



T.C.

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK ARAŞTIRMA ve UYGULAMA HASTANESİ**

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**ORAK HÜCRELİ ANEMİDE NETosis**

**Dr. Gizem HATEM**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Doç. Dr. Anıl TOMBAK**

## TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca yardımlarını benden esirgemeyen, tez konumun belirlenmesi, yazımı konusunda yol gösteren tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Anıl TOMBAK' a, Histoloji Anabilim dalı öğretim üyesi Sayın Necat YILMAZ'a, Biyokimya Anabilim dalı öğretim üyesi Sayın Lülüfer TAMER'e, Farmakoloji Anabilim dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Nalan TİFTİK'e,

Tez çalışmamın her aşamasında çalışmanın yürütülmesinde büyük katkısı olan Biyokimya Anabilim dalı Uzm. Dr. Şenay BALCI' ya,

Bu süreçte ilgisi, bilgisi ve tüm gayretiyle bana destek olan sevgili arkadaşım Histoloji Anabilim dalı öğretim üyesi Burcu DEMİRBAĞ' a

Asistanlık eğitimim boyunca yetişmemde emeği olan tüm saygıdeğer hocalarıma,

Eğitimim süresince beraber olduğum tüm çalışma arkadaşlarım ve hastane personellerine,

Hayatımın her anında bana destek olan, güç veren, inanan ve yola devam etmemi sağlayan çok sevgili aileme, annem Semra ÇULHA, babam Kemal ÇULHA, kardeşlerim Deniz Pelin ÇULHA, Emir Kemal ÇULHA, Şenel HATEM ve Mehmet HATEM'e,

Hayatımı daha güzel hale getiren, neşe ve mutluluk kaynağım biricik oğlum Engin Kaan HATEM'e,

Deneyimleriyle, bilgisiyle, öngörülerıyla her zaman yanımda olan, motivasyonumu sağlayan, sevgisi ve sabrıyla zor zamanları kolay hale getiren, çok sevgili eşim Engin HATEM'e

Teşekkürlerimi borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

1. ÖZET
2. ABSTRACT
3. GİRİŞ VE AMAÇ
4. GENEL BİLGİLER
  - 4.1.1. Orak Hücreli Anemi
  - 4.1.2. Genetik
  - 4.1.3. Görülme Sıklığı ve Coğrafi Dağılımı
  - 4.1.4. Patofizyoloji
  - 4.1.5. Orak Hücre Hastalığı ve İnflamasyon
  - 4.2.1. NETosis Kavramı
  - 4.2.2. NETs Çeşitleri
  - 4.2.3. NETs ve Kronik İnflamasyon
  - 4.2.4. NETs ve Tromboz
  - 4.2.5. NETs Belirteçleri ve NETosis Saptama Yöntemleri
  - 4.3. Orak Hücre Anemili Hastalarda Nötrofil Aktivasyonu
5. HASTALAR ve YÖNTEM
6. BULGULAR
7. TARTIŞMA
8. SONUÇ ve ÖNERİLER
9. KAYNAKLAR
10. TABLOLAR
11. SİMGELER ve KISALTMALAR
12. ŞEKİL LİSTESİ
13. RESİM LİSTESİ

## 1. ÖZET

**AMAÇ:**Orak hücreli anemide inflamasyon ve tromboz artmıştır. NETosis, birçok inflamatuvar ve malign hastalıkta artmıştır ve trombozla ilişkilidir. Bu çalışmada, orak hücreli anemili hastalarda uyarılmamış nötrofillerde NETosis'in artıp artmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

**MATERYAL VE METOT:** Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji bölümüne başvuran orak hücreli anemili hastaların ve sağlıklı kişilerin kan örnekleri, onamları alındıktan sonra alınmıştır. Çalışmaya, 25 (yirmibeş) orak hücreli anemi hastası ve kontrol grubuna da 25 (yirmibeş) sağlıklı birey dahil edilmiş, hastaların ve sağlıklı bireylerin 2 mL'lik venöz kan örnekleri, nötrofil elastaz enzim düzeyi için EDTA'lı tüpe, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı polikliniğinde alınmıştır. Nötrofil izolasyonu için EDTA'lı tüpe alınan kan örnekleri 4000 devirde 10 dakika santrifüj edildikten sonra +4 °C'de Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, biyokimya laboratuvarında saklanmıştır. Tüm kan örnekleri aynı anda çalışılmıştır. MACSxpress® Neutrophil Isolation Kit Human kullanılarak elde edilen nötrofiller NETs oluşumu için kullanılmıştır. NETosis ASSAY Kit aşamasında hücreler NET assay buffer ile süspanse edilip inkübe edildikten sonra santrifüj edilerek nötrofil elastaz enzim aktivitesi çalışılması için toplanmıştır. Elde edilen supernatantlara NET Assay Neutrophil Elastase Substrate eklenerek inkübe edildikten sonra plate üzerindeki film açılarak 405 nm de okutulmuştur. Standartlardan faydalanarak konsantrasyon absorbans grafiği çizilmiş ve hesaplamalar Tıbbi Farmakoloji Laboratuvarında ve Biyokimya hesaplanmıştır. İmmun floresan ve taramalı elektron mikroskobu görüntüleri için hasta ve kontrol gruplarından kan örnekleri alınarak uygun protokollerle hazırlanmıştır.

