındaki kuvvetli birleşme ve spektrin bazlı membran iskeleti aracılık eder. Hücre hacminin korunmasına da membranla ilişkili çeşitli iyon taşıyıcılar aracılık eder. Membrandaki bu kuvvetli birleşmenin azalması nedeniyle, membran vezikülleşmesinin bir sonucu olarak meydana gelen yüzey alanı kaybı veya membran mekanik stabilitesinin azalmasının bir sonucu olarak meydana gelen hücre parçalanması, ayrıca hatalı iyon taşıyıcılar nedeniyle hücre hacmindeki artış, eritrositin deformabilitesini bozar ve dolaşımdan erken ayrılmasına yol açar (97).

Eritrosit hacmi, ozmotik koşullara bağlı olarak da değişebilir (107). Eritrosit süspansiyon ortamının ozmotik basıncındaki artış, hücre yüzey alanı sabit olmak koşuluyla hem eritrosit hacminde azalmaya, hem de ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonunda (MCHC) artışa sebep olur. Yüksek ozmolaritede ayrıca Hb ile membran komponentleri arasında bir etkileşim meydana gelerek eritrosit deformabilitesi

azalabilir. Ozmolaritenin azalması ise, eritrosit hacminde artışa neden olarak deformabiliteyi zıt yönde etkiler (107,108).

2.4.3.3.1.3. Sitoplazmik Viskozite

Eritrosit membranının sitoplazmik viskozitesi esas olarak, sitoplazmanın önemli bir içeriği olan Hb konsantrasyonu tarafından belirlenir. Hb konsantrasyonunun, dolayısıyla sitoplazmik viskozitenin artması, eritrosit deformabilitesinin azalmasına neden olur (98). Aktif katyon pompaları, hem özel geometriyi hem de normal sitoplazmik viskoziteyi koruyarak eritrositlerin hücre içi hacmini kontrol eder (15,98,106).

2.4.3.3.1.4. Eritrosit Deformabilitesi Ölçme Yöntemleri

Eritrosit deformabilitesi; eritrositlerin kendi boyutlarından daha küçük çaplara sahip silindirik gözeneklerden geçişi izlenerek değerlendirilebilir. Bu değerlendirmede, eritrositlerin böyle gözeneklerden sabit bir basınçta taşınması için gereken zaman belirlenir ve bu sürenin uzaması, eritrosit deformabilitesinin azaldığını gösterir (15,109,110).

Eritrosit deformabilitesi, uygulanan kayma kuvvetlerinden kaynaklanan hücre şeklindeki değişikliklerinin doğrudan mikroskopik görüntülenmesi ile veya deforme hücreler tarafından üretilen lazer difraksiyon modellerinin analizi ile de ölçülebilir (15,111).

2.4.3.3.2. Eritrosit Agregasyonu

Eritrositler, plazma proteinleri (örn. fibrinojen) ya da büyük molekül ağırlıklı polimerler (örn. dekstran) içeren sulu çözeltiler içerisinde süspanse edildiğinde veya Şekil 2.14’de görüldüğü gibi kan akımının azaldığı durumlarda, üst üste gelmiş bozuk para dizisini andıran şekilde bir araya gelerek agregatlar yani rulo formasyonu oluşturabilirler (112). Bu agregatlar, normal koşullarda zayıf bağlarla bağlandığından, kayma kuvveti arttığı yani fazla kuvvet uygulandığı zaman dağılır, kuvvet ortadan kalktığı zaman ise tekrar oluşurlar (88,112).



Şekil 2.14: Stazda otolog plazmada eritrosit agregatları (112)

Bununla birlikte eritrositler basit, izotonik tuz çözeltilerinde süspansiyon edildiğinde bu tür agregatlar meydana gelmez ve birçok çalışma, eritrosit agregasyon derecesinin ve hızının, süspansiyon ortamındaki makromoleküllerin tipine ve konsantrasyonuna bağlı olduğunu göstermiştir. Başta fibrinojen olmak üzere, plazmadaki çeşitli proteinler eritrositler arasındaki bu bağlanmayı sağlar (88).

Eritrosit agregasyonuna, in vitro ortamda plazma proteinlerinden başka yüksek moleküler ağırlıklı dekstranlar veya diğer suda çözünür polimerler gibi makromoleküller de neden olabilir. Yeni çalışmalar, eritrosit hücresel özelliklerinin de eritrosit agregasyonunda çok önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Ayrıca diğer akut faz reaktanları, ozmolarite ile pH değişiklikleri ve Hct değerindeki artış da eritrosit agregasyonunu etkiler (113).

Eritrosit agregasyonu oluşumu, agregan kuvvetler ile agregasyonu ortadan kaldıran (disagregan) kuvvetler arasındaki denge ile ilişkilidir. Disagregan kuvvetler; kayma kuvvetleri, eritrosit membran yüzey yüküne bağlı olarak ortaya çıkan hücreler arasındaki elektrostatik itim kuvvetleri ve eritrosit membranının rijiditesidir. Agregatlara etki eden kayma kuvvetleri büyüdükçe, agregasyon eğilimi azalır. Agregan kuvvetler ile ilgili olarak ise, iki birbirine zıt hipotez mevcuttur (15,113).

1. Köprüleme hipotezi: Birbirine bitişik hücrelerin yüzeylerine adsorbe olan makromoleküllerin (antikor, lektin, bakteriyel adezinler, fibrinojen, albümin gibi), disagregan kuvvetleri aşması nedeniyle, köprüleyici kuvvetler oluştuğunda agregasyon olur (15,114).

2. Deplesyon hipotezi; Makromoleküllerin eritrosit yüzeyinden fizikokimyasal mekanizmalarla uzak tutulması, bir ozmotik gradyan ve hücrelerarası boşlukta bir sıvı

hareketi oluşturur. Bu sıvı hareketinin yarattığı basınç farklılıkları, komşu hücreleri birbirine doğru iter (15,115).

Bu iki hipotez, eritrosit yüzeyine yakın bölgedeki makromolekül konsantrasyonları için karşıt tahminlerde bulunurlar. Köprüleme hipotezine göre, yüzeye yakın bölgede makromolekül konsantrasyonu süspansiyonunun diğer bölümlerine göre daha yüksek iken, deplesyon hipotezine göre, bu konsantrasyon düşüktür. Eritrosit yüzeyindeki, makromoleküler adsorpsiyon derecesini doğrudan belirlemeye yönelik çalışmalar, başarısızla sonuçlanmıştır (15,113). Ancak, hücre elektroforezi çalışması deplesyon hipotezini destekler niteliktedir (116).

2.4.3.3.2.1. Eritrosit Agregasyonu Ölçme Yöntemleri

Eritrosit agregasyonu da kanın ölçülebilir bir özelliğidir. Agregat oluşumunun genişliğini ve oranını gösteren parametreler, eritrosit süspansiyonu sabit bir duruma yaklaştığı karakteristik bir zaman dilimi analiz edilerek elde edilebilir (112). En yaygın kullanılan parametre; dikey cam bir tüpte eritrositlerin çökmesinin gözlemlendiği ancak nispeten yavaş sonuç veren eritrosit sedimantasyon hızı (ESH) testidir (15,112). Fotometrik tekniklere dayalı daha yeni otomatik yöntemler de geliştirilmiştir. Böyle cihazlar, eritrosit süspansiyonlarından gelen ışık yansımaları veya eritrosit süspansiyonundan geçen ışık iletiminin ölçülmesine dayanır (15,117).

Eritrosit agregasyonu, bu yöntemlerden başka; santrifüjleme yöntemleri (örneğin, zeta sedimantasyon oranı), bilgisayarlı görüntü analiz teknikleri, düşük kayma hızı viskometresi, ultrason görüntüleme, elektriksel özelliklerin izlenmesi ve mikroskopik yöntemler ile de ölçülebilir (112).

2.5. Talasemi ve Diğer Bazı Hematolojik Hastalılarda Hemoreolojik Değişiklikler

Yapılan araştırmalarla, kanın eritrosit agregasyonu ve deformabilitesindeki değişiklikler ile kan ve plazma viskozitesindeki artışlar gibi reolojik davranışlarında değişiklikler görüldüğü; kardiyovasküler hastalıklar, serebrovasküler hastalıklar (örn. akut miyokard infarktüsü, iskemik kalp hastalıkları, inme ...), hipertansiyon ve diyabet gibi bir dizi patolojik durumda gösterilmiştir (16-20). Bu patolojik durumlarda gözlemlenen hemoreolojik değişiklikler (örn., eritrosit agregasyon artışı, plazma viskozitesi artışı...) genellikle doku perfüzyonunu etkiler ve bu nedenle de reolojik "anormallikler" olarak adlandırılır (21).

Hematolojik hastalıklar, hemoreolojik değişikliklerin doku perfüzyonunda görülen sorunların nedeni olarak tanımlanabilmesi açısından istisnadır (91). Eritrositlerde şekil bozukluğuyla seyreden hematolojik hastalıklarda eritrosit deformabilitesi genellikle değişir (98). Bu tip hastalıklardan biri olan, HbS içeren eritrositlerin görüldüğü orak hücre anemisi, eritrosit membran yapısındaki değişikliklere bağlı olarak eritrosit deformabilitesinin azalması ile doğrudan ilişkili en çarpıcı örnektir (91,118). Herediter sferositoz ve eliptositoz gibi hastalık tablolarında da eritrosit membran defektleri görüldüğünden, eritrosit deformabilitesi azalmış olarak saptanmıştır (119).

Talasemili hastalarda yapılan çalışmalarda; tam kan vizkozitesinin arttığı, eritrosit deformabilitesinin ise azaldığı bildirilmiştir (120,121). Farklı talasemi grupları ile yapılan çalışmalarda da, eritrosit deformabilitesinin kontrol grubuna göre düşük olduğu gösterilmiştir (22-24).

2.6. Hemoreoloji ve Çinko

Kanın çinko seviyesini belirlemede, plazma çinko konsantrasyonunun ölçülmesi, genel kabul gören bir yöntemdir (28). Plazma çinko seviyesi, çinko değerinin önemli bir belirleyicisi olmakla birlikte, tek başına yetersizdir. Zira, çinko eritrositlerin yapısında da bulunur. Çinko, metabolizmada birçok önemli rol oynar ve sayısız metaloenzimin ve transkripsiyon faktörünün bir bileşenidir (7,8,28).

Çinko eksikliğinde plazma ve membran proteinlerinde de postranslasyonel değişiklikler görülebilir. Plazma membran proteinlerinin çinko bağlama afinitesi, çinko eksikliği ile azalma eğilimindedir (28,122).

Çeşitli araştırmalarda, çinkonun eritrosit deformabilitesini ve agregasyonunu etkilediği gösterilmiştir (26,27,31,123). Sporcularla yapılan bir çalışmada, plazma çinko seviyesinin düşük, kan viskozitesinin normalden daha yüksek olduğu görülmüştür (124). Yine sporcularda, Zn takviyesinin eritrosit deformabilitesini arttırdığı da gösterilmiştir (25).

2.7. Oksidatif Stres

2.7.1. Serbest Oksijen Radikaller

Serbest oksijen radikalleri [reaktif oksijen türleri (ROS)], canlı organizmaların normal fizyolojik ya da çeşitli patofizyolojik süreçleri sırasında üretilirler (125). Hücrelerin oksidatif durumu, pro-oksidanlar (Örn. ROS) ile antioksidanlar arasındaki dengeyi yansıtır ve bu normal fizyolojik fonksiyonlarda rol oynar. Bununla birlikte,

patolojik koşullar altında denge oksidanlara doğru kayar ve sitotoksik olan oksidatif strese yol açar. Böyle durumlarda, doku ve hücreler zarar görebilir ve durum, hücre ve organ hasarı ile sonuçlanabilir. Bu nedenle, oksidatif stresin kanser, ateroskleroz, diyabet ve kardiyovasküler, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalıkta rol oynadığına inanılmaktadır (126).

ROS'lar normal hücre metabolizması sırasında oksijen içeren kimyasal reaksiyonlar sonucunda ortaya çıkar. Bu ROS'lar arasında; süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit radikali (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) ve singlet oksijen radikali ($O_2^{\cdot}$) sayılabilir. Son derece reaktif olan bu radikaller; lipidlere, proteinlere, polisakkaritlere, DNA ve diğer makromoleküllere saldırabilirler. Bunların sonucunda işlev bozuklukları ortaya çıkmakta ve hücre ölümü olabilmektedir (125).

Lipid peroksidasyonu; lipit radikali tarafından başlatılır. Oluşan lipit radikali, oksijen ile reaksiyona girer ve lipit peroksi radikali oluşur. Bu radikal ise hücre membranı yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olup membran akışkanlığının ve geçirgenliğinin bozulması gibi hücre membran yapısında bozulmalara yol açar (126,127). Malondialdehit (MDA); yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşur (128).

ROS'lar etkilerini, proteinler üzerinde de gösterir. Proteinlerin, sülfidril veya amino gruplarıyla etkileşebilir ve proteinlerde agregasyon ve parçalanmalar (fragmentasyon) meydana gelebilir (125).

DNA'da oksidatif hasara uğrayan moleküllerden biridir. Bu hasar; hasar onarım mekanizmalarındaki azalma sonucunda oluşur (125).

2.7.2. Antioksidan Savunma Mekanizmaları

Vücutta, normal şartlar altında ROS'ların bu zararlı etkilerine karşı, antioksidan savunma mekanizmaları (antioksidanlar) korumayı sağlar. Çeşitli enzim sistemleri ROS'u metabolik dönüşümle nötralize eder (126).

Hücrelerde bulunan ana antioksidan enzimler; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon transferaz (GST) olarak sıralanabilir. SOD, en etkili hücre içi antioksidan enzim sistemlerinden biridir. Bu enzim, süperoksit radikalinin, H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eder. Süperoksitten daha az tehlikeli olan H_2O_2 ; katalaz ve GPx etkisiyle su ve oksijene indirgenir. CAT, peroksizom ve eritrositlerin sitoplazmaları içinde bulunan

hücre içi bir antioksidan enzimdir. H_2O_2 'nin suya ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eder. GPx; sitosol, mitokondri ve çekirdekte bulunur (148). Yapısında selenyum bulunur ve eritrositlerde oksidatif strese karşı etkili antioksidanlardan biridir (126). GPx için substrat, H_2O_2 veya organik peroksitlerdir (ROOH). GPx, H_2O_2 için katalazdan çok daha yüksek afiniteye sahiptir ve H_2O_2 'yi düşük konsantrasyonlarda bile ortadan kaldıracaktır. Peroksitler, suya (veya alkole) dönüştürüldükten sonra glutatyon (GSH) eşzamanlı olarak GSSG'ye (glutatyon disülfid - okside olmuş glutatyon formu) oksitlenir (128).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 12.01.2018 tarih, 01 nolu karar ve 61 sayı ile onay alınmıştır (Ek 1).

3.1. Çalışmaya Katılan Hastalar

Bu çalışma, Ocak – Kasım 2019 da İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Onkoloji ve Hematoloji Bilim Dalı'nda ayakta TM tedavileri takip edilen hastalar ile yapıldı. Hasta grubuna ek olarak kronik bir hastalığı olmayan sağlıklı gönüllüler arasından kontrol grubu (sağlıklı grup) oluşturuldu.

Hastalara, sağlıklı gruba ve reşit olmayan hastaların yakınlarına, çalışma ile ilgili yazılı ve sözlü bilgi verildikten sonra, çalışmaya katılmayı kabul eden tüm gönüllülerden ve hastanın reşit olmama durumunda ise, yakınlarından yazılı onam formu alındı (Ek 2). Çalışma sürecinde hastaların, hastalıklarının gerektirdiği diğer tedavilerine devam edildi. Çalışmamız, hastaların tedavisini hiçbir şekilde etkilememiş, herhangi bir ek tedavi ya da ilaç uygulanmamıştır.

3.2. Çalışma Protokolü

3.2.1. Kan Alınması ve Ölçümler:

Çalışmaya dahil edilen deneklerden, heparin içeren tübe 10 ml venöz kan alındı. Bu venöz kanlar; Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Hemoreoloji laboratuvarında, çinko inkübasyonundan önce ve sonra olmak üzere, hemoreolojik parametrelerin (Hct, eritrosit deformabilitesi, ozmotik deformabilite ve eritrosit agregasyonu) ve antioksidan enzimlerin [Katalaz (CAT), Glutasyon Peroksidaz (GPx), Süperoksit Dismutaz (SOD) ve Lipid peroksidasyon -MDA enzim aktivitesi tayini-] ölçümü için kullanıldı.

Hemoreolojik parametrelerin ölçümü, 4 saati geçmemek koşulu ile gerçekleştirildi. Antioksidan enzim testleri ise, yaklaşık 1 ml kadar kan, kitlerin saklama prosedürlerine uygun olarak hazırlandı ve -80°C'de saklanıp, tüm denekler tamamlandıktan sonra ölçüldü.

Hematolojik (hemogram) ve biyokimyasal (ferritin, glukoz, BUN, kreatinin, ürik asit...) incelemeler, hastalar kontrole geldiği zaman, rutin olarak yapıldı. Bütün bu

parametreler, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Merkez Biyokimya Laboratuvarında rutin uygulamadaki metodlarla ölçüldü. Hematolojik ölçümler için EDTA'lı tüpe alınan kan örnekleri kullanıldı ve ölçümler hemogramda yapıldı (ABX MICROS 60, Montpellier France). Jelli ve antikoagülant içermeyen tüpe alınan kan örnekleri ile ise biyokimyasal testler yapıldı (C Modüler DPP Roche Hitachi).

3.2.2. Hct Tayini ve Ayarlanması:

Hct tayini, mikrohematokrit metodu ile yapıldı. Deneklerden alınan kandan, heparinli Hct tüpünün bir ucundan 2/3 sine kadar kan çekildi. Diğer ucu Hct macunu ile kapatıldıktan sonra 9000 rpm de 4 dk santrifüj edildi (Elektromag M19). Özel cetvel ile %Hct ölçüldü.