**BULGULAR:** Çalışmada; orak hücreli anemili hastalarda sağlıklı bireylere kıyasla NETosis oluşumunun arttığı gösterilmiştir, bununla beraber her 2 grup arasında istatistiki bir fark saptanmamıştır (p=0,329). Ağrılı kriz sayısının artmasıyla NETosis oluşumunun arttığı da gösterilmiştir.

**SONUÇ:** Bu çalışmada, orak hücreli anemili hastalarda sağlıklı bireylere kıyasla NETosis oluşumunun arttığı gösterilmiştir. NETosis oluşumun orak hücreli anemi hastalığının etiyopatogenezine katkısına dair daha fazla sayıda vaka ile yapılmış daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

**ANAHTAR KELİMELEER:** orak hücreli anemi, NETosis , nötrofil elastaz, tromboz

## 2. ABSTRACT

**OBJECTIVE:** The aim of this study was to demonstrate the increased inflammation in sickle cell anemia by demonstrating the activity of NETosis and to regulate the prophylaxis necessary for life-threatening thrombosis, which may occur at the end of this process.

**MATERIAL AND METHODS:** Blood samples of patients with sickle cell anemia and healthy persons who applied to Mersin University Medical Faculty Hematology Department were taken after their consent was obtained. Twenty-five (25) and 25 (twenty-five) healthy individuals were included in the study. 2 mL venous blood samples of the patients and healthy individuals, EDTA tube for neutrophil elastase enzyme level, received at Mersin University Medical Faculty Hematology Department. Blood samples taken into EDTA tube for neutrophil isolation were centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes and stored at +4 °C at Mersin University Medical Faculty biochemistry laboratory. All blood samples were studied simultaneously. Neutrophils obtained using MACSxpress® Neutrophil Isolation Kit Human were used for NETs formation. In the NETosis ASSAY Kit stage, cells were suspended with NET assay buffer and incubated, then centrifuged to collect neutrophil elastase enzyme activity. The supernatants were incubated with the addition of NET Assay Neutrophil Elastase Substrate and the film on the plate was opened at 405 nm. The concentration absorbance graph was drawn by utilizing the standards and the calculations were calculated in the Medical Pharmacology Laboratory and Biochemistry. Blood samples from patient and control groups were prepared for appropriate fluorescence and scanning electron microscope images and prepared with appropriate protocols.

**RESULTS:** Although no statistically significant difference was found, we showed that NETosis formation increases in patients with sickle cell anemia compared to healthy subjects ( $p=0,329$ ). We also showed that NETosis formation increases with the increasing number of painful crisis in these patients.

### **CONCLUSION:**

In this study, it has been shown that NETosis formation increases in patients with sickle cell anemia compared to individuals with health subjects. However, more studies with larger number of cases are needed for understanding the NETosis in the ethiopathogenesis of sickle cell disease.