Doğal hematokriti ölçülmüş kan örnekleri, 3000 rpm de 10 dk santrifüj edildi (Nüve – NF 1215). Hematokrit, başlangıç değerlerine göre, plazma ekleyerek ya da çıkarılarak %40 olarak ayarlandı.

3.2.3. Eritrositlerin Çinko ile İnkübasyonu:

Çinko inkübasyonu için 1M $ZnSO_4(7H_2O)$ (Çinko Sülfat Heptahidrat), (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) kullanıldı. [$1M ZnSO_4(7H_2O) = 287,54 \text{ g/mol}$] Çinko sülfat distile suda çözülerek, 0,145 M çinko sülfat stok çözeltisi hazırlandı ve deneylerde kullanılmak üzere 1/100 distile su ile seyreltildi.

Hematokriti %40 olarak ayarlanmış 3 ml kan santrifüj edildi. Çinko sülfat; plazmadaki final konsantrasyonu 0,5 $\mu\text{g/dl}$ olacak şekilde, plazma ile değiştirilerek yavaşça karıştırıldı. Hazırlanan bu eritrosit süspansiyonu 30 dk, 37°C 'de su banyosunda inkübe edildi.

3.2.4. Hemoreolojik Parametrelerin Ölçümü:

Hemoreolojik parametrelerin ölçümleri, lazer uygulamalı bir refraktometre [LO®RCA (laser-assisted optical rotational cell analyser) MaxSis, Mechatronics, Hoorn, Netherlands] kullanılarak 37°C'de yapıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: LO®RCA Ektasitometre

3.2.4.1. Eritrosit Deformabilitesi Ölçümü

- Ölçüm Prensipleri:

Metot olarak, daha önce Hardeman ve ark. tarafından da tanımlanan LORCA aletinin standart kullanım metodu uygulandı (111,129).

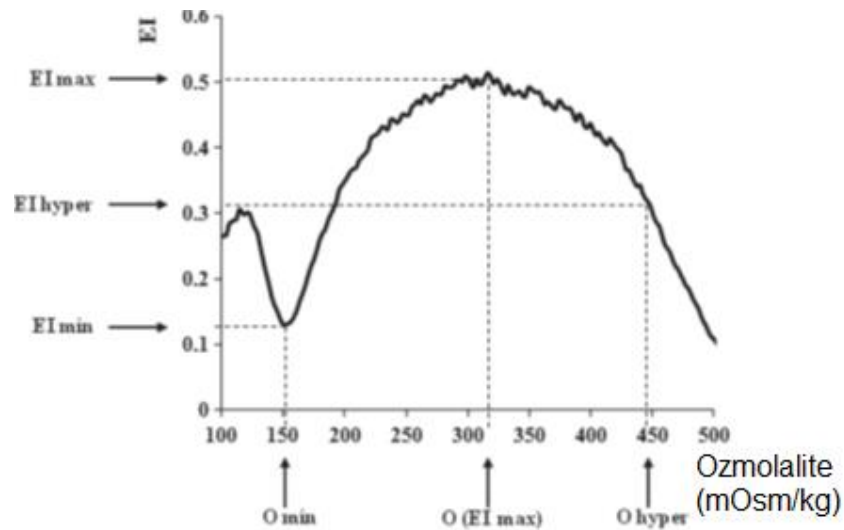
Bu sistemde, dış silindir, kademeli bir motor yardımıyla farklı hızlarda döner ve böylece araya konulan kan, farklı kayma kuvvetlerinin etkisi altında kalır. Işık kaynağı; bir lazer diyot (670 nm, 4 mW), bir foto diyot (sensör) ve bir sıcaklık kontrol ünitesi olarak, sabit iç silindire entegre edilmiştir. Lazer kaynağından çıkan ışın, eritrosit süspansiyonuna ulaşır. Bir ekran üzerine yansıyan difraksiyon paterni (lazer ışığının hücrelerin üzerinden yansmasıyla arka ekranda elde edilen şekil), süspansiyondaki eritrositlerin şekil değişikliğini yansıtır. Artan kayma kuvvetlerine paralel olarak, dairesel bir formdan elipsoid bir forma dönüşümün derecesi ile eritrositlerin deformabilitesi arasında doğru orantı vardır.

elongasyonu (uzama derecesi) sürekli olarak kaydedilirken süspansiyon ortamının ozmolalitesi, ektositometre içinde özel bir program aracılığıyla otomatik olarak 100 mOsm/kg'dan 500 mOsm/kg'a kadar kademeli olarak değiştirildi (107,133).

Şekil 3.3'de de görülen ve cihaz tarafından hesaplanan parametreler Tablo 3.1'de tanımlanmıştır:

Tablo 3.1: Ozmotik deformabilite parametreleri (107)

EI_{min}	30 Pa kayma geriliminde, düşük ozmolaritede ölçülen minimum uzama derecesi
EI_{max}	30 Pa kayma gerilimi ile ölçülen maksimum uzama derecesi
EI_{hyper}	30 Pa kayma geriliminde, yüksek ozmolaritede maksimum uzama derecesinin yarısı
O_{min}	Minimal EI'nin olduğu ozmolalite
O_{max}	maksimum EI'nin olduğu ozmolalite
O_{hyper}	EI_{hyper} 'da, yani EI_{max} 'in yarısı kadar elongasyonun meydana geldiği ozmolalite
Area	EI - ozmolarite eğrisi altındaki alan



Şekil 3.3: Ölçüm yöntemiyle belirlenen parametreler ile elongasyon indeksi (EI) –ozmolalite (O[mOsm/kg]) eğrisi (*osmoscan eğrisi*) (134)

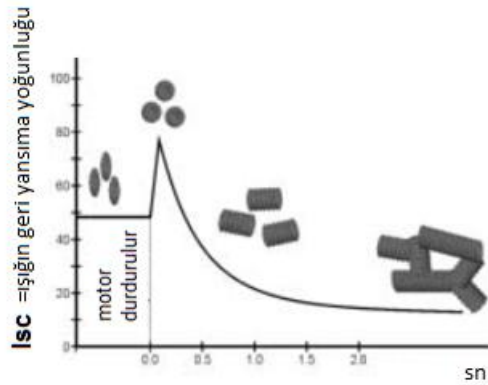
3.2.4.3. Eritrosit Agregasyon Ölçümü

Ölçüm Prensibi:

Eritrosit agregasyonu, geri yansıyan ışığın zamanla yoğunluğundaki değişimi ile değerlendirilir ve *sylectogram* olarak adlandırılan bir grafik olarak çizilir (111,117).

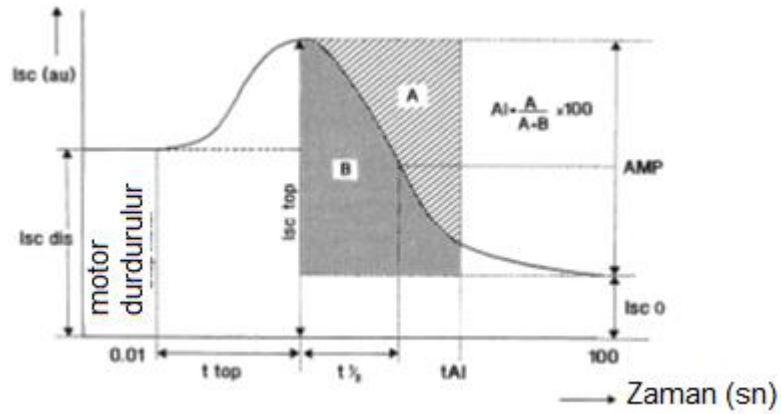
Eritrosit agregasyon ölçümünde; Şekil 3.4’de görüldüğü gibi, tamamen disagrege olmaya yetecek kadar yüksek bir kayma hızında, kısa bir dönme periyodundan sonra, motor aniden durdurulur. Kayma etkisinin ortadan kalkması ile elips şeklindeki eritrosit, tekrar normal bikonkav şeklini alır. Ardından, fotodiyot sensörü tarafından gözlenebilen ışığın yansımaya yoğunluğunda (Isc) bir artış olur. Bunu, ışığın yansımaya yoğunluğunda düşme ile açıklanan agregasyon süreci izler. Başlangıçta, esas olarak iki boyutlu rulo formasyonu oluşurken (135), ardından daha yavaş olarak üç boyutlu ağlar oluşur.

Işık geri yansımaya yoğunlukları (Isc) “au” ile ifade edilir.



Şekil 3.4: Eritrosit agregasyonunun *sylectogramı* (Isc: Iscattering) (117)

Şekil 3.5’de görüldüğü gibi, agregasyon parametreleri otomatik olarak hesaplanır. AMP; agregasyonun genişliği ya da genliği, $t_{1/2}$; tam agregasyonun yarısı kadar agregasyonun meydana geldiği süre ve AI; agregasyonun kinetiğini ifade etmektedir.



Şekil 3.5: Eritrosit agregasyon indeksleri (111)

Agregasyon ölçümleri için; daha önce tanımlandığı gibi, önceden kendi plazması ile %40 hematokrite ayarlanmış kandan yaklaşık 1,5 ml alınarak sisteme yerleştirildi ve ölçüm yapıldı. Tüm ölçümler 37°C’de yapıldı.

3.2.5. Oksidatif Stres ve Antioksidan Durumun Belirlenmesi

Oksidatif stres düzeyinin belirlenmesi için; CAT, GPx, SOD ve tiyobarbitürik asit reaktif maddelerin (TBARS) miktarının belirlenmesi yoluyla lipid peroksidasyonu eritrosit lizatında bakıldı. Bütün ölçümler, kitlerin üretici firmalarının uygulama kılavuzuna uygun olarak yapıldı (Cayman Chemicals, Michigan, USA).

Örnekler, 96 kuyucuklu plakalarda hazırlandı ve ölçüm, bir plaka okuyucu tarafından (Hybrid Reader, Synergy H1, BioTek, VT, ABD) spektrofotometrik olarak gerçekleştirildi.

3.2.5.1. Eritrosit Lizatının Hazırlanması

Enzim aktivitelerinin belirlenmesi için ayrılmış, 1 ml kan örneği 4°C de 8000 x g de 10 dk, santrifüj edildi. Üstteki plazma kısmı -80°C de saklanmak üzere ayrıldı.

Santrifüj edilip, plazması ayrılmış kan örneğinin “buffy coat” tabakası atıldıktan sonra, altta kalan eritrosit paketi 1:4 buzlu ultra saf yüksek performanslı kromatografi sıvısı (HPLC Grade) içerisinde çözüldü. 4°C de 10.000 x g de 15 dk santrifüj edildi. Eritrosit lizatı, -80°C de saklanmak üzere ayrıldı.

3.2.5.2. CAT Çalışma Planı

Katalaz (CAT) enzim etkinliği ölçüm kiti (Cayman, catalase assay kit Item no.: 707002), CAT enziminin aktivitesini, enzimin peroksidatik işlevini kullanarak ölçer. Yöntem, CAT'ın H_2O_2 varlığında metanol ile tepkimesine dayanır. Oluşan formaldehit, 4-amino-3-hidrazino-5-merkapt-1,2,4-triazol (Purpald) ile kolorimetrik olarak ölçülür. Purpald, formaldehit tepkimesi ile oksidasyonu sonucu mor renge dönüşür. CAT aktivitesi, bu mor rengin 540 nm dalga boyundaki absorbansı okunarak ölçülür.

DeneySEL İşlemler:

Daha önce hazırlanmış olan eritrosit lizatu, örnek tamponu ile 1:2 oranında seyreltilerek aşağıdaki basamaklara göre deney gerçekleştirildi.

1- Formaldehit standartlarının hazırlanması: Formaldehit stok ve seyreltilmiş örnek tampondan, Tablo 3.1'de belirtilen miktarlarda alınarak 7 farklı formaldehit standart tüpü (A-G) hazırlandı.

Tablo 3.3: Formaldehit stok ve seyreltilmiş örnek tamponu miktarları

Tüpler	Formaldehit Stok (μl)	Örnek Tamponu (μl)	Standart Formaldehit (Final konsantrasyon) (μM)
A	0	1000	0
B	10	990	5
C	30	970	15
D	60	940	30
E	90	910	45
F	120	880	60
G	150	850	75

2- Formaldehit standart kuyucukları: Plaka üzerindeki belirlenmiş kuyucuklara, 100 μl seyreltilmiş deney tampon çözeltisi, 30 μl metanol ve 20 μl formaldehit standardı (A-G) eklendi.

3- Pozitif kontrol kuyucukları: Plaka üzerinde belirlenmiş kuyucuklara, 100 μl seyreltilmiş deney tampon çözeltisi, 30 μl metanol ve 20 μl seyreltilmiş CAT (kontrol) eklendi.

4- Örnek kuyucukları: Plaka üzerinde belirlenmiş kuyucuklara, 100 μl seyreltilmiş deney tampon çözeltisi, 30 μl metanol ve 20 μl örnek eklendi.

5- Tüm kuyucuklara, 20 µl seyreltilmiş Hidrojen Peroksit eklenerek reaksiyon başlatıldı. 20 dk oda sıcaklığında çalkalayıcı ile inkübe edildi.

6- Reaksiyonu sonlandırmak için her bir kuyucuğa önce 30 µl Potasyum Hidroksit daha sonra da 30 µl Purpald eklendi ve 10 dk oda sıcaklığında çalkalayıcı ile inkübe edildi.

7- Tüm kuyucuklara, 10 µl Katalaz Potasyum Periodat eklendi ve çalkalayıcıda oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.

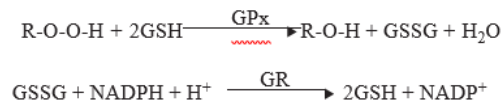
8- Absorbans değişimi, 540 nm dalga boyunda ölçüldü.

CAT Tepkime Hızının Belirlenmesi

Tüm standard ve örneklerin, ortalama absorbansları hesaplandı ve A standartının ortalama absorbansı, kendisinden ve diğer tüm standart ve örneklerden çıkarıldı. Bu absorbans değerleri ve tablodaki standart formaldehit derişimleri kullanılarak bir formaldehit standart grafiği oluşturuldu. Elde edilen standart grafiğin denklemi kullanılarak, örneklerin formaldehit derişimi hesaplandı. Hesaplanan formaldehit miktarı, CAT'ın 20 dakikalık aktivitesi olduğundan, dakikadaki aktivite hesaplanarak seyreltme oranlarıyla çarpıldı ve enzim miktarı belirlendi.

3.2.5.3. GPx Çalışma Planı

Gulutasyon peroksidaz (GPx) enzim etkinliği ölçüm kiti (Cayman glutathione peroxidase assay kit, Item no.: 703102), GPx aktivitesini glutatyon redüktaza (GR) bağlı olarak ölçer. Hidroperoksit, GPx aktivitesi sonucu indirgenirken, glutatyon (GSH) okside glutatyona (GSSG) dönüşür. GSSG, glutatyon redüktaz (GR) ve NADPH ile indirgenerek tekrar GSH oluşur. NADPH'ın NADP⁺'a oksidasyonu ile 340 nm dalga boyundaki absorbansta azalma meydana gelir. GPx aktivitesi, absorbanstaki bu azalma ile doğrudan orantılıdır.



Santrifüj sonrası elde edilen eritrosit lizatu, örnek tamponu ile 1:2 oranında seyreltilerek deney gerçekleştirildi.

Deneyisel İşlemler

1- Enzimatik olmayan kuyucuklar (Kör): Plaka üzerinde belirlenmiş kuyucuklara, 120 µl deney tampon çözeltisi ve 50 µl kosubstrat karışımı eklendi.

2- Pozitif kontrol kuyucukları: Plaka üzerinde belirlenmiş kuyucuklara, 100 µl deney tampon çözeltisi, 50 µl kosubstrat karışımı ve 20 µl seyreltilmiş GPx (kontrol) eklendi.

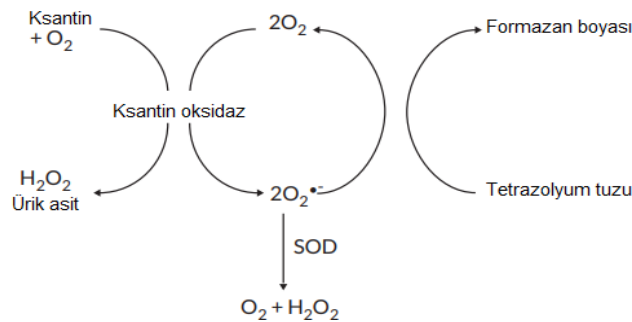
3- Örnek kuyucukları: Plaka üzerinde belirlenmiş kuyucuklara, 100 µl deney tampon çözeltisi, 50 µl kosubstrat karışımı ve 20 µl örnek eklendi.

4- Tüm kuyucuklara, 20 µl kümen hidroperoksit eklenerek reaksiyonlar başlatıldı ve plaka birkaç saniye dikkatlice karıştırıldı.

5- Absorbans değişimi 340 nm dalga boyunda 5 dk boyunca, dakikada bir kez olacak şekilde kaydedildi. Her örnek ve kör için, dakikadaki absorbans değişimi hesaplandı. Kör için hesaplanan absorbans değeri, örnek için hesaplanan değere çıkarılarak GPx aktivitesi hesaplandı.

3.2.5.4. SOD Çalışma Planı

Süperoksit dismutaz (SOD) enzim etkinliği ölçüm kiti (Cayman, superoxide dismutase assay kit Item no.:706002), SOD'u ksantin oksidaz ve hipoksantin tepkimesi sonucu oluşan süperoksit radikallerini, tetrazolyum tuzuna göre belirler. Ksantin oksidaz, ksantin ve hipoksantini, ürik asit ve H_2O_2 'e dönüştürür. Bu tepkime sırasında da süperoksit radikalleri oluşur. Deney ortamına eklenen örneklerdeki SOD da, bu süperoksit radikallerini moleküler oksijen ve H_2O_2 'e dönüştürür. Ortamda tetrazolyum tuzu (radikal bulucu) varlığında, süperoksit radikalleri tetrazolyum ile tepkimeye girer ve tetrazolyum tuzunun indirgenmesi sonucu formazen boyasının etkisi ile renk değişikliği gerçekleşir. Bu tepkimenin inhibisyonu ile SOD aktivitesi belirlenir.



Deneysel İşlemler:

Daha önce hazırlanmış olan eritrosit lizati, örnek tamponu ile 1:5 oranında seyreltilerek aşağıdaki basamaklara göre deney gerçekleştirildi.

1- SOD standartlarının hazırlanması: 7 farklı tüpe (A-G) eklenmiş SOD stok ve seyreltilmiş örnek tamponu miktarları aşağıdaki gibidir.

Tablo 3.4: SOD stok ve seyreltilmiş örnek tamponu miktarları

Tüpler	SOD Stok (µl)	Örnek Tamponu (µl)	Standart SOD (Final konsantrasyon) (U/ml)
A	0	1000	0
B	20	980	0,005
C	40	960	0,01
D	80	920	0,02
E	120	880	0,03
F	160	840	0,04
G	200	800	0,05

2- SOD standard kuyucukları: Plaka üzerinde belirlenmiş kuyucuklara, 200 µl seyreltilmiş radikal bulucu (tetrazolyum tuzu) ve 10 µl standart (A-G) eklendi.

3- Örnek kuyucukları: Plaka üzerinde belirlenmiş kuyucuklara, 200 µl tetrazolyum tuzu ve 10 µl örnek eklendi.

4- Tüm kuyucuklara, 20 µl seyreltilmiş ksantin oksidaz eklenerek reaksiyon başlatıldı. Plaka kapağı kapatılarak birkaç sn dikkatlice karıştırıldı. Oda sıcaklığında 30 dk çalkalayıcı ile inkübe edildi ve 450 nm de absorbans okundu.

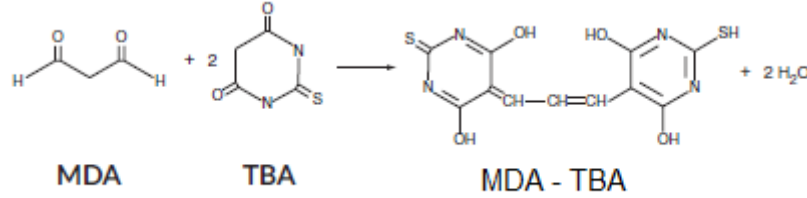
SOD Analizi (Hesaplama)

Tüm standart ve örneklerin ortalama absorbansları hesaplandı. Standart A'nın absorbansı kendisine ve diğer tüm standart ve örnek absorbanslara bölünerek doğrusallaştırılmış oran (LR) hesaplandı. Bu, doğrusallaştırılmış oranlar (LR) ve standart SOD aktiviteleri ile standart grafik oluşturuldu. Örneklerin LR değerleri ve standart grafik denklemi kullanılarak, SOD aktiviteleri hesaplandı.

3.2.5.5. Lipid Peroksidasyon (MDA Enzim Aktivitesinin Tayini) Çalışma Planı

Lipid peroksidasyonunun taranması için bilinen en iyi yöntemlerden biri, Tiyobarbitürik Asit Reaktif maddelerin (TBARS) ölçümüdür. MDA, doğal olarak oluşan

bir lipid peroksidasyon ürünüdür. Cayman'ın TBARS (TCA Yöntemi) ölçüm kiti [Cayman TBARS (TCA Method) Assay Kit Item no.:700870]; MDA ve TBA (Tiyobarbitürik Asit)'nın yüksek sıcaklıkta (90-100°C) ve asidik koşullar altında reaksiyonu ile oluşan MDA-TBA bileşimini, 530-540 nm de kolorimetrik olarak ölçer.



Deneysel İşlemler:

1- Kolorimetrik standartların hazırlanması: 8 farklı tüpe (A-H) eklenmiş 125 μM MDA stok çözeltisi ve su miktarları aşağıdaki gibidir.

Tablo 3.5: MDA stok ve su miktarları

Tüpler	MDA (μl)	Su (μl)	MDA final konsantrasyonu (μM)
A	0	1000	0
B	5	995	0,625
C	10	990	1,25
D	20	980	2,5
E	40	960	5
F	80	920	10
G	200	800	25
H	400	600	50

2- Cam tüplere, 100 μl seyreltilmiş standart çözeltisi veya örnek eklendi.

3- Her cam tüpe, 100 μl TCA deney reaktifi eklendi ve karıştırıldı.

4- Her cam tüpe, 530 mg TBA'nın seyreltilmiş asetik asit çözeltisi (50 ml) ve seyreltilmiş sodyum hidroksit çözeltisi (50 ml) içinde çözülmesi ile hazırlanan renk reaktifi, 800 μl kadar eklenerek karıştırıldı.

5- Tüpler su banyosunda (100°C) bir saat boyunca bekletildi. Bu sürenin sonunda tüpler kaynayan sudan hızlıca alınarak 10 dk buzda inkübe edildi.

6- Tüpler 1.600 x g'de 4°C'de 10 dk santrifüj edildi.

7- Pellete dokunulmadan üstteki süpernatant alınıp 530-540 nm de absorbens ölçüldü.

MDA Düzeyinin Hesaplanması

Her standart ve örneğin ortalama absorbens değerleri hesaplandı. 0 μ M (A) standardı kendi absorbens değerinden ve diğer absorbens değerlerinden (standartlar) çıkartılarak doğru absorbens değerleri elde edildi. Bu değerler MDA konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak çizdirildi ve standart bir eğri elde edildi. MDA düzeyleri μ M cinsinden hesaplandı. Sonuçlar nmol/mg protein cinsinden verildi.

3.3. Verileri Değerlendirmede Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Elde edilen veriler SPSS 22.0 paket programı kullanılarak değerlendirildi. Nitel veriler yüzde oranlar, nicel veriler ortalama $\pm$ standart sapma ile verildi. Verilerin normalliği Shapiro-Wilks testi kullanılarak test edildikten sonra; normal dağılım gösteren verilere, bağımlı grupların değerlendirilmesinde eşleştirilmiş t testi, bağımsız iki grup değerlendirmelerinde t testi uygulandı. Normal dağılım göstermeyen verilere ise bağımlı grupların değerlendirilmesinde Wilcoxon Sum Rank test, bağımsız grupların değerlendirilmelerinde ise Mann Whitney U analizleri kullanıldı. Anlamlılık düzeyi <0,05 olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, TM hastalarında ve sağlıklı gönüllülerde (sağlıklı grup) çinko inkübasyonundan önce ve sonra olmak üzere iki ayrı ölçüm yapılmıştır.

4.1. Deneklerin Demografik Özellikleri

Denekler, çalışmaya katılmayı kabul eden TM hastaları ve sağlıklı gönüllüler arasından seçilmiştir. Hematolojik ve biyokimyasal parametrelerin kendi standartları “kontrol” olarak kabul edilmiş ve minimum–maksimum (min-max) aralığı olarak verilmiştir.

Hastaların ve sağlıklı grubun demografik özellikleri, Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Çalışmamızda, 15 kadın, 13 erkek olmak üzere toplam 28 TM hastası mevcuttu. Yaş ortalaması, $22,9 \pm 8,83$ yıl idi. Sağlıklı grupta ise, 17’si kadın 13’ü erkek olmak üzere toplam 30 kişi olup yaş ortalaması $21,3 \pm 4,92$ yıl idi. Her iki grup yaş ve cinsiyet olarak uyumlu bulundu. Sağlıklı grup, beyanları doğru kabul edilerek, kendisinde ve ailesinde parametrelerimizi etkileyecek herhangi bir kan hastalığı olmayan ve son 1 ay içinde bir sağlık şikayeti olmamış gönüllülerden oluşturuldu. O nedenle, bu grupta hemogram ve biyokimyasal testlerin yapılmasına gerek görülmedi.

Tablo 4.1: Hastaların ve sağlıklı grubun demografik özellikleri

	TM hastaları (n=28)	Sağlıklı grup (n=30)	
Vak’a sayısı (Kadın/Erkek)	15/13	17/13	n.s.
Yaş (Yıl)	$22,9 \pm 8,83$ (10-41)	$21,3 \pm 4,92$ (15-38)	n.s.

Değerler ortalama±standart sapma, (minimum – maksimum) olarak verilmiştir. (n.s.:istatistiksel olarak anlamsız)

4.2. Hematolojik ve Biyokimyasal Ölçümler

TM hastalarının, hematolojik ölçüm değerleri ortalama±standart sapma (ort±ss) olarak Tablo 4.2’de, biyokimyasal ölçüm değerleri ise Tablo 4.3’de verilmiştir.

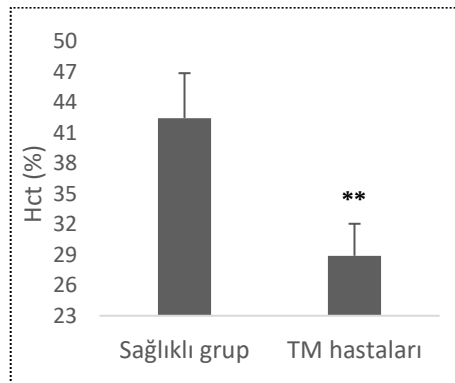
Tablo 4.2: TM hastalarının hematolojik ölçüm değerleri

Parametreler	TM Hastaları	Standart Değerler En düşük - En yüksek
Hct (%)	28,89±3,15 ↓	38 - 47
Hb (gr/dl)	8,78±1,18 ↓	12 - 16
RBC (M/ μ l)	3,27±0,44 ↓	4 – 5,5
MCV (fL)	81,6±5,37	79 - 94
MCH (pg)	26,89±1,75	26 - 32
MCHC (gr/dl)	32,99±1,68	32 - 36
RDW (%)	18,65±4,55 ↑	11 - 15
WBC ($10^3/\mu$ l)	13,85±10,73 ↑	4 – 12

Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

(Hct: Hematokrit, Hb: Hemoglobin, RBC: Eritrosit sayısı, MCV: Ortalama eritrosit hacmi, MCH: Ortalama korpusküler hemoglobin, MCHC: Ortalama korpusküler hemoglobin konsantrasyonu, RDW: Eritrosit dağılım genişliği, WBC: Lökosit sayısı)

Denek gruplarının %Hct değerleri karşılaştırıldığında, TM hastalarının %Hct değerinin; (28,89±3,15), sağlıklı grubun ise (42,43±4,41) olduğu ve TM hastalarının %Hct değerlerinin sağlıklı gruba göre anlamlı şekilde düşük olduğu görüldü ($p < 0,001$) (Şekil 4.1).

Şekil 4.1: Sağlıklı grup ile TM hastalarının %Hct değerleri (** $p < 0,001$)

Tablo 4.3: TM hastalarının biyokimyasal değerleri

Parametreler	TM Hastaları	Standart Değerler En düşük – En yüksek
Glukoz (mg/dl)	91,15±8,86	70 – 100
Üre (mg/dl)	26,72±7,88	10 – 40
Ürik Asit (mg/dl)	5,06±1,7	3 – 7
BUN (mg/dl)	12,35±3,78	8 – 22
Kreatinin (mg/dl)	0,53±0,12 ↓	0,6 – 1,2
CRP (mg/l)	3,24±4,1	0 – 5
Demir (µg/dl)	179,26±56,93	50 - 350
UIBC (µg/dl)	54,06±23,25 ↓	112 – 346
Ferritin (ng/ml)	2299,53±1440,3 ↑	30 – 400
Albumin (gr/dl)	4,7±0,26	3 – 5
İndirekt Bilirubin (mg/dl)	1,89±1,43 ↑	0 – 0,1
Direkt Bilirubin (mg/dl)	0,44±0,2 ↑	0 – 0,3
Total Bilirubin (mg/dl)	2,33±1,45 ↑	0,2 – 1,2

Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

(BUN: Kan üre nitrojeni, AST: Aspartat Transaminaz, ALT: Alanin Aminotransferaz, CRP: C-reaktif protein, UIBC: Demir Bağlama Kapasitesi)

4.3. Eritrosit Deformabilitesi:

Sağlıklı ve TM gruplarının, 10 değişik kayma kuvvetinde (0,3-50 Pa) ölçülen EI değerleri $\text{ort} \pm \text{ss}$ olarak Tablo 4.4’de, bu EI değerleri kullanılarak, her örnek için maksimum elongasyon (EI_{max}) ve EI_{max} ’nın yarısı kadar şekil değiştirmeye neden olan *shear stress*: ($\text{SS}_{1/2}$) değerleri ise Tablo 4.5’de verilmiştir.

Tablo 4.4: 10 farklı kayma kuvvetinde sağlıklı ve TM denek gruplarına ait elongasyon indeksi (EI) değerleri

EI değerleri	Sağlıklı Grup (n=30)		TM hastaları (n=28)		
	İnkübasyondan önce	İnkübasyondan sonra	İnkübasyondan önce	İnkübasyondan sonra	
0,3 Pa	0,048±0,046	0,034±0,016	0,043±0,032	0,051±0,027	p ¹ = 0,320 p ² = 0,065 p ³ = 0,834
0,53 Pa	0,082±0,022	0,082±0,021	0,074±0,032	0,079±0,018	p ¹ = 0,804 p²= 0,020 p ³ = 0,307
0,94 Pa	0,145±0,032	0,148±0,029	0,123±0,021	0,132±0,02	p ¹ = 0,242 p²= 0,002 p³= 0,004
1,65 Pa	0,228±0,035	0,236±0,035	0,191±0,025	0,203±0,024	p ¹ = 0,048 p²<0,001 p³<0,001
2,91 Pa	0,323±0,037	0,332±0,035	0,278±0,034	0,286±0,03	p ¹ = 0,017 p²= 0,005 p³<0,001
5,15 Pa	0,410±0,037	0,421±0,035	0,352±0,046	0,359±0,039	p ¹ = 0,004 p²= 0,022 p³<0,001
9,09 Pa	0,481±0,036	0,493±0,031	0,418±0,059	0,422±0,049	p ¹ < 0,001 p ² = 0,307 p³<0,001
16,04 Pa	0,534±0,034	0,545±0,028	0,466±0,069	0,469±0,052	p ¹ < 0,001 p ² = 0,672 p³<0,001
28,32 Pa	0,574±0,035	0,583±0,027	0,504±0,078	0,506±0,056	p ¹ = 0,002 p ² = 0,825 p³<0,001
50 Pa	0,598±0,039	0,604±0,030	0,536±0,080	0,538±0,06	p ¹ = 0,354 p ² = 0,870 p³<0,001

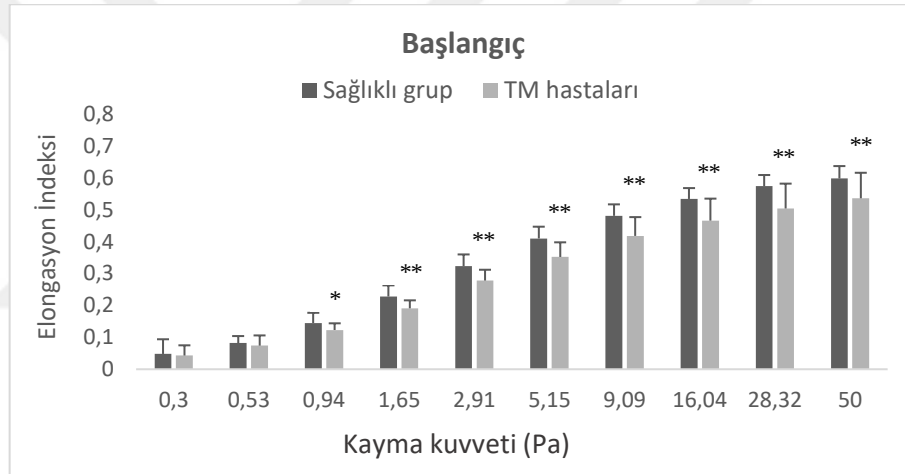
Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. [Kayma Kuvveti (Pa)]

p¹: Sağlıklı grubun, çinko inkübasyonundan öncesi ve sonrası, p²: TM hastalarının çinko inkübasyonundan öncesi ve sonrası, p³:Çinko inkübasyonundan önce (başlangıç), sağlıklı grup ile TM hastaları

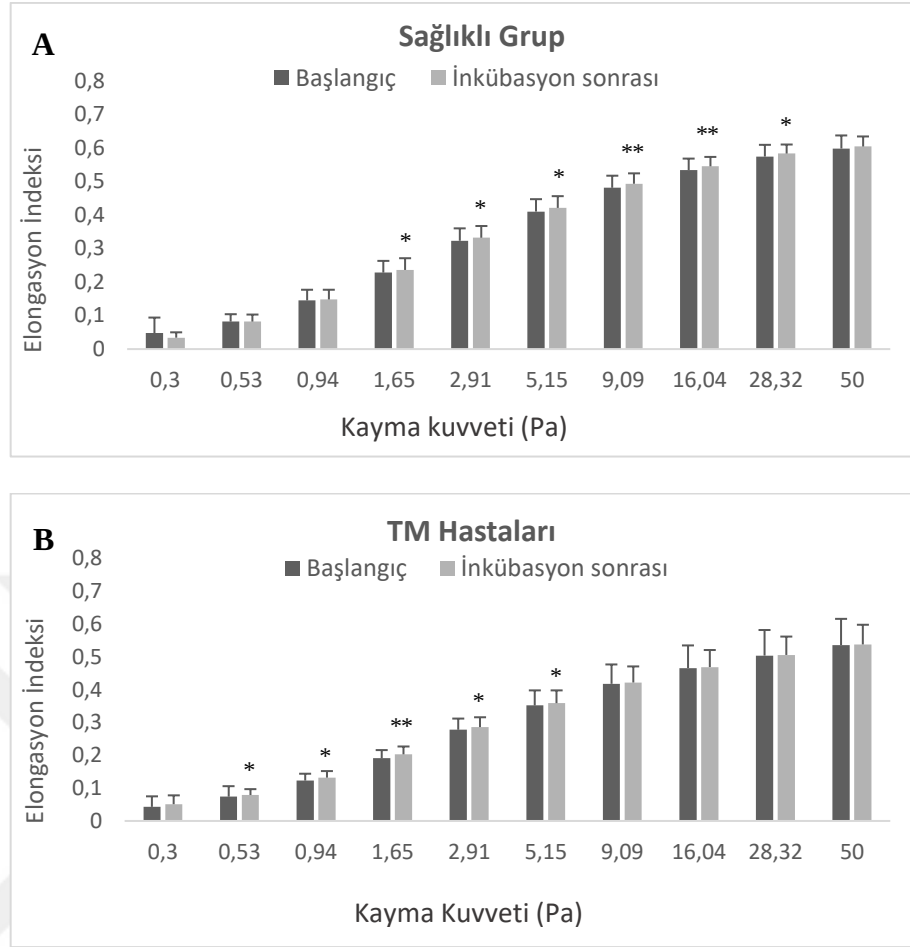
Çinko inkübasyonundan önce (başlangıç), sağlıklı ve TM denek gruplarına ait EI değerleri Tablo 4.4’de istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve sonuçlar Şekil 4.2’de de grafik olarak gösterilmiştir. Tablo 4.4’te görüldüğü gibi; 0,94 - 1,65 - 2,91 - 5,15 - 9,09 - 16,04 - 28,32 ve 50 Pa kayma kuvveti uygulanan ölçümlerde, TM hastalarının EI

değerleri sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğu görülmüştür (sırasıyla; $p=0,004 - <0,001 - <0,001 - <0,001 - <0,001 - <0,001 - <0,001$).