**KEY WORDS:** sickle cell anemia, NETosis , neutrophil elastase, thrombosis



### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Orak hücreli anemi, birçok organ sisteminde hasar oluşturan, en sık görülen konjenital hematolojik hastalıktır. Beta globin genindeki 6. pozisyondaki nokta mutasyonu sonucunda glutamik asit yerine valin geçmesiyle gelişir. Bu mutasyonun homozigot olması durumunda, hipoksik şartlarda eritrosit içindeki hemoglobin tetramerlerinin anormal polimerizasyonu olur, neticede daha az esnek orak hücreler ortaya çıkar ve hemoliz gelişir. Klinik tabloda tekrarlayan ağrılı krizler, kronik hemolitik anemi, akut göğüs sendromu, pulmoner hipertansiyon, stroke, böbrek yetmezliği, priapizm, bacak ülserleri, osteonekroz ve kardiyak hastalık yer almaktadır. Hastalık patogenezinde, artmış vasküler inflamasyon, endotel hasarı ve koagülasyon aktivasyonu da yer almaktadır. Hem intrinsik, hem ekstrinsik koagülasyon yolağının aktivasyonu ile tromboza yatkınlık olması, –hiperkoagülabl durum- hastalıkta önemli bir morbidite ve mortalite sebebidir. Hastalıkta venöz tromboemboli riskinin arttığı yapılan çalışmalarla ispatlanmıştır. Sistemik koagülasyon aktivasyonunun belirteçleri olan koagülasyonun trombin-antitrombin kompleksinin, D-dimer seviyesinin, trombin üretiminin, hasta plazmalarında arttığı, doğal antikoagülan proteinleri olan protein C ve protein S seviyelerinin ise azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, artmış platelet aktivasyonu, dolaşımdaki artmış aktive endotel hücreleri ve monositlerden doku faktörü ekspresyonu arttığı da gözlenmiştir. Sonuç olarak orak hücre anemili hastalarda aşırı koagülasyona kronik bir yatkınlık vardır.

NETosis, oksidatif ve oksidatif olmayan yollarla konak savunmasında ve birçok hastalıkta inflamasyonun bir parçasıdır. DNA parçaları ve granüler antimikrobiyal proteinler içeren nötrofil kromatinleri, nötrofil elastaz, myeloperoksidaz, laktoferrin, katepsin G ile hücre dışında etki gösterir. Patojenlerin, otoantikörlerin, immun komplekslerin NETs oluşumunu tetiklediği bilinmektedir. Bu süreçte nötrofillerden, DNA ve histonlardan oluşan, içinde pek çok granül protein, nötrofil elastaz, myeloperoksidaz içeren yapı, hücre dışına salınır. NETs olarak tanımlanan bu yapının öncelikli fonksiyonu patojeni fiziksel olarak çevrelemektir. Böylelikle başlatılan inflamasyon sürecinin konağa verdiği zarar en aza indirilir. Yanlış zamanda ya da düşük yoğunlukta şekillenmesi ise organizmada olumsuz durumlara sebep olmaktadır. Sepsis esnasında NETs salınımı ile damar endotelinde hasarlanma gelişir. Bunun sonucunda trombüs meydana gelir. Kanser hastalarında enfeksiyon, NETosis ve metastaz arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Otoimmun hastalıklarından ANCA ilişkili vaskülitlerde, sistemik lupus eritematozus, romatoid artrit hastalarında organizmada sürekli NETs yapılarının bulunmasının otoantikörlerin daha fazla üretimine yol açtığı gösterilmiştir.

Organizmada doğal bağışıklığın önemli bir unsuru olan NETosis immunitenin iki kenarı keskin kılıcı olarak kabul edilmektedir.

Bu çalışmada,arak hücreli anemide artan inflamasyonu, NETosis aktivitesini göstererek ortaya koymak ve bunu bir belirteç olarak kullanarak bu sürecin sonunda meydana gelebilecek hayatı tehdit eden tromboz gibi durumlar için gereken profilaksinin düzenlenmesini sağlamak ve NETs oluşumunun bu hastalık grubunda, sağlıklı bireylere kıyasla daha fazla olduğunun gösterilmesi durumunda, özellikle ağırlı kriz dönemlerinde antitrombotik ilaç kullanımını destekleyen kuvvetli bir bilimsel veri elde edilmesi amaçlanmıştır.