Tablo 4.4'teki değerler ayrıntılı olarak irdelendiği zaman; sağlıklı grubun çinko inkübasyonundan önce ve sonra ölçülen EI verilerinin istatistiksel karşılaştırılmasında (Şekil 4.3A); 1,65 - 2,91 - 5,15 - 9,09 - 16,04 ve 28,32 Pa kayma kuvveti uygulanan ölçümlerde, inkübasyondan sonra anlamlı bir artış olduğu görülmüştür (sırasıyla; $p=0,048 - 0,017 - 0,004 - <0,001 - <0,001 - 0,002$) (Tablo 4.4). TM hastalarının çinko inkübasyonundan önce ve sonra ölçülen EI verilerinin istatistiksel karşılaştırılmasında ise (Şekil 4.3B); 0,53- 0,94 - 1,65 - 2,91 - 5,15 Pa kayma kuvveti uygulanan ölçümlerde, inkübasyondan sonra anlamlı bir artış olduğu görülmüştür (sırasıyla; $p=0,020 - 0,002 - <0,001 - 0,005 - 0,022$).



Şekil 4.2:Çinko inkübasyonundan önce (başlangıç), sağlıklı ve TM denek gruplarında, 10 değişik kayma kuvvetinde Elongasyon İndeksi (EI) ortalamaları (* $p<0,05$, ** $p<0,001$).



Şekil 4.3: A: Sağlıklı ve B: TM hastaları denek gruplarında, inkübasyondan önce ve sonra, 10 değişik kayma kuvvetinde ölçülen Elongasyon İndeksi (EI) ortalamaları (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

Tablo 4.5: Sağlıklı ve TM denek gruplarına ait $SS_{1/2}$ ve EI_{max} değerleri

	Sağlıklı Grup (n=30)		TM hastaları (n=28)		
	İnkübasyondan önce	İnkübasyondan sonra	İnkübasyondan önce	İnkübasyondan sonra	
$SS_{1/2}$	2,54±0,668	2,37±0,585	3,02±0,653	2,74±0,654	$p^1 = 0,027$ $p^2 < 0,001$ $p^3 = 0,008$
EI_{max}	0,633±0,045	0,640±0,031	0,583±0,073	0,561±0,078	$p^1 = 0,256$ $p^2 = 0,098$ $p^3 < 0,001$

Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. $SS_{1/2}$: EI_{max} 'ın yarısı kadar şekil değiştirmeye neden olan *shear stress*, EI_{max} : her örnek için maksimum elongasyon

p^1 : Sağlıklı grubun, çinko inkübasyonundan öncesi ve sonrası, p^2 : TM hastalarının çinko inkübasyonundan öncesi ve sonrası, p^3 : Çinko inkübasyonundan önce (başlangıç), sağlıklı grup ile TM hastaları

Tablo 4.5’de verilen, çinko inkübasyonu öncesi (başlangıç), sağlıklı ve TM denek gruplarına ait $SS_{1/2}$ ve EI_{max} değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; TM hastalarının $SS_{1/2}$ değerlerinin sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu ($p=0,008$), EI_{max} değerinin ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğu görülmüştür ($p< 0,001$).

Tablo 4.5’de görüldüğü gibi, sağlıklı grubun $SS_{1/2}$ değerinde, inkübasyondan sonra istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görülürken ($p=0,027$), EI_{max} değerinde ise anlamlı bir fark görülmemiştir. TM hastalarının $SS_{1/2}$ ve EI_{max} değerlerine ait veriler incelendiğinde de $SS_{1/2}$ değerinde, inkübasyondan sonra istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görülürken ($p< 0,001$), EI_{max} değerinde ise bir azalma görülmekle birlikte, istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmamıştır.

4.4. Eritrosit Agregasyonu:

Eritrosit agregasyonu parametrelerinden; AMP (agregasyonun genişliği ya da genliği), AI (agregasyon indeksi) ve $t_{1/2}$ (max. agregasyonun yarısı için gerekli süre) değerleri $ort \pm ss$ olarak Tablo 4.6’da verilmiştir.

Tablo 4.6: Sağlıklı ve TM denek gruplarına ait AMP, AI, $t_{1/2}$ değerleri

	Sağlıklı Grup (n=30)		TM hastaları (n=28)		
	İnkübasyondan önce	İnkübasyondan sonra	İnkübasyondan önce	İnkübasyondan sonra	
AMP (au)	16,97 $\pm$ 3,32	18,11 $\pm$ 3,06	19,82 $\pm$ 4,67	14,9 $\pm$ 5,05	$p^1= 0,290$ $p^2<0,001$ $p^3=0,011$
AI (%)	68,4 $\pm$ 9,68	62,10 $\pm$ 7,71	58,62 $\pm$ 17,48	56,6 $\pm$ 10,92	$p^1<0,001$ $p^2= 0,564$ $p^3<0,111$
$t_{1/2}$	1,92 $\pm$ 0,83	2,54 $\pm$ 0,87	2,72 $\pm$ 1,39	2,94 $\pm$ 1,03	$p^1<0,001$ $p^2=0,284$ $p^3=0,11$

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. AMP: agregasyonun genişliği, AI: agregasyon indeksi ve $t_{1/2}$: max. agregasyonun yarısı için gerekli süre

p^1 : Sağlıklı grubun, çinko inkübasyonundan öncesi ve sonrası, p^2 : TM hastalarının çinko inkübasyonundan öncesi ve sonrası, p^3 : Çinko inkübasyonundan önce (başlangıç), sağlıklı grup ile TM hastaları

Tablo 4.6’da görüldüğü gibi, TM hastalarının AMP değerinin sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu ($p= 0,011$) görülürken, AI ve $t_{1/2}$ değerlerinde anlamlı bir fark görülemedi.

Tablo 4.6'daki verilerden sağlıklı grubun istatistiksel incelenmesinde, AI değerinde, inkübasyondan sonra istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görülürken ($p < 0,001$), $t_{1/2}$ değerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir artma olduğu görülmüştür ($p < 0,001$). TM hastalarının AMP, AI ve $t_{1/2}$ değerlerine ait veriler incelendiğinde de AMP değerinde, inkübasyondan sonra istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görülürken ($p < 0,001$), AI'de azalma ve $t_{1/2}$ 'de artma görülmekle birlikte farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

4.5. Ozmotik Deformabilite:

Sağlıklı ve TM denek gruplarına ait El_{min} , El_{max} , El_{hyper} , Area, O_{min} , O_{max} ve O_{hyper} değerleri istatistiksel olarak karşılaştırılmış sonuçlar Tablo 4.7'de gösterilmiştir. Aynı veriler Şekil 4.4'de grafik olarak da gösterilmiştir.

Tablo 4.7: Sağlıklı ve TM denek gruplarına ait El_{min} , El_{max} , El_{hyper} , Area, O_{min} , O_{max} ve O_{hyper} değerleri

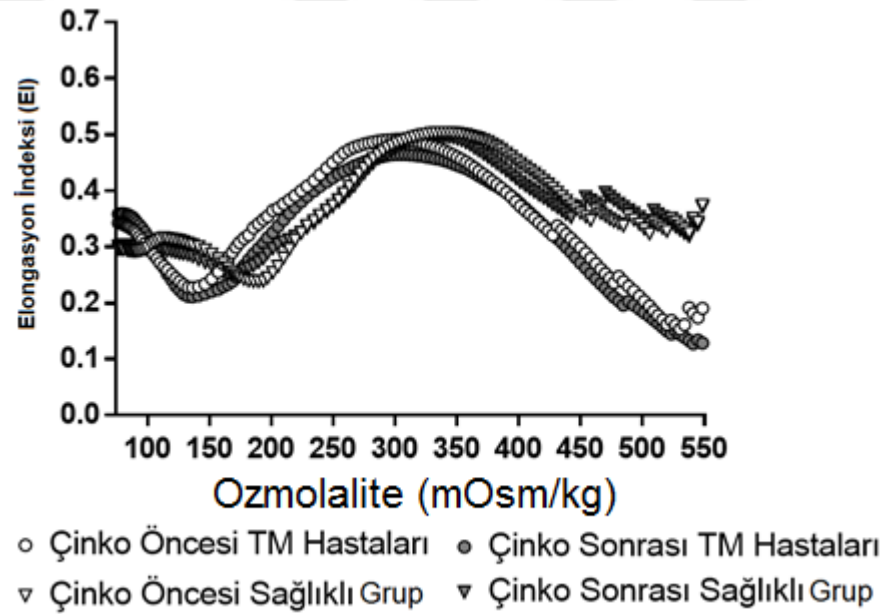
	Sağlıklı Grup (n=30)		TM hastaları (n=28)		
	İnkübasyondan önce	İnkübasyondan sonra	İnkübasyondan önce	İnkübasyondan sonra	
El_{min}	0.112±0.022	0.129±0.066	0.181±0.074	0.161±0.041	$p^1= 0,632$ $p^2=0,245$ $p^3=0,122$
El_{max}	0.536±0.032	0.534±0.029	0.524±0.065	0.49±0.071	$p^1= 0,239$ $p^2<0,001$ $p^3=0,074$
El_{hyper}	0.268±0.016	0.267±0.014	0.262±0.032	0.245±0.035	$p^1=0,074$ $p^2=0,06$ $p^3=0,084$
Area	148±13.19	147.9±13.77	143.9±21.76	136.4±22.35	$p^1=0,922$ $p^2<0,001$ $p^3=0,121$
O_{min}	162.2±13.81	145.1±36.11	147±35.61	150.4±6.211	$p^1=0,109$ $p^2=0,201$ $p^3= 0,003$
O_{max}	319.7±19.71	320.9±17.3	298±23.24	290.9±22.74	$p^1=0,406$ $p^2=0,04$ $p^3=0,01$
O_{hyper}	499.2±24.92	495.4±26.03	452.7±23.11	447.7±25.93	$p^1=0,06$ $p^2=0,736$ $p^3<0,001$

Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

p^1 : Sağlıklı grubun, çinko inkübasyonundan öncesi ve sonrası, p^2 : TM hastalarının çinko inkübasyonundan öncesi ve sonrası, p^3 : Çinko inkübasyonundan önce (başlangıç), sağlıklı grup ile TM hastaları

Tablo 4.7’de görüldüğü gibi, TM hastalarının; başlangıç O_{min} , O_{max} ve O_{hyper} değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğu (sırasıyla $p = 0.003 - 0,01 - <0,001$) görülmüştür.

Sağlıklı grubun çinko inkübasyonundan önce ve sonra ölçülen EI_{min} , EI_{max} , EI_{hyper} , Area, O_{min} , O_{max} ve O_{hyper} verilerinin istatistiksel karşılaştırılmasında; Şekil 4.4’de de görüldüğü gibi, inkübasyondan sonra anlamlı bir fark görülememiştir (Tablo 4.7). TM hastalarının çinko inkübasyonundan önce ve sonra ölçülen ozmotik deformabilite parametrelerinin istatistiksel karşılaştırılmasında ise EI_{max} ve Area ve O_{max} değerlerinde, inkübasyondan sonra anlamlı bir azalma olduğu görülürken (sırasıyla $p < 0,001 - < 0,001 - 0,04$), diğer parametrelerde görülen fark anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 4.4: Sağlıklı ve TM hastaları denek gruplarında, çinko inkübasyonundan önce ve sonra ölçülen ozmotik deformabilite eğrileri

4.6. Antioksidan Enzim Aktiviteleri

Sağlıklı grupta ve TM hastalarında; antioksidan enzimlerin aktiviteleri, ortalama (standart hata) olarak Tablo 4.8’de gösterilmiştir.

Tablo 4.8: Sağlıklı ve TM denek gruplarının, eritrosit örneklerinde antioksidan enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyon biyobelirteci

	Sağlıklı Grup		TM hastaları		
	İnkübasyondan önce	İnkübasyondan sonra	İnkübasyondan önce	İnkübasyondan sonra	
GPx (nmol/min/gHb)	78.04 (5.913)	72.76 (4.327)	78.75 (5.236)	66.31 (7.082)	p ¹ =0,3818 p ² =0,1531 p ³ =0,9291
CAT (nmol/min/gHb)	211.1 (34.83)	196.8 (22.43)	173.2 (14.06)	166.3 (26.40)	p ¹ = 0,5049 p ² =0,788 p ³ =0,3095
SOD (U/ gHb)	957.8 (41.14)	974.0 (60.75)	984.8 (43.55)	990.3 (55.64)	p ¹ =0,7993 p ² =0,8053 p ³ =0,6554
MDA (nmol/ gHb)	219.0 (34.88)	255.1 (45.25)	252.5 (29.83)	201.9 (22.42)	p ¹ =0,6181 p ² =0,1171 p ³ =0,4709

Değerler ortalama (standart hata) olarak verilmiştir. GPx: glutatyon peroksidaz, CAT: katalaz, SOD: süperoksit dismutaz, MDA: malondialdehit

p¹: Sağlıklı grubun, çinko inkübasyonundan öncesi ve sonrası, p²: TM hastalarının çinko inkübasyonundan öncesi ve sonrası, p³:Çinko inkübasyonundan önce (başlangıç), sağlıklı grup ile TM hastaları

Tablo 4.8’de verilen, çinko inkübasyonundan önce (başlangıç), sağlıklı ve TM denek gruplarına ait GPx, CAT, SOD ve MDA değerleri istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. TM hastalarının GPx, SOD ve MDA değerlerinin sağlıklı gruba göre yüksek, CAT değerinin ise düşük olduğu görülmesine rağmen, aradaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.

Sağlıklı grubun istatistiksel incelenmesinde; GPx ve CAT değerlerinde, inkübasyondan sonra azalma, SOD ve MDA değerlerinde ise artma olduğu görülmüş, ancak aradaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. TM hastalarının enzim aktivitelerine ait veriler incelendiğinde de; GPx, CAT ve MDA değerlerinde inkübasyondan sonra azalma, SOD değerinde ise artma görülmekle birlikte farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (Tablo 4.8).

5. TARTIŞMA

β - talasemi, dünya çapında sık görülen otozomal resesif hastalıklardan biridir. İki α globin ve iki β globin ($\alpha_2\beta_2$) zincirinden oluşan Hb molekülünün, β globin zincirlerinin yapımının azlığından (β^+) veya yapımın hiç olmamasından (β^0) kaynaklanır. β - talaseminin, dört klinik ve hematolojik durumu kabul edilir. Klinik durum, α globin ve α olmayan globin zincirleri (örn: γ , ...) arasındaki dengesizliğin derecesine bağlıdır. Eritroid öncülleri içinde, β globin zincirleri azaldığında veya bulunmadığında, eşleştirilmemiş α zincirleri çökelir ve hücre zarının oksidatif hasarına neden olur, bu da etkisiz eritropoez ile sonuçlanır (49,51,136). Her iki β globin geninin bozuk olduğu TM, β -talaseminin klinik olarak en şiddetli formudur. TM'li bireyler genellikle <2 yaş iken tıbbi destek için başvurur ve hastalara düzenli kan transfüzyonu verilir (56,136).

Çeşitli çalışmalarda, TM hastalarının hematolojik (%Hct, Hb, RBC...) ve biyokimyasal (ferritin, glukoz, BUN, kreatinin ...) parametrelerinde değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Eritrosit parametreleri, mikrositik anemi gösterir. TM; azalmış Hb seviyesi (<7 g/dl), MCV>50<70 fl ve MCH>12<20 pg ile karakterize edilir (56). TM hastalarının %Hct ve Hb değerlerinin sağlıklı kontrol grubundan düşük olduğu da daha önce gösterilmiştir (137,138). Aynı şekilde, bizim çalışmamızdaki hasta grubunun %Hct değeri de sağlıklı gruptan düşük bulunurken (TM hastaları: $28,89 \pm 3,15$, sağlıklı grup: $42,43 \pm 4,41$), Hb ve eritrosit sayısı (RBC) da daha önceki bu bulgularla uyumlu olarak, standart referans değerlerden düşük bulunmuştur (137,138). MCV ve MCH değerleri ise düşük görülen çalışmalardan (136,138) farklı olarak standart referans değerlerle uyumlu ancak en düşük değerlere yakın olarak saptanmıştır. Aynı zamanda, hasta grubumuzun kreatinin değerlerinin de standart referans değerlere göre düşük olduğu görülmüştür. Bu, Karim ve ark. tarafından yapılan çalışmanın bulguları ile uyumludur (138) ve TM hastalarında renal disfonksiyonun göstergesi olabilir. Bilirubin, bir hemoglobin yıkım ürünüdür. Eritrosit öncüllerinin dolaşımda anormal ve hızlı yıkımı, bilirubinin artışına neden olur (136). Bizim çalışmamızdaki hasta grubunun bilirubin değerleri, standart referans değerlere göre yüksek bulunmuştur. Bu sonuç, literatürde TM hastalarında bilirubinin yüksek görüldüğü çalışmaların sonuçlarını desteklemektedir (139,140). TM de, α/β zincir dengesizliğinden kaynaklanan etkisiz eritropoez, bilirubinin de artışına neden olabilir. TM'li hastalarda sık transfüzyon nedeniyle, aşırı Fe yüklemesi görülür. Bu, kanda Fe ve ferritin seviyelerinin normalden yüksek, demir bağlama

kapasitesinin de normalden düşük olmasına neden olur. Çalışmamızdaki hasta grubunun ferritin ölçüm değerleri, literatürde kabul edilen normal değerlerden yüksek, demir bağlama kapasitesi de düşük bulunmuştur (139). Aynı zamanda bulguların, Karim ve ark. ile (138) Ayvash ve ark. tarafından yapılan (141) klinik çalışmaların bulgularıyla da benzer olduğu görülmüştür. Yüksek ferritin içeriği, bu hastalarda reaktif Fe'in dokularda birikimi ile doğrudan bağlantılıdır. Aşırı Fe yükü ise, eritrosit membranında oksidatif hasara yol açabilir.

Zn, yüzlerce enzim ve proteinin yapısında görülür, aynı zamanda büyüme ve gelişme için önemlidir. Beslenme yetersizliği nedeniyle oluşabilecek çinko eksikliği; büyüme geriliği, iştahsızlık ve bağışıklık yetersizliği ile karakterize edilir (7,78). TM hastalarında, Zn eksikliğinin yaygın olduğunu gösteren birçok çalışma vardır (9-13,142-144). Mashhadi ve ark. tarafından 333 TM hastası ile yapılan bir çalışmada, tüm hastaların serum Zn seviyesinin normalin altında olduğu gösterilmiştir (142). TM hastalarında, aşırı Fe yükünün oksidatif stresi artırması nedeniyle çinko eksikliği oluşabilir (78). Ayrıca, demir şelasyon tedavisine bağlı olarak hiperzinküri, yüksek ferritin düzeyleri, karaciğer yetmezliği ve besinsel alımın yetersizliği nedeniyle de çinko eksikliği olabilmektedir (9-13,142-144). TM hastalarında gastrointestinal sistemden Fe emiliminin yüksek olduğu daha önceki çalışmalarla bildirilmiştir. Artan Fe emilimi nedeniyle, Zn emiliminin de azalabileceği gösterilmiştir (10-12,78). Çinko eksikliği sonucunda sekonder olarak gelişen, büyüme geriliği ve osteoporoz gibi endokrin komplikasyonlar görülmektedir (10,13). Aynı zamanda bu Zn seviyesi düşüklüğünün, Zn takviyesi ile tersine çevrilebileceği hatta, Zn takviyesinin hastaların doğrusal büyümesini olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir (10,79,80). Swe ve ark. tarafından yapılan, talasemi hastalarında Zn takviyesinin değerlendirildiği bir diğer çalışmada ise; Zn takviyesinin talasemi hastalarının serum Zn seviyesi üzerine bir etkisi olduğu görülmez iken antropometrik ölçümler açısından Zn kullanan talasemi hastalarında, kullanmayan talasemi grubuna (kontrol) göre boy uzama hızında artış olduğu görülmüştür (145). Diğer yandan, TM hastalarında Zn eksikliğinin görülmediği, az sayıda çalışma da bulunmaktadır (146). Bu, düzenli transfüzyonun bir şekilde Zn eksikliğini önlemesinden ve çinkodan zengin kaynakların tüketiminin yaygın olduğu beslenme değişikliklerden kaynaklanıyor olabilir (10).

Çalışmamızın başlangıç kısmında, TM hastalarında ve kontrol grubunda kullanılacak olan Zn düzeyinin belirlenmesi amacıyla, literatürde kullanılan çeşitli Zn dozları ile sağlıklı kişilerde ön çalışmalar yapılarak en uygun doz tespit edilmeye çalışıldı. Bunun için eritrosit deformabilitesi (ED) testleri örnek seçildi. Literatürden belirlediğimiz düşük dozlarda hiç etki etmediğini, yüksek dozlarda ise eritrosit deformabilitesini çok azaltarak olumsuz yönde etkilediğini gördük. Böylece kendimiz deneyerek, sağlıklı kişilerde eritrosit deformabilitesi üzerine olumlu etki yaptığını gördüğümüz en düşük dozu deneylerimiz için kabul ettik. 0,25 – 0,5 – 1 – 2 µg/dl olacak şekilde dört ayrı çinko dozu sınıandı. Sonuç olarak, en uygun dozun, ED’de optimum seviyede artma görülmesi sonucunda 0,5 µg/dl deney dozu olarak uygulandı. Bu ön çalışmalar gerçekleştirilirken, literatürdeki bazı çalışmalarda gibi EDTA’lı tüp kullanılarak yapılan in vitro Zn inkübasyonundan sonra yüksek oranda aglütinasyon görüldü. Bu bulgu, Ollig J ve ark. tarafından yapılan, in vitro Zn inkübasyonu çalışması sonrasında görülen aglütinasyon ile de desteklendi (147). Bu sonuç neticesinde, metot değiştirilerek heparinli tüp kullanıldı. Çinko çözeltisi olarak, daha önce yapılmış in vitro çalışmalara dayanarak, (26,123,148) çinko sülfat kullanıldı. Yine Ollig J ve ark. tarafından yapılan çalışmada, PBS’in çinkoyu çöktirdiği gösterildiğinden (147) deneylerde kullanılan çinko sülfat $[ZnSO_4 \cdot (7H_2O)]$ distile suda çözülerek, ozmolariteyi izoozmolar yapmak için 0,145 M olacak şekilde hazırlandı.

Çalışmamızda, TM hastalarında hemoreolojik parametreler ve bu parametrelerin çinko ile ilişkisini araştırdık. Literatürde, talasemi grubu hastalıklarda, kanın akış davranışı üzerine çinkonun etkisini inceleyen az sayıda çalışma mevcuttur ve bu çalışmalarda incelenen hemoreolojik parametreler, kan viskozitesi ve eritrosit deformabilitesi ile sınırlıdır (22-24,120,121). Yapmış olduğumuz çalışmada ek olarak eritrosit agregasyonu ve ozmotik deformabilite de yer almaktadır.

Çinkonun eritrosit reolojisi üzerine etkisini araştıran çeşitli çalışmalarda, eritrosit deformabilitesini arttırdığı ve agregasyonunu azalttığı gösterilmiştir (25-31,123,124). Zn, eritrositlerin membran yapısında da bulunur (7). Zn eksikliğinin plazma zarı bileşimini değiştirdiği birçok çalışma ile gösterilmiştir (28-30,149,150). Xia ve ark. ile O’Dell ve ark. tarafından, eritrosit membranının sülfidril (SH) içeriği ve eritrosit fonksiyonu üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla çinkodan fakir beslenen sıçanlarla yaptıkları çalışmalarda, diyetset çinko eksikliğinin plazma zarı SH konsantrasyonunu düşürdüğünü

ve bu düşüklüğün, ozmotik frajilite (hemoliz) ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda, ozmotik frajilite artışının tekrar çinkodan zengin beslenme ile düzeldiği gösterilmiştir (29,30). Yine başka bir çalışmada, membran lipid içeriğinde değişiklikler oluşturduğu gösterilmiştir (150). Bununla birlikte, bu bulgulara zıt olarak, diyetel Zn eksikliğinin eritrosit membran proteinlerinin in vitro fosforilasyon ve defosforilasyon paternini değiştirme yoluyla, membran proteinlerinde değişiklikler oluşturarak deformabiliteyi arttırdığını gösteren bir çalışma da bulunmaktadır (149).

Kanın önemli reolojik özelliklerinden biri, eritrosit deformabilitesidir. Özellikle dar kapillerlerden geçerken, eritrositlerin deformabilite özelliği çok önem taşımaktadır. ED; yüzey/hacim oranına (S/V), sitoplazmik viskoziteye ve hücre iskeleti özellikleri ile membran lipid bileşimine bağlı olan zar viskoelastisitesine bağlıdır (15,97). Bizim çalışmamızda, sağlıklı ve TM denek gruplarına ait 10 farklı kayma kuvveti uygulanarak yapılan deformabilite ölçümlerinde, TM ile sağlıklı grubun başlangıç EI değerleri karşılaştırıldığında, 0,94–50 Pa kayma kuvveti ölçüm değerleri arasında, TM hastalarının EI değerleri sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Çalışmamızda saptamış olduğumuz bu sonuçlar, literatürde β ile $\delta\beta$ talasemi taşıyıcılarının ve farklı talasemi grubu hastalarının ED'nin kontrol grubuna göre düşük olduğunu gösteren sonuçlar ile uyumludur (22,23,121,137,151-153). Talasemi sendromlarında ED'nin düşük olması; morfolojik değişikliklerden ve eşleştirilmemiş globin zincirlerinin çökmesinden dolayı eritrosit rijiditesi artışına bağlı olarak membran viskoelastisitesinin azalmasından veya eritrosit membrandaki fosfolipid asimetrisinin bozulmasından kaynaklanabilir (23). Bizim çalışmamızdaki, TM hastalarındaki düşük kayma kuvvetlerinde yapılan ölçümlerde, sağlıklı gruba göre daha azalmış ED görülmesi de bunun bir göstergesidir (154,155).

RDW; eritrosit büyüklüğünün homojenliğini yansıtır ve mikrositik aneminin teşhisinde kullanılır. Anemideki bu RDW artışı, morfolojik değişikliklerle birlikte S/V azalması ile ilişkilidir (24). Patel ve ark. tarafından yapılan çalışmada, RDW'nin >14 değerlerinin, ED'nde azalma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (156). Artaza ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada; 20 β -talasemi hastasının RDW değerinin kontrol grubundan yüksek olduğu (157) gösterilmiştir. Bizim çalışmamızdaki hasta grubunun RDW değeri de, daha önceki bu bulgu ile uyumlu olarak, standart referans değerlerden yüksek bulunmuştur. ED'nin TM hastalarında sağlıklı gruptan düşük bulunması, RDW

ile ED arasındaki negatif ilişki bulgusunu destekler niteliktedir. Zira, hem α - hem de β -talasemi hastalarında RDW ile belirli kayma kuvveti etkilerindeki EI değerleri arasında korelasyon olduğu, Vaya ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (24).

Çalışmamızda; sağlıklı grubun çinko inkübasyonundan önce ve sonra ölçülen EI verilerinin karşılaştırılmasında, 10 farklı kayma kuvveti uygulanarak yapılan EI ölçümlerinde, 1,65–28,32 Pa kayma kuvveti ölçüm değerleri arasında, inkübasyondan sonra anlamlı bir artış olduğu görülmüştür. Bu bulgular, daha önceki çalışmaların bulgularıyla uyumluluk göstermektedir (25-27,123,124). TM hastalarının çinko inkübasyonundan önce ve sonra ölçülen EI verilerinin karşılaştırılmasında ise, 0,53–5,15 Pa kayma kuvveti ölçüm değerleri arasında, inkübasyondan sonra anlamlı bir artış olduğu görülmüştür. 3 Pa'ın üzeri kayma kuvveti ölçüm değerlerinde izotonik ortamda ölçülen ED artışının; S/V'deki artış veya membran elastikiyetindeki artış veya iç viskozitedeki azalma ile ilişkili iken, 3 Pa'ın altındaki kayma kuvveti ölçüm değerlerinde ölçülen ED artışının membran esnekliği artışı ile ilişkili olacağı gösterilmiştir (154,155). Çalışmamızda, TM hastalarındaki düşük kayma kuvvetlerinde yapılan ölçümlerde, inkübasyondan sonra öncesine göre artmış ED görülmesi de membran esnekliğindeki artışın bir göstergesidir. Bulgularımız aynı zamanda, orak hücre anemileri ile yapılan in vitro çalışmalarda ED'nin Zn inkübasyonu sonrası arttığını gösteren çalışmaların bulguları ile uyumludur (26,27,123). Bu, çinkonun eritrosit membran özelliklerini değiştirmesinden kaynaklanabilir (28-30,149,150). Çinko, orak hücrelerin deformabilitesi üzerine, bazı Ca^{2+} kanallarında, Ca^{2+} ile rekabet etme yoluyla bağlanmasını engelleyerek veya hücre iskeletinde aktin ve spektrin ile etkileşime girip eritrosit membranının normal elastikiyetini geri kazandırarak olumlu etki yapabilir. İlaveten, çinko, eritrosit membran üzerindeki sialik asit veya proteinlerin karboksil grupları ile etkileşime girebilir ve eritrosit membran akışkanlığında değişiklik meydana getirebilir (27).

Bizim çalışmamızda, diğer ED parametrelerinden maksimum elongasyonun (EI_{max}) yarısı kadar şekil değiştirmeye neden olan *shear stress* ($SS^{1/2}$) ve EI_{max} 'ın sağlıklı ve TM denek gruplarına ait başlangıç değerleri karşılaştırıldığında; TM hastalarının $SS^{1/2}$ değerlerinin sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek, EI_{max} değerinin ise düşük olduğu görülmüştür. Talasemik eritrositlerin EI_{max} değerinin düşük olması, membran rijiditesindeki artıştan kaynaklanmaktadır (158). Sağlıklı grubun çinko

inkübasyonundan önce ve sonra ölçülen $SS\frac{1}{2}$ ve EI_{max} verilerinin karşılaştırılmasında, $SS\frac{1}{2}$ değerinde, inkübasyondan sonra istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülürken, EI_{max} değerinde anlamlı bir fark görülememiştir. TM hastalarının $SS\frac{1}{2}$ ve EI_{max} değerlerine ait veriler incelendiğinde de $SS\frac{1}{2}$ değerinde, inkübasyondan sonra istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görülürken, EI_{max} değerindeki fark, istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. $SS\frac{1}{2}$ değerinin azalması, eritrosit deformabilitesinde artma olduğunun göstergesi olarak kabul edilmektedir (130-132). Talasemi ile ilgili olarak literatürde bulduğumuz hemoreolojik çalışmalarda, $SS\frac{1}{2}$ değeri hesaplanmamıştır. Bu nedenle bu parametreyi başka çalışmalara göre tartışmadık.

Kanın bir diğer önemli reolojik özelliği de, kan akımının azaldığı durumlarda, rulo olarak adlandırılan ve üst üste gelmiş bozuk para yığınları gibi düzenlendiği, doğrusal diziler (agregatlar) oluşturma eğilimidir. Çeşitli plazma proteinleri ve büyük molekül ağırlıklı polimerler (örn. dekstran), eritrositlere etki eden kayma kuvvetlerinin büyüklüğüne bağlı olarak, agregasyonu teşvik eder (15,87,112). Yapılan araştırmalar, agregasyon artışının kan viskozitesini artırdığını ve dokulardaki perfüzyonun bozulmasına neden olduğunu göstermiştir (15,91). Chen ve ark. tarafından yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre; TM hastalarında, trombotik olayların gelişimi ile ilişkili olabilecek eritrosit agregasyonunun arttığı bildirilmiştir (159). Bizim çalışmamızda sağlıklı ve TM denek gruplarına ait inkübasyondan önce yapılan ölçümlerdeki AMP, AI ve $t\frac{1}{2}$ değerleri karşılaştırıldığında, TM hastalarının AMP değerinin sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görülürken, AI ve $t\frac{1}{2}$ değerlerinde anlamlı bir fark görülmemiştir. AMP ve AI değerinin azalması ile $t\frac{1}{2}$ değerinin artması; eritrosit agregasyonunda azalma olduğunun göstergesi olarak kabul edilmektedir (117). O nedenle sonuçlarımız, TM hastalarının agregasyon eğiliminin daha yüksek olduğunu ve bu nedenle bir risk grubu oluşturduğunu göstermiştir. Çalışmamızda saptamış olduğumuz bu sonuçlar, Chen ve ark. tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur (159).

Sağlıklı grubun çinko inkübasyonundan sonraki agregasyon parametrelerinin incelenmesinde, AI değerinde, inkübasyondan sonra anlamlı bir azalma olduğu görülürken, $t\frac{1}{2}$ değerinde ise artma olduğu görülmüştür. Bulgularımız, daha önce Khaled ve ark. tarafından sporcularda Zn takviyesinin eritrosit agregasyonunu azalttığını (25) ve in vitro çinko inkübasyonunun eritrosit agregasyonunu azalttığını (31) gösteren

çalışmaların sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir. Bu, çinkonun; hücre bütünlüğünü devam ettirmek amacıyla direkt membran üzerine etkisi ve/veya Ca ile rekabet ederek Hb-membran etkileşimini değiştirme etkisi veya plazma proteinleri ile eritrosit membran arasındaki etkileşimi ile ilgili olabilir (31). TM hastalarının AMP, AI ve $t_{1/2}$ değerlerine ait veriler incelendiğinde ise AMP değerinde, inkübasyondan sonra istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür. Bu bulgu, çinko inkübasyonunun agregasyonu azalttığına bir göstergesidir. AI’de görülen azalma ve $t_{1/2}$ ’de görülen artma istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte agregasyonun azalması şeklinde bir eğilimi yansıtmaktadır. Sonuçlarımıza göre, çinko TM hastalarında eritrosit agregasyonunu azaltmaktadır.

Ozmotik gradyan ektasitometre; eritrosit süspansiyonunun deformabilitesini, sabit bir kayma geriliminde (30 Pa), ortamın ozmolaritesini 50 mOsmol/kg’dan 600 mOsmol/kg’ a kadar kademeli olarak değiştirerek ölçer. Ektasitometrenin bu özelliğinden yararlanarak; eritrosit ozmotik fragilitesi, hücre yüzey alanı, hücre hacmi, eritrosit hidrasyon durumu ve deformabilitesi hakkında bilgi sağlanır. Bu ölçüm; kalıtsal sferositoz (HS), eliptositoz, propoilositoz ve kalıtsal stomatositoz gibi eritrosit membran hastalıklarını teşhis etmek için referans teknik olarak kabul edilmektedir (107,154). Çalışmamızda, sağlıklı ve TM denek gruplarına ait ozmotik deformabilite parametrelerinin (EI_{min} , EI_{max} , EI_{hyper} , Area, O_{min} , O_{max} ve O_{hyper}) başlangıç değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, TM hastalarının; O_{min} , O_{max} ve O_{hyper} değerlerinin anlamlı şekilde düşük olduğu görülmüştür. Bulgularımız, daha önce Singer ve ark. tarafından 15 HbE/ β talasemi hastası ile yapılmış ve O_{min} , O_{max} ve O_{hyper} değerlerini kontrol grubuna göre (normal eritrositler) düşük buldukları çalışmanın sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir (160). O_{min} ; EI_{min} ’in olduğu ozmolalite değeri olmakla birlikte aynı zamanda S/V’yi yansıtır ve ozmotik fragilite ile ilişkilidir (154,158). Buna dayanarak, TM hastalarının O_{min} değerinin düşük olması; S/V’de artış meydana gelmesi ve/veya membran rijiditesinde artış meydana gelmesinden kaynaklanabilir. TM hastalarının eritrositleri, hacim olarak normal eritrositlerden küçük olmakla birlikte, normal eritrositlere yakın bir yüzey alanına sahiptir. Bu nedenle TM eritrositleri yüksek S/V’na sahiptir, aynı zamanda da ozmotik olarak daha dirençli olurlar (158,160). Bulgularımızda da görüldüğü gibi, talasemilerde O_{min} ’in sola kayması, fragilitenin azalmasının bir göstergesidir. Bunun da nedeni yukarıda bahsedilen S/V’nin artışıdır. Sonuç olarak bu nokta, aynı zamanda ED’nin de en düşük olduğu (EI_{min}) yerdir. Bu

Desouky ve ark. tarafından 20 TM hastası ile yapılan ve ozmotik frajilitenin sağlıklı kontrol grubundan düşük görüldüğü çalışmanın bulgusuyla da uyumludur (120). Çalışmamızda, TM hastalarının O_{min} ile birlikte O_{hyper} değerinin de düşmesi eğriyi sola kaydırır ve aynı zamanda deformabilite azalır. O_{hyper} noktasının sola kayarak deformabilitenin azalması ise, eritrositlerin dehidrasyona uğrayarak MCHC artışına neden olmasından ve dolayısıyla sitoplazmik viskozitenin artmasından kaynaklanmaktadır (158,160).

Sağlıklı grubun, çinko inkübasyonundan önce ve sonra ölçülen ozmotik deformabilite parametrelerinin istatistiksel karşılaştırılmasında, inkübasyondan sonra anlamlı bir fark oluşmamıştır. TM hastalarının; EL_{max} , Area ve O_{max} değerlerinde ise inkübasyondan sonra anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür. Diğer parametrelerde görülen farklar ise anlamlı bulunmamıştır. Yaptığımız literatür taramasında; çinkonun, talasemik eritrositlerin ozmotik deformabilitesi üzerine etkisini inceleyen benzer bir çalışmaya rastlayamadık. O nedenle bu konudaki bulgularımızın, özgün olduğunu düşünüyoruz.

Oksidatif stres; fazla miktarda serbest radikal üretimi nedeniyle vücuttaki oksidan ile antioksidan arasındaki dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır. Bu dengesiz durum, vücuttaki hücre ve dokularda hasara neden olur. Şiddetli anemi nedeniyle sık olarak kan transfüzyonu gerektiren TM hastalarında ise oksidatif stres, artmış lipid peroksit seviyelerinin ve serbest radikallerin yanı sıra antioksidan kapasitedeki azalmanın bir sonucu olarak ortaya çıkar (161). TM hastalarında tekrarlanan kan transfüzyonları, aşırı demir yüklenmesine neden olur. Bu durum, eritrositleri peroksidatif hasara uğratar. Antioksidan sistemler ise lipid peroksidasyonunu düşürerek doku hasarını azaltmaya çalışır. TM hastalarında, oksidatif stresin vücutta yaratabileceği zararlı etkileri engellemek için çeşitli antioksidan enzim sistemleri aktive olur. SOD, CAT ve GPx, bu enzimler arasında sayılır (161). MDA ise, bir lipid peroksidasyon ürünüdür ve lipid peroksidasyonunun belirleyicisi olarak kullanılmaktadır (128). Daha önce Abdalla ve ark. (162) ile Hossain ve ark. (163) tarafından yapılan çalışmalarda; MDA ve SOD seviyesinin TM hastalarında, sağlıklı kontrole göre anlamlı derecede yüksek, CAT seviyesinin ise düşük olduğu gösterilmiştir. Naithani ve ark. (164) tarafından TM çocuklar ile yapılan çalışmada ise; SOD ve CAT enzimleri ile MDA'ya ilave olarak GPx enzim aktivitesinin de kontrole göre düşük olduğu gösterilmiştir. Bu yüksek MDA seviyesi, tekrarlanan kan

transfüzyonları nedeniyle aşırı demir yüklemesinden ve hemen sonrasında oluşan oksidatif strese kaynaklanabilir. SOD enzimidaki yüksek değere, oksidatif strese cevap olarak telafi edici mekanizmaların bir sonucu olarak ortaya çıkabilir. β - talasemide artmış SOD aktivitesi, süperoksit radikalının temizlenmesinde, böylece eritrositlerde daha fazla H_2O_2 üretilmesinde rol oynayabilir (165). CAT aktivitesinin düşük olmasının da, bu enzimin aktivitesinin korunmasında önemli olan NADPH'nin TM hastalarında düşük bulunmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür (162). Bizim çalışmamızda da; çinko inkübasyonu öncesi (başlangıç), sağlıklı ve TM gruplarına ait GPx, CAT, SOD ve MDA değerleri istatistiksel olarak karşılaştırılmış, TM hastalarının GPx, SOD ve MDA değerlerinin sağlıklı gruba göre yüksek, CAT değerinin ise düşük olduğu görülmüş ancak aradaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.

Çinko, sahip olduğu çeşitli özelliklere ek olarak antioksidan aktiviteye de sahiptir. Süperoksit ve MDA gibi serbest radikallerin üretimini kısıtlar. Bununla birlikte Zn eksikliğinde, çeşitli dokularda ROS kaynaklı hasar riskinin arttığı ve GSH gibi çeşitli antioksidan enzimlerin seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir. Zn eksikliğinde, lipid peroksidasyonu nedeniyle artan doku hasarının çinko takviyesi ile önlenebileceği de daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir (166). Daha önce yapılan deneysel bir çalışmada; çinko seviyesi normal olan sıçan grubunda, çinko takviyesinden sonra MDA seviyesinde anlamlı bir azalma görülürken SOD seviyesinde herhangi bir değişiklik görülmeyişi bildirilmiştir. Aynı çalışmada, çinko eksikliği görülen sıçan grubunda ise çinko takviyesinden sonra MDA seviyesinde anlamlı bir azalma, SOD seviyesinde ise anlamlı bir artma görülmüştür (167). Bizim çalışmamızda sağlıklı grubun istatistiksel incelenmesinde; SOD ve MDA değerlerinde artma olduğu görülürken aradaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Çalışmamızın TM hastalarına ait enzim aktiviteleri incelendiğinde de; GPx, CAT ve MDA değerlerinde inkübasyondan sonra azalma, SOD değerinde ise artma görülmekle birlikte, farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Sonuçlarımız daha önceden Rashidi ve ark. tarafından 120 TM hastası ile yapılan çalışmanın bulguları ile benzerlik göstermektedir (165). GPx aktivitesinde görülen azalmanın çinko takviyesinin, bu enzim üzerine koruyucu ve antioksidan durumu yükseltici etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir (165).

Sonuç olarak, bulgularımıza toplu olarak bir değerlendirme yaparsak; çalışmamız bize, TM hastalarının eritrositlerinde, sağlıklı eritrositlere göre daha düşük eritrosit

deformabilitesi, daha yüksek bir eritrosit agregasyonu ve daha düşük ozmotik deformabilite bulguları ile ifade edebileceğimiz eritrosit reolojik bozuklukları olduğunu göstermiştir. Bu durum, TM hastalarının, diğer bilinen sorunlarının yanında mikrodolaşımla ilişkili bir risk grubu oluşturduğunu da göstermektedir. Çinko inkübasyonundan sonra ise; her iki grupta da eritrosit deformabilitesinde artış, eritrosit agregasyonunda azalma görülmüştür ve bizim görüşümüze göre bu bulgu, çinko takviyesinin TM hastalarındaki mikrodolaşımla ilgili riskleri azaltacağını göstermesi bakımından dikkate almaya değerdir. Ancak, TM grubunun inkübasyondan sonra elde edilen bulguları, sağlıklı grubun başlangıç değerleri ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, talasemik eritrositlerin çinko inkübasyonu sonrası değerlerinin, yine de sağlıklı eritrositlerin başlangıç seviyesine ulaşamadığı görüldü. Böylece çalışmamızın, çinkonun talasemik eritrositler üzerine bu olumlu etkisinin, hastalarda mikrodolaşımla ilgili risklerin yanında beklenen anemiye bağlı oluşabilecek komplikasyonların da azalması ya da önlenmesine ayrıca tedavi kalitesini arttırmaya katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Bu çalışmadaki ön çalışmalarımız sırasında, denediğimiz bazı yüksek dozların eritrosit deformabilitesini çok azalttığını hatta eritrositlere zarar verdiğini gördük. O nedenle sağlıklı eritrositlerde olumlu etki ettiğini gördüğümüz daha az bir dozu deneylerimiz için seçtik. TM grubunda ise alınabilen kan miktarları, hastaların özel durumlarından ötürü yeterli olmadığı için, doz denemesi yapamadık. Ancak, ileride her parametre ölçümünü ayrı çalışmak koşulu ile bir doz çalışması yaparak, TM hastaları için daha etkili bir çinko dozu araştırmayı da şimdiden planladık ve bunun hem gerekli hem de hastalar için faydalı olacağı düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes, 4th ed. Oxford: Blackwell Scientific; Part 1 Historical background, Chapter 1 Historical perspectives: the many and diverse routes to our current understanding of the thalassaemias:3-62; 2001.
2. Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes, 4th ed. Oxford: Blackwell Scientific; Part 2 The biology of the thalassaemias, Chapter 2 Human haemoglobin: 65-120; 2001.
3. Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes, 4th ed. Oxford: Blackwell Scientific; Part 2 The biology of the thalassaemias, Chapter 3 Thalassaemia:classification, genetics and relationship to other inherited disorders of haemoglobin:121-132; 2001.
4. Taher AT, Weatherall DJ, Cappellini MD, Thalassaemia, Lancet, 2018, Jan 13;391(10116):155-167. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31822-6. Epub 2017 Jul 31.
5. Rund D, Rachmilewitz E, Pathophysiology of alpha- and beta-thalassemia: therapeutic implications, Semin Hematol, 2001; 38(4):343-9.
6. Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes, 4th ed. Oxford: Blackwell Scientific; Part 3: Clinical features of the thalassaemias, Chapter 11: The α thalassaemias and their interactions with structural haemoglobin variants:484-526; 2001.
7. Walsh CT, Sandstead HH, Prasad AS, Newberne PM, Fraker PJ, Zinc: Health Effects and Research Priorities for the 1990s, Environ Health Perspect, 1994, Jun;102 Suppl 2:5-46.
8. Prasad AS, Zinc in human health: Effect of zinc on immune cells, Journal of Molecular Medicine, 2008, 14(5-6): 353-357.
9. Arcasoy A, Canata D, Sinav B, Kutlay L, Oguz N, Sen M, Serum zinc levels and zinc binding capacity in thalassemia, J Trace Elem Med Biol, 2001; 15; 85-87.
10. Karunaratna AMDS, Ranasinghna JGS, Mudiyanse RM, Zinc status in beta thalassemia major patients, Biol Trace Elem Res, 2017, doi: 10.1007/s12011-017-1158-0.
11. Mahyar A, Ayazi P, Pahlevan AA, Mojabi H, Sehhat MR, Javadi A, Zinc and copper status in children with Beta-thalassemia major, Iran J Pediatr, 2010, Sep;20(3):297-302.

12. Zekavat OR, Bahmanjahromi A, Haghpanah S, Ebrahimi S, Cohan N, The Zinc and Copper Levels in Thalassemia Major Patients, Receiving Iron Chelation Therapy, *J Pediatr Hematol Oncol*, 2018, Apr;40(3):178-181. doi: 10.1097/MPH.0000000000001102.
13. Sultan S, Irfan SM, Kakar J, Zeeshan R, Effect of iron chelator desferrioxamine on serum zinc levels in patients with beta thalassemia major, *Malays J Pathol*, 2015, Apr;37(1):35-8.
14. Copley AL, Fluid mechanics and biorheology, *Thromb Res*, 1990, 1; 57 (3): 315-31.
15. Baskurt OK, Meiselman HJ, Blood rheology and hemodynamics, *Semin Thromb Hemost*, 2003, Oct;29(5):435-50.
16. Lowe G, Rumley A, Norrie J, Ford I, Shepherd J, Cobbe S, Macfarlane P, Packard C, Blood rheology, cardiovascular risk factors, and cardiovascular disease: the West of Scotland Coronary Prevention Study, *Thromb Haemost*, 2000, Oct;84(4):553-8.
17. Sinan M, Ertan NZ, Mirasoglu B, Yalcin O, Atac N, Toklu AS, Basaran-Kucukgergin C, Baskurt OK, Acute and long-term effects of hyperbaric oxygen therapy on hemorheological parameters in patients with various disorders, *Clin Hemorheol Microcirc*, 2016;62(1):79-88. doi: 10.3233/CH-151952.
18. Holsworth RE Jr, Cho YI, Weidman JJ, Sloop GD, St Cyr JA, Cardiovascular benefits of phlebotomy: relationship to changes in hemorheological variables, *Perfusion*, 2014, Mar;29(2):102-16.
19. Tikhomirova A, Oslyakkova AO, Mikhailova SG, Microcirculation and blood rheology in patients with cerebrovascular disorders, *Clin Hemorheol Microcirc*, 2011;49(1-4):295-305.
20. Cho YI, Mooney MP, Cho DJ, Hemorheological disorders in diabetes mellitus, *J Diabetes Sci Technol*, 2008, Nov;2(6):1130-8.
21. Meiselman HJ, Baskurt OK, Hemorheology and hemodynamics: Dove andare?, *Clin Hemorheol Microcirc*, 2006;35(1-2):37-43.

22. Vayá A, Suescun M, Hernández JL, Pérez ML, Palanca S, Laiz B, Rheological red blood cell behaviour in minor α -thalassaemia carriers, *Clin Hemorheol Microcirc*, 2011, 48(4):241-6.
23. Vaya A, Iborra J, Falco C, Moreno I, Bolufer P, Ferrando F, Perez ML, Aznar J, Rheological behaviour of red blood cells in beta and deltabeta thalassemia trait, *Clin Hemorheol Microcirc*, 2003, 28(2), 71–78.
24. Vayá A, Alis R, Suescún M, Rivera L, Murado J, Romagnoli M, Solá E, Hernandez-Mijares A, Association of erythrocyte deformability with red blood cell distribution width in metabolic diseases and thalassemia trait, *Clin Hemorheol Microcirc*, 2015, 61(3):407-15.
25. Khaled S, Brun JF, Cassanas G, Bardet L, Orsetti A, Effects of zinc supplementation on blood rheology during exercise, *Clin Hemorheol Microcirc*, 1999, 20(1):1-10.
26. Taylor JA, Acharya J, Pearson TC, Thompson RP, Zinc improves the filterability of sickle erythrocytes at intermediate oxygen partial pressures, *Clin Sci (Lond)*, 1991, Sep;81(3):433-8.
27. Dupuy-Fons C, Brun JF, Mallart C, Carvajal J, Fussellier M, Bardet L, Orsetti A, In vitro influence of zinc and magnesium on the deformability of red blood cells artificially hardened by heating, *Biol Trace Elem Res*, 1995, Jan-Mar;47(1-3):247-55.
28. O'Dell BL, Role of zinc in plasma membrane function, *J nutr*, 2000, May;130(5S Suppl):1432S-6S. doi: 10.1093/jn/130.5.1432S.
29. Xia J, Browning JD, O'Dell BL, Decreased plasma membrane thiol concentration associated with increased fragility of erythrocytes in zinc deficient rats, *J Nutr*, 1999,129; 814-819.
30. O'Dell BL, Browning JD, Reeves PG, Zinc deficiency increases the osmotic fragility of rat erythrocytes, *J Nutr*, 1987, Nov;117(11):1883-9.
31. Khaled S, Brun JF, Cassanas G, Bardet L, Mercier J, Préfaut C, In vitro effects of zinc gluconate and acetate on red cell aggregability, *Clin Hemorheol Microcirc*, 2000, 22(4):325-9.

32. Talasemi ve Hemoglobinopatiler: Tanı ve Tedavi, Ed: Duran Canatan, Yeşim Aydınok, Bölüm I: Dünyada ve Türkiye’de Talasemi ve Anormal Hemoglobinler, Duran Canatan, 2007, sf:11-19, Talasemi Federasyonu.

33. Canatan D, Talasemi ve Hemoglobinopatilerin Dünya ve Türkiye’de durumu. In: D.Canatan (editör), Türkiye Klinikleri Journal of Hematology Oncology-Special Topics, 2010; 3(1):1-4.

34. Çavdar A, Arcasoy A, The incidence of beta-thalassemia and anormal hemoglobins in Turkey, Acta Hematol, 1971, 45: 313-318.

35. Akar N, Çavdar A, Dessi E, Loi A, Pirastu M, Cao A, Beta thalassemia mutations in the Turkish population, J Med Genet, 1987, 24: 378-379.

36. Altay Ç, Abnormal hemoglobins in Turkey, Turk J Haematol, 2002; 19:63-74.

37. Bilenoglu O, Tadmouri GO, Başak AN, The molecular basis of beta thalassemia in Turkey, 2nd International Thalassemia Summerschool on Thallasemia, North Cyprus, 2002; 9-23.

38. Ganong’un Tıbbi Fizyolojisi, Bölüm 31: Bir Dolaşım Sıvısı Olarak Kan ve Lenf Akımının Dinamikleri, Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL, Çeviri Ed: Gökbel H, 2015, Nobel Tıp Kitabevleri, 24. Baskı, sf: 555- 86.

39. Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji, Hall JE, Bölüm 32, Alyuvarlar, Anemi ve Polisitemi Çev Ed: Çağlayan Yeğen B, 2013, Nobel Tıp Kitabevleri ,12. Baskı, sf: 413-22.

40. Reece, Jane B, Campbell biology, Unit 1: The Chemistry of Life, The Structure and Function of Large Biological Molecules, 2011, Pearson Education, Tenth edition, 66-91.

41. Grosveld F, Dillon N, Higgs D, The regulation of human globin gene expression, Baillieres Clin Haematol, 1993; 6(1): 31-55.

42. Bunn HF, Nathan DG, Thalassemia. In: Bunn HF, Aster JC, eds. Pathophysiology of blood disorders. New York: McGraw-Hill, 2011; 93–104.

43. Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G, Thalassaemia, Lancet, 2012, 379: 373–83.

44. Musallam KM, Rivella S, Vichinsky E, Rachmilewitz EA, Non-transfusion-dependent thalassemias, *Haematologica*, 2013, 98: 833–44.
45. Rivella S, The role of ineffective erythropoiesis in non-transfusion-dependent thalassemia, *Blood Rev*, 2012, 26 (suppl 1): S12–15.
46. Taher AT, Musallam KM, Saliba AN, Garziadei G, Cappellini MD, Hemoglobin level and morbidity in non-transfusion-dependent thalassemia, *Blood Cells Mol Dis*, 2015, 55: 108–09.
47. Haidar R, Mhaidli H, Taher AT, Paraspinal extramedullary hematopoiesis in patients with thalassemia intermedia, *Eur Spine J*, 2010; 19: 871–78.
48. Hartevelde CL, Higgs DR, Alpha-thalassaemia, *Orphanet J Rare Dis*, 2010, May 28;5:13. doi: 10.1186/1750-1172-5-13.
49. Galanello R, Origa R, Beta thalassemia, *Orphanet J Rare Dis*, 2010, May 21;5:11. doi: 10.1186/1750-1172-5-11.
50. Karimi M, Cohan N, De Sanctis V, Mallat NS, Taher A, Guidelines for diagnosis and management of Beta-thalassemia intermedia, *Pediatr Hematol Oncol*, 2014, Oct;31(7):583-96.
51. Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes, 4th ed. Oxford: Blackwell Scientific; Part 2: The biology of the thalassaemias, Chapter 5: The pathophysiology of the thalassaemias:192-237; 2001.
52. Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes, 4th ed. Oxford: Blackwell Scientific; Part 2: The biology of the thalassaemias, Chapter 4: The molecular pathology of the thalassaemias: 133-192; 2001.
53. Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes, 4th ed. Oxford: Blackwell Scientific; Part 3: Clinical features of the thalassaemias, Chapter 7: The β thalassaemias: 287-357; 2001.
54. Talasemi ve Hemoglobinopatiler: Tanı ve Tedavi, Ed: Duran Canatan, Yeşim Aydınok, Bölüm XXVII: Talasemi İntermedia, Fatma Gümrük, 2007, sf:247-253, Talasemi Federasyonu.

55. Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes, 4th ed. Oxford: Blackwell Scientific; Part 3: Clinical features of the thalassaemias, Chapter 13: Thallasaemia intermedia: 550-597; 2001.

56. Origa R, Beta-Thalassemia, In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A, editors. SourceGeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018, 2000 Sep 28 [updated 2018 Jan 25].

57. Cappellini MD, Cohen A, Porter J, Taher A, Viprakasit V (eds). Guidelines for the Management of Transfusion Dependent Thalassaemia (TDT), 3rd ed, 2014, TIF Publication No. 20. Thalassaemia International Federation: Nicosia, Cyprus.

58. Borgna-Pignatti C, Cappellini MD, De Stefano P, Del Vecchio GC, Forni GL, Gamberini MR, Ghilardi R, Piga A, Romeo MA, Zhao H, Cnaan A, Cardiac morbidity and mortality in deferoxamine- or deferiprone-treated patients with thalassemia major, *Blood*, 2006;107:3733–3737.

59. Galanello R, Origa R. Once-daily oral deferasirox for the treatment of transfusional iron overload, *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2008;1:231–240.

60. Locatelli F, Kabbara N, Ruggeri A, Ghavamzadeh A, Roberts I, Li CK, Bernaudin F, Vermylen C, Dalle JH, Stein J, Wynn R, Cordonnier C, Pinto F, Angelucci E, Socié G, Gluckman E, Walters MC, Rocha V; Eurocord and European Blood and Marrow Transplantation (EBMT) group, Outcome of patients with hemoglobinopathies given either cord blood or bone marrow transplantation from an HLA-identical sibling, *Blood*, 2013, 122:1072–78.

61. Weatherall DJ, The definition and epidemiology of non-transfusion-dependent thalassemia, *Blood Rev*, 2012, Apr;26 Suppl 1:S3-6. doi: 10.1016/S0268-960X(12)70003-6.

62. Prasad A, Miale A, Farid Z, Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism and hypogonadism, *J. Lab.Clin.Med*, 1963; 61:537.

63. Barceloux D, Zinc, *Clinical Toxicology*, 1999; 37(2): 279-92.

64. Taneli B, Anadolu toplumunda çinko, *Ege Tıp Dergisi*, 2005, 44(1): 1-10.

65. Whitehouse RC, Prasad AS, Rabbani PI, Cossack ZT, Zinc in plasma, neutrophils, lymphocytes, and erythrocytes as determined by flameless atomic absorption spectrophotometry, Clin Chem, 1982, 28:475-480.
66. Wood R, Assessment of marginal zinc status in human, J Nutr, 2000; 130 (2S Suppl): 1350-1355S.
67. Akdeniz V, Kınık Ö, Yerlikaya O, Akan E, İnsan Sağlığı ve Beslenme Fizyolojisi Açısından Çinkonun Önemi, Akademik Gıda, 2016, 14(3), 307-14.
68. Gropper SS, Smith JL, Advanced Nutrition and Human Metabolism, Fifth ed. USA: Wads worth cengage learning, 2009; P.429-512.
69. Bremner I, Beattie JH, Metallothionein and the trace minerals, Annu Rev Nutr, 1990, 10:63-83.
70. David BM, Trace elements, In: Carl AB, Edward RA (eds): Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Philadelphia, W. B. Saunders Company, Pp, 1999; 1029-55.
71. Krebs NF, Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract, J Nutr 2000,130 (2S Suppl):1374-77.
72. Tubek S, Grzanka P, Tubek I, Role of Zinc in Hemostasis: A Review, Biol Trace Elem Res, 2008, Jan;121(1):1-8. Epub 2007 Oct 30.
73. Mocchegiani R, Giacconi R, Muzzioli M and Cipriano C, Zinc, Infections And Immunosenescence, Mech Aging Develop, 2001; 21 – 35:121.
74. McCall KA, Huang C, Fierke CA, Function and mechanism of zinc metalloenzymes, J Nutr, 2000; 130 (2S Suppl): 1437S-1446S.
75. Belgemen T, Akar N, Çinkonun yaşamsal fonksiyonları ve çinko metabolizması ile ilişkili genler, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, 2004, 57(3): 161-166.
76. Prasad AS, Clinical spectrum and diagnostic aspects of human zinc deficiency, In: Essential and toxic trace elements in human health and disease, Prasad AS, ed. New York:Alan R. Liss, 1988;3-53.
77. Nidumuru S, Boddula V, Vadakedath S, Kolanu BR, Kandi V, Evaluating the Role of Zinc in Beta Thalassemia Major: A Prospective Case-Control Study from a

Tertiary Care Teaching Hospital in India, Cureus, 2017, Jul 20;9(7):e1495. doi: 10.7759/cureus.1495.

78. Ozturk Z, Genc GE, Gumuslu S, Minerals in thalassaemia major patients: An overview, J Trace Elem Med Biol, 2017, May;41:1-9. doi: 10.1016/j.jtemb.2017.01.001. Epub 2017 Jan 16.

79. Arcasoy A, Cavdar A, Cin S, Erten J, Babacan E, Gözdasoglu S, Akar N, Effects of zinc supplementation on linear growth in beta-thalassemia (a new approach), Am J Hematol, 1987, 24(2):127–136.

80. Bhardwaj A, Swe KM, Sinha NK, Osunkwo I, Treatment for osteoporosis in people with β -thalassaemia, Cochrane Database Syst Rev, 2016, Mar 10;3:CD010429. doi: 10.1002/14651858.CD010429.pub2.

81. Merrill EW, Rheology of Blood, Physiol Rev, 1969, 49: 863-88.

82. Piagnerelli M, Zouaoui Boudjeltia K, Vanhaeverbeek M, Vincent JL, Red blood cell rheology in sepsis, Intensive Care Medicine, 2003, 29, 1052-1061.

83. Vander İnsan Fizyolojisi: Vücut Fonksiyon Mekanizmaları, Widmaier EP, Raff H, Strang KT, Çev Ed: Özgünen T, Güneş Tıp Kitabevleri, 2014, 13.baskı.

84. Lowe GDO, Barbenel JC, Plasma and blood viscosity, In: Lowe GDO, ed. Clinical Blood Rheology, Vol 1. Boca Raton, FL: CRC Press; 1988:11–44.

85. Ross J, Schmid-Schönbein G, Dynamics of the peripheral circulation, In: West JB, ed. Physiological Basis of Medical Practice, Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1990:138–58.

86. Hartwell SK, Grudpan K, Flow-based systems for rapid and high-precision enzyme kinetics studies, Journal of analytical methods in chemistry, 2012; 2012: 450716.

87. Rampling MW, Red cell aggregation and yield stress, In: Lowe GDO, ed. Clinical Blood Rheology, Boca Raton, FL: CRC Press; 1988:11–44.

88. Cokelet GR, Meiselman HJ, Blood rheology, In: Baskurt OK, Hardeman MR, Rampling MW and Meiselman HJ ed. Handbook of Hemorheology and Hemodynamics. Washington, DC: IOS Press; 2007, pp. 45–71.

89. Stoltz JF, Singh M, Riha P, Hemorheology in Practice, 1999, Wahington DC: IOS Press.
90. Rosencranz R, Bogen SA, Clinical laboratory measurement of serum, plasma and blood viscosity, Am J Clin Pathol, 2006, Jun;125 Suppl:S78-86.
91. Baskurt OK, Pathophysiological Significance of Blood Rheology, Turk J Med Sci, 2003; (33), 347-55.
92. Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji, Hall JE, Bölüm 14; Dolaşım Sistemine Genel Bakış; Basınç, Akım ve Direncin Biyofiziği, Çev Ed: Çağlayan Yeğen B, 2013, Nobel Tıp Kitabevleri, 12. Baskı, sf: 157-67.
93. Yalcin O, Aydin F, Ulker P, Uyuklu M, Gungor F, Armstrong JK, Meiselman HJ, Baskurt OK, Effects of red blood cell aggregation on myocardial hematocrit gradient using two approaches to increase aggregation, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, Feb;290(2):H765-71. Epub 2005 Sep 19.
94. Yalcin O, Ulker P, Yavuzer U, Meiselman HJ, Baskurt OK, Nitric oxide generation by endothelial cells exposed to shear stress in glass tubes perfused with red blood cell suspensions: role of aggregation, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, May 294(5):H2098-105.
95. Somer T, Meiselman HJ, Disorders of blood viscosity, Ann Med, 1993, 25: 31–9.
96. Ciesla B, Red Blood Cell Production, Function, and Relevant Red Cell Morphology, Hematology In Practise, F.A. Davis Company, Philadelphia, 2007, Ch 3: 33-49.
97. Mohandas N, Gallagher PG, Red cell membrane: past, present, and future, Blood, 2008, Nov 15;112(10):3939-48. doi: 10.1182/blood-2008-07-161166.
98. Mohandas N, Chasis JA, Shohet SB, The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape, Semin Hematol, 1983, 20: 225-42.
99. Chien S, Red cell deformability and its relevance to blood flow, Annu Rev Physiol, 1987, 49: 177–92.

100. <http://necdetersoztip.blogspot.com/2015/11/kan-histolojisi.html>, İnternet erişim tarihi: 23.09.2019
101. Mohandas N, Molecular basis for red cell membrane viscoelastic properties, *Biochem Soc Trans*, 1992, 20:776-82.
102. Zwaal RF, Schroit AJ, Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells, *Blood*, 1997, 89:1121-32.
103. Bennett V, Proteins involved in membrane–cytoskeleton association in human erythrocytes: spectrin, ankyrin, and band 3, *Methods Enzymol*, 1983, 96:313-24.
104. Liu SC, Derick LH, Palek J, Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton, *J Cell Biol*, 1987, 104; 527-36.
105. Molecular biology of the cell / Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter ; with problems by John Wilson, Tim Hunt., Ch 10: membran structure -- Sixth edition. Garland Science, Taylor & Francis Group, 2015, p: 565-98.
106. Mohandas N, Shohet SB. The role of membrane associated enzymes in regulation of erythrocyte shape and deformability, *Clin Hematol*, 1981;10:223–237
107. Clark MR, Mohandas N, Shohet SB, Osmotic gradient ektacytometry: Comprehensive characterization of red cell volume and surface maintenance, *Blood* 61, 1983, 899–910.
108. Mohandas N, Chasis JA, Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids, *Semin Hematol*, 1993, 30: 171-92.
109. Chien S, Principles and techniques for assessing erythrocyte deformability, *Blood Cells*, 1977;3:71–95 .
110. Baskurt OK, Fisher TC, Meiselman HJ, Sensitivity of the cell transit analyzer (CTA) to alterations of red blood cell deformability: role of cell size-pore size ratio and sample preparation, *Clin Hemorheol*, 1996, 16:753–65.
111. Hardeman MR, Goedhart PT, Dobbe JGG, Lettinga KP, Laser assisted optical rotational cell analyzer (LORCA): a new instrument for measurement of various structural hemorheological parameters, *Clin Hemorheol Microcirc*, 1994, 14:605–18.

112. Baskurt OK, Meiselman HJ, Erythrocyte aggregation: basic aspects and clinical importance, *Clin Hemorheol Microcirc*, 2013, 53(1-2):23-37.
113. Meiselman HJ, Red blood cell role in RBC aggregation: 1963–1993 and beyond, *Clin Hemorheol*, 1993;13:575–592.
114. Kobuchi Y, Tadanao I, Ogiwara A, A model for rouleaux pattern formation of red blood cells, *J Theor Biol*, 1988, 130: 129–45.
115. Rampling, MW, Meiselman, HJ, Neu B, Baskurt OK, Influence of cell specific factors on red blood cell aggregation, *Biorheo*, 2004, 41: 91-112.
116. Baskurt OK, Tugral E, Neu B, Meiselman HJ, Particle electrophoresis as a tool to understand the aggregation behavior of red blood cells, *Electrophoresis*, 2002, 23:2103–09.
117. Hardeman MR, Dobbe JGG, Ince C, The laser-assisted optical rotational cell analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer, *Clin Hemorheol Microcirc*, 2001, 25, 1–11.
118. Connes P, Alexy T, Detterich J, Romana M, Hardy-Dessources MD, Ballas SK, The role of blood rheology in sickle cell disease, *Blood Rev*, 2016, Mar;30(2):111-8.
119. Iolascon A, Miragliadel GE, Perrotta S, Alloisio N, Morle L, Delaunay J, Hereditary spherocytosis: from clinical to molecular defects, *Hematologica*, 1998, 83:240-57.
120. Desouky OS, Selim NS, El-Bakrawy EM, El-Marakby SM, Biophysical characterization of beta thalassemic red blood cells, *Cell Biochem Biophys*, 2009, 55:45-53.
121. Pérez SM, Riquelme B, Acosta I, Valverde J, Milani A, Erythrocytes dynamic viscoelasticity in beta-thalassaemia minor, *Clin Hemorheol Microcirc*, 2006, 35:311- 316.
122. Bettger WJ, O'Dell BL, Physiological roles of zinc in the plasma membrane of mammalian cells, *J. Nutr. Biochem*, 1993, 4: 194–207.
123. Dash S, Brewer GJ, Oelshlegel FJ Jr, Effect of zinc on hemoglobin binding by red blood cell membranes, *Nature*, 1974, Jul 19;250(463):251-2.

124. Khaled S, Brun JF, Micallef JP, Monnier JF, Orsetti A, Serum zinc and blood rheology in sportsmen (football players), *Clin. Hemorheol. Microcirc*, 1997,17, 47–58.
125. Lushchak VI, Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification, *Chem Biol Interact*, 2014, Dec 5;224:164-75. doi: 10.1016/j.cbi.2014.10.016. Epub 2014 Oct 28.
126. Fibach E, Dana M, Oxidative Stress in β -Thalassemia, *Mol Diagn Ther*, 2019 Apr;23(2):245-261. doi: 10.1007/s40291-018-0373-5.
127. Halliwell B, Chirico S, Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance, *Am J Clin Nutr*, 1993, May; 57(5 Suppl):715-24.
128. Awadallah S, Protein antioxidants in thalassemia, *Adv Clin Chem*, 2013, 60:85-128.
129. Hardeman MR, Goedhart PT, Schut NH, Laser-assisted optical rotational cell analyser (L.O.R.C.A.); II. Red blood cell deformability: Elongation index versus cell transit time, *Clin Hemorheol Microcirc*, 1994,14:619–30.
130. Baskurt OK, Hardeman MR, Uyuklu M, Ulker P, Cengiz M, Nemeth N, Shin S, Alexy T, Meiselman HJ, Parameterization of red blood cell elongation index—shear stress curves obtained by ektacytometry, *Scand J Clin Lab Invest*, 2009, 69(7):777–88.
131. Baskurt OK, Meiselman HJ, Data reduction methods for ektacytometry in clinical hemorheology, *Clin Hemorheol Microcirc*, 2013, 54: 99–107.
132. Sonmez M, Ince HY, Yalcin O, Ajdzanovic V, Spasojevic I, Meiselman HJ, Baskurt OK, The effect of alcohols on red blood cell mechanical properties and membrane fluidity depends on their molecular size, *PLoS One*, 2013, Sep 23;8(9):e76579.
133. Nemeth N, Kiss F, Klarik Z, Miko I, Comparative osmotic gradient ektacytometry data on inter-species differences of experimental animals, *Clin Hemorheol Microcirc*, 2014;57(1):1-8. doi: 10.3233/CH-2012-1620.
134. Nemeth N, Kiss F, Miszti-Blasius K, Interpretation of osmotic gradient ektacytometry (osmoscan) data: a comparative study for methodological standards, *Scand J Clin Lab Invest*, 2015; 75(3):213-22.

135. Zijlstra WG, Syllectometry, a new method for studying rouleaux formation of red blood cells, *Acta Phys. Pharm. Neerl* 7, 1958, 153–54.
136. Cao A, Galanello R, Beta-thalassemia, *Genet Med*, 2010, Feb;12(2):61-76. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181cd68ed.
137. Mangalani M, Lokeshwar MR, Banerjee R, Nageswari K, Punyani RR, Hemorheological changes in blood transfusion-treated beta thalassemia major patients, *Clin Hemorheol Microcirc*, 1998, Jul;18(2-3):99-102.
138. Karim MF, Ismail M, Hasan AM, Shekhar HU, Hematological and biochemical status of Beta-thalassemia major patients in Bangladesh: A comparative analysis, *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*, 2016, Jan 1;10(1):7-12.
139. Bazvand F, Shams S, Borji Esfahani M, Koochakzadeh L, Monajemzadeh M, Ashtiani MT, Rezaei N, Total Antioxidant Status in Patients with Major β -Thalassemia, *Iran J Pediatr*, 2011, Jun;21(2):159-65.
140. Galanello R, Perseu L, Melis MA, Cipollina L, Barella S, Giagu N, Turco MP, Maccioni O, Cao A, Hyperbilirubinemia in heterozygous β -thalassaemia is related to co-inherited Gilbert's syndrome, *Br J Haematol*, 1997, Nov;99(2):433-6.
141. Ayyash H, Sirdah M, Hematological and biochemical evaluation of β -thalassemia major (β TM) patients in Gaza Strip: A cross-sectional study, *Int J Health Sci (Qassim)*, 2018, Nov-Dec;12(6):18-24.
142. Mashhadi MA, Sepehri Z, Heidari Z, Shirzaee E, Kiani Z, The prevalence of zinc deficiency in patients with thalassemia in South East of iran, sistan and baluchistan province, Iran, *Red Crescent Med. J*, 2014, 16 (8) e6243.
143. Rea F, Perrone L, Mastrobuono A, Toscano G, D'Amico M, Zinc levels of serum, hair and urine in homozygous beta-thalassemic subjects under hypertransfusional treatment, *Acta Haematol*, 1984, 71 (2): 139–142.
144. Genc GE, Ozturk Z, Gumuslu S, Kupesiz A, Mineral levels in thalassaemia major patients using different iron chelators, *Biol. Trace Elem. Res*, 2016, 170 (1): 9–16.
145. Swe KM, Abas AB, Bhardwaj A, Barua A, Nair NS, Zinc supplements for treating thalassaemia and sickle cell disease, *Cochrane Database Syst Rev*, 2013, Jun 28;(6):CD009415. doi: 10.1002/14651858.CD009415.pub2.

146. Mehdizadeh M, Zamani G, Tabatabaee S, Zinc status in patients with major beta-thalassemia, *Pediatr Hematol Oncol*, 2008, Jan-Feb;25(1):49-54. doi: 10.1080/08880010701773738.
147. Ollig J, Kloubert V, Wessels I, Haase H, Rink L, Parameters Influencing Zinc in Experimental Systems in Vivo and in Vitro, *Metals*, 2016, 6(3):71.
148. Bilgiç H, Allerjik Bronş Astmalı Hastalarda, Serum Çinko Düzeyi Ev Tozu Allerjisinin Bazofil Degranülasyon Testi İle Araştırılması Ve İn Vitro Çinko Sülfat İle Bazofil Degranülasyon Testinin Önlenebilirliği, 1984, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi.
149. Paterson PG, Allen OB, Bettger WJ, Effect of dietary zinc deficiency on the endogenous phosphorylation and dephosphorylation of rat erythrocyte membrane, *J Nutr*, 1987, Dec;117(12):2096-105.
150. Johanning GL, O'Dell BL, Effect of zinc deficiency and food restriction on erythrocyte membrane zinc, phospholipid and protein content, *J. Nutr*, 1989, 119: 1654–60.
151. Renoux C, Joly P, Gauthier A, Pialoux V, Romanet-Faes C, Bertrand Y, Garnier N, Cuzzubbo D, Cannas G, Connes P1, Blood rheology in children with the S/β+-thalassemia syndrome, *Clin Hemorheol Microcirc*, 2018; 69(1-2):207-214. doi: 10.3233/CH-189119.
152. Tillmann W, Schröter W, Rheological properties of erythrocytes in heterozygous and homozygous beta thalassaemia, *Br J Haematol*, 1979, Nov;43(3):401-11.
153. Cortinovis A, Crippa A, Romano E, Crippa M, Rheologic features of erythrocytes in beta-thalassemia minor, *Minerva Med*, 1993, Feb;84(1-2):1-9.
154. Renoux C, Faivre M, Bessaa A, Da Costa L, Joly P, Gauthier A, Connes P, Impact of surface-area-to-volume ratio, internal viscosity and membrane viscoelasticity on red blood cell deformability measured in isotonic condition, *Sci Rep*, 2019, May 1;9(1):6771. doi: 10.1038/s41598-019-43200-y.
155. Da Costa L, Suner L, Galimand J, Bonnel A, Pascreau T, Couque N, Fenneteau O, Mohandas N; Society of Hematology and Pediatric Immunology (SHIP)

group; French Society of Hematology (SFH), Diagnostic tool for red blood cell membrane disorders: Assessment of a new generation ektacytometer, *Blood Cells Mol Dis*, 2016, Jan;56(1):9-22. doi: 10.1016/j.bcmd.2015.09.001. Epub 2015 Sep 16.

156. Patel KV, Mohanty JG, Kanapuru B, Hesdorffer C, Ershler WB, Rifkind JM, Association of the red cell distribution width with red blood cell deformability, *Adv Exp Med Biol*, 2013, 765:211-6.

157. Romero Artaza J, Carbia CD, Ceballo MF, Díaz NB, Red cell distribution width (RDW): its use in the characterization of microcytic and hypochromic anemias, *Medicina (B Aires)*, 1999; 59(1):17-22.

158. Schrier SL, Rachmilewitz E, Mohandas N, Cellular and membrane properties of alpha and beta thalassemic erythrocytes are different: implication for differences in clinical manifestations, *Blood*, 1989, Nov 1;74(6):2194-202.

159. Chen S, Eldor A, Barshtein G, Zhang S, Goldfarb A, Rachmilewitz E, Yedgar S, Enhanced aggregability of red blood cells of beta-thalassemia major patients, *Am J Physiol*, 1996, Jun;270(6 Pt 2):H1951-6.

160. Singer ST, Vichinsky EP, Larkin S, Olivieri N, Sweeters N, Kuypers FA, Hydroxycarbamide-induced changes in E/beta thalassemia red blood cells, *Am J Hematol*, 2008, Nov;83(11):842-5. doi: 10.1002/ajh.21266.

161. Shazia Q, Mohammad ZH, Rahman T, Shekhar HU, Correlation of oxidative stress with serum trace element levels and antioxidant enzyme status in Beta thalassemia major patients: a review of the literature, *Anemia*, 2012, 2012:270923. doi: 10.1155/2012/270923. Epub 2012 May 9.

162. Abdalla MY, Fawzi M, Al-Maloul SR, El-Banna N, Tayyem RF, Ahmad IM, Increased oxidative stress and iron overload in Jordanian β -thalassemic children, *Hemoglobin*, 2011, 35(1):67-79. doi: 10.3109/03630269.2010.544624.

163. Hossain MF, Ismail M, Tanu AR, Shekhar HU, Respiratory Burst Enzymes, Pro-Oxidants and Antioxidants Status in Bangladeshi Population with β -Thalassemia Major, *N Am J Med Sci*, 2015, Jun;7(6):253-8. doi: 10.4103/1947-2714.159329.

164. Naithani R, Chandra J, Bhattacharjee J, Verma P, Narayan S, Peroxidative stress and antioxidant enzymes in children with beta-thalassemia major, *Pediatr Blood Cancer*, 2006, Jun;46(7):780-5.
165. Rashidi M, Aboomardani M, Rafrat M, Arefhosseini SR, Keshtkar A, Joshaghani H, Effects of Vitamin E and Zinc Supplementation on Antioxidants in Beta thalassemia major Patients, *Iran J Pediatr*, 2011, Mar;21(1):8-14.
166. Ozturk A, Baltaci AK, Mogulkoc R, Oztekin E, Sivrikaya A, Kurtoglu E, Kul A, Effects of zinc deficiency and supplementation on malondialdehyde and glutathione levels in blood and tissues of rats performing swimming exercise, *Biol Trace Elem Res*, 2003, Aug;94(2):157-66.
167. Shaheen AA, el-Fattah AA, Effect of dietary zinc on lipid peroxidation, glutathione, protein thiols levels and superoxide dismutase activity in rat tissues, *Int J Biochem Cell Biol*, 1995, Jan;27(1):89-95.

EK 1: ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 61

Tarih : 18.01.2018

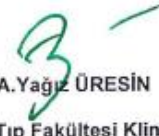
Konu: Doç. Dr. Zeynep Nesrin ERTAN hk.

Sayın Doç. Dr. Zeynep Nesrin ERTAN
Fizyoloji Anabilim Dalı

İlgi: Fizyoloji Anabilim Dalının 10/01/2018 gün ve 12838 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Mukaddes SİNAN' ın yürüteceği 2018/36 dosya numaralı "Talasemi Hastalarında, Hemoreolojik Parametreler Üzerine Çinkonun Etkisinin Araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 12/01/2018 tarih ve 01 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. A.Yağz ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI "Talasemi Hastalarında, Hemoreolojik Parametreler Üzerine Çinkonun Etkisinin Araştırılması"

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	08/01/2018	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	☒		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	☐	Açıklama	
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐		
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	HASTA KARTI/GÖNÜLLÜKLERİ	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:01	Tarih: 12/01/2018		
	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında görevli Doç. Dr. Zeynep Nesrin ERTAN' ın sorumluluğunda ve Mukaddes SİNAN' ın yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU									
ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik							
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *		Katılım **	İmza	
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr. Sevdâ ÖZEL YILDIZ	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* :Araştırma ile ilişki
** :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığından izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.

EK 2: GÖNÜLLÜ ONAY ve HASTA BİLGİLENDİRME FORMU

Bu bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Pediatrik Onkoloji ve Hematoloji kliniğine başvuran kadın ve erkekleri, “Talasemi Hastalarında, Hemoreolojik Parametreler Üzerine Çinkonun Etkisinin Araştırılması” araştırmasına davet etmek üzere hazırlanmıştır.

Araştırma Koordinatörü; Doç. Dr. Nesrin Zeynep Ertan

Sorumlu Araştırmacı; Mukaddes Sinan

Araştırmayı yürütecek kuruluş: İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

Destekleyici kuruluş: İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi

Araştırmanın adı: TALASEMİ HASTALARINDA, HEMOREOLOJİK PARAMETRELER ÜZERİNE ÇİNKONUN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Araştırma Hakkında Bilgi

“Talasemi Hastalarında, Hemoreolojik Parametreler Üzerine Çinkonun Etkisinin Araştırılması” adını verdiğimiz çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla ve nasıl yapılacağını anlamanız ve katılıp katılmama doğrultusundaki kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Araştırma hakkında sözlü olarak size aktaracağım bilgiler yazılı olarak da size bir sonraki bölümde sunulacaktır. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz. Bu belgedeki son bölüm onay işlemleri ile ilgilidir. Araştırmaya katılmayı kabul ederseniz lütfen bu bölümü imzalayınız.

Hemoreolojik inceleme, kanın akışkanlığını ve etkileyen faktörleri incelemek anlamına gelir. Bu konuda yapılan araştırmalar çeşitli hastalıklarda (şeker hastalığı, damar hastalıkları, hipertansiyon vs.) kanda akışkanlığı etkileyen faktörlerde olumsuz yönde farklılıklar bulunduğunu göstermiştir. Talasemi hastalarında da bu kan akışkanlığını etkileyen faktörlerde değişiklik olduğu çalışmalarla gösterilmiştir. Beta talasemi-major hastalarda çinko (Zn) eksikliği de çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir. Ancak, bu eksikliğin neden kaynaklandığı ve çinko ile hemoreolojik parametreler arasındaki ilişki henüz tam aydınlatılamamıştır. Bu nedenle bu çalışmada talasemi hastalarında hemoreolojik parametreler ve bu parametrelerin çinko eksikliği ile ilişkisi araştırılacaktır.

Araştırmamız, tedavinizi hiçbir şekilde etkilemeyecek, herhangi bir ek tedavi, deneme ya da ilaç uygulanmayacaktır. Sadece zaten yapılacak olan testlere ilave olarak, planlanan araştırmada kullanılmak üzere ek kan alınacaktır. Araştırma, sadece bu kan kullanılarak yapılacaktır. Kan, sadece akışkanlık testleri ile ilgili kullanılacağı için sadece 10 ml alınacaktır. Size başka hiçbir ek işlem uygulanmayacaktır.

Hemoreolojik parametrelerle ilgili bu çalışma, talasemi hastalarında mikrodolaşımla ilgili risk seviyesinin (Örn: agregasyonun artması, enfarktüs eğilimini arttırması) belirlenmesine katkıda

bulunacaktır. Bunun, hastaların tedavi prosedürü açısından önemli bir katkısı olacağını düşünmekteyiz. Ayrıca çinkonun etkisi ile ilgili bulgular da tedaviye yön verme açısından değerli olacaktır.

Bu araştırmanın sizin açınızdan bir riski bulunmamaktadır. Yine de istediğiniz anda çalışmadan çıkmakta serbestsiniz. Araştırma grubundan çıkmanız tedavinizi hiçbir şekilde etkilemeyecektir. Size hiçbir maddi yük getirmemektedir. Bunun yanında size herhangi bir ödeme de yapılmayacaktır. Bu araştırmayı yaklaşık 30 hastada yapmayı planladık. Yaklaşık 18 ay süreceğini düşündüğümüz bu araştırmanın sonuçları konusunda sizi de bilgilendireceğiz. Alınan kan sadece söz edilen araştırmada kullanılacak, başka bir amaçla kesinlikle kullanılmayacaktır. Bu tür çalışmaların sonuçları tüm bilim dünyası ile paylaşılır. Biz de sonuçları yayınlayacağız. Ancak kimliğinizle ilgili hiçbir bilgi açıklanmaz, kesinlikle gizli kalır.

Katılımcının Beyanı

Sayın Prof. Dr. Zeynep Karakaş tarafından İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Onkoloji ve Hematoloji Bilim Dalında “Talasemi Hastalarında, Hemoreolojik Parametreler Üzerine Çinkonun Etkisinin Araştırılması” konusunda bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilendirmeden sonra böyle bir araştırmaya “gönüllü” olarak katılmak üzere davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin; gizlilik içinde, bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile korunacağı güvencesi verildi. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında da kişisel bilgilerimin özenle korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi. Araştırmanın yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Tarafıma bir ücret ödenmeyecektir. İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle olabilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak parasal bir yük altına da girmeyeceğim. Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Prof. Dr. Zeynep Karakaş’ı İstanbul Tıp Fak. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Pediatrik Onkoloji ve Hematoloji bölümünden ulaşabileceğimi ve/veya 0532 4251960 nolu telefondan arayabileceğimi biliyorum. Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde gönüllü olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti gönüllülük içerisinde

kabul ediyorum. İmzalı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun bir örneğinin bana verileceğini de biliyorum.”

İmza ve ulaşım bilgileri

Gönüllü bilgileri

Adı – soyadı:

Adres:

Telefon:

Tarih ve imza

Araştırmacının bilgileri

Adı – soyadı:

Telefon:

Tarih ve imza

Tanık bilgileri (Gerekli ise)

Adı – soyadı:

Adres:

Telefon:

Tarih ve imza

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

TALASEMİ HASTALARINDA, HEMOREOLOJİK PARAMETRELER ÜZERİNE ÇİNKONUN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

% 10	% 8	% 3	% 6
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	arizona.edu:8080 İnternet Kaynağı	% 2
2	www.academicfoodjournal.com İnternet Kaynağı	% 1
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
4	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
5	www.tumer.com İnternet Kaynağı	<% 1
6	Submitted to Pamukkale Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
7	Submitted to Mersin Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
8	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Mukaddes	Soyadı	SİNAN
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	23.09.1989
Uyruğu	TC	Email	mukaddessinan@yahoo.com

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji AD	
Yük.Lis.	İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji AD	2014
Lisans	İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2011
Lise	Bakırköy Ataköy Lisesi	2007

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	YDS Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	82

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	75	75	65

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office Programları	İyi

Yayınları

1. Ertan NZ, Bozfakioğlu S, Ugurel E, Sinan M, Yalcin O, Alterations of erythrocyte rheology and cellular susceptibility in end stage renal disease: Effects of peritoneal dialysis, PLoS One, 2017, Feb 3;12(2): e0171371.
2. Sinan M, Ertan N, Mirasoglu B, Yalcin O, Atac N, Toklu A, Basaran-Kucukgergin C, Baskurt O, Acute and Long - term Effects of Hyperbaric Oxygen Therapy on Hemorheological Parameters in Patients with Various Disorders, Clin Hemorheol Microcirc, 2016, 62(1):79-88.