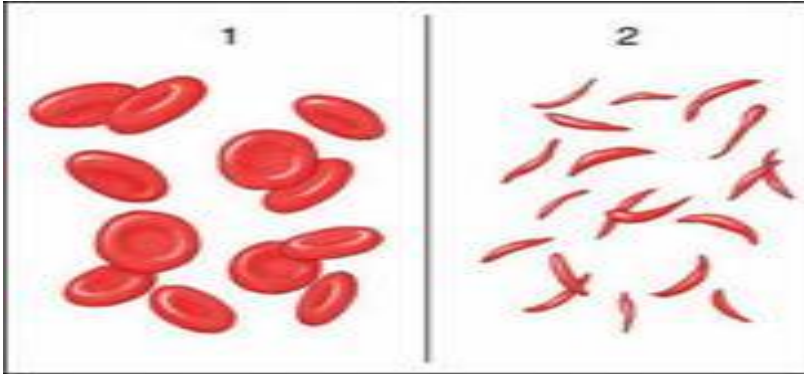




## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1.1 Orak Hücreli Anemi

Orak hücre hastalığı, otozomal resesif kalıtım gösteren, birçok sistemi etkileyen, hemolitik anemi ile seyreden kronik bir kan hastalığıdır. Dünyada en sık saptanan hemoglobinopatilerdendir.  $\beta$  globin zincirinin 6. pozisyonunda glutamik asitin valinle yer değiştirmesi sonucunda anormal bir hemoglobin olan HbS meydana gelir. Bu mutasyonun sonucu olarak oksijensiz HbS polimerize olur ve katı kristal halinde çökerekeritrositlerde bikonkav disk şeklinde yarımay benzeri orak şeklini alır . Oraklaşmış olan bu eritrositler kan akışkanlığında yavaşlamaya ve sonunda damar tıkanıklığına yol açarak klinik bulguların ortaya çıkmasına neden olur. Dünyada yılda 300.000 orak hücre anemili çocuk dünyaya gelmektedir ve Türkiye'nin güneyinde yaşayan insanlar arasında hemoglobin S sıklığının, %3,9 olduğu bildirilmiştir. Bu sıklık Arapça dilini konuşan insanlarda %9,6'ya ulaşmaktadır. Son yıllarda hasta bakımı ve destek tedavisindeki olumlu gelişmeler ile çocukluk yaşlarında ölüm riski azaltılmış olmakla birlikte ölüm riski yetişkin yaşlarda yüksek seyretmektedir. Orak hücre hastalarında ortalama yaşam süresi 39 yaş olarak görülmektedir. (yayınlanmamış veriler).<sup>1</sup>



**Şekil1:** Normal eritrositler (1), Orak şeklini almış eritrositler (2)

#### 4.1.2 Genetik

Orak hücreli anemi, otozomal resesif olarak kalıtılmakla beraber akraba evliliklerinde görülme sıklığı artmıştır. Orak hücre mutasyonu homozigot ya da heterozigot olarak meydana gelebilir. Heterozigot durumlarda anne ya da babanın sadece birinden mutant gen alınır ve bunun sonucunda HbA ile HbS birlikte bulunarak orak hücre taşıyıcılığı meydana gelir. Taşıyıcı bireyler hastalık belirtisi göstermezler, tetkikler esnasında tesadüfen anlaşılırlar. Homozigot durumlarda anne ve babadan mutant genler alınarak orak hücre hastalığı meydana gelir.<sup>2</sup> Orak hücreli anemili hastalarda, taşıyıcılar ve normal bireylerin Hb'leri arasındaki elektroforetik ve kimyasal farklılıkların tespit edilmiştir ve orak hücreli aneminin moleküler bir hastalık olduğu ortaya konmuştur.<sup>3</sup> HbS ile normal Hb karşılaştırıldığında 'hem' grupları arasında bir fark olmadığı, globin molekülündeki farklılığın önem kazandığı görülmüştür.<sup>4</sup> Orak hücre geninin diğer hemoglobinopati genleri ile birlikte bulunması, farklı orak hücre hastalığı tiplerinin görülmesine neden olur. Örnek olarak; HbA2'nin %3-5 arasında olduğu ve daha hafif seyirli klinik bulgulara yol açan orak hücre-β talasemi tablosu görülebilir. Bu tür hastalarda görülen klinik özelliklerini, β geni mutasyonunun tipi ve HbA miktarı belirlemektedir. Orak hücre hastalığı ile birlikte diğer heterozigot durumlar; orak hücre-hemoglobin C (SC) hastalığı, orak hücre-hemoglobin Lepore, orak hücre-hemoglobin O ve orak hücre-hemoglobin D olarak görülebilir.<sup>5-6</sup>

#### 4.1.3 Görülme Sıklığı ve Coğrafi Dağılım

Orta Afrika, hastalığın en sık görüldüğü bölgelerdendir. Bazı etnik gruplarda %40 dolayında taşıyıcılık görülmüştür.<sup>7,8</sup> Hastalık, İtalya'nın güney, Yunanistan'ın kuzey ve Türkiye'nin güney bölgelerini kapsayan Akdeniz ülkelerinde, Orta Doğu ve Hindistan'da yaygın olarak görülmektedir. Dünyada 200 milyon kişiden fazla orak hücre taşıyıcısı bulunmaktadır ve her yıl yaklaşık 200-300 bin yenidoğan birey eklenmektedir.

Ülkemizde yapılan tarama çalışmaları sonucunda Çukurova Bölgesi' nin OHH'nin en sık görüldüğü bölge olduğu ortaya konmuştur.<sup>9,10</sup>

Sağlık Bakanlığı ve Ulusal Hemoglobinopati Konseyi'nin verilerine göre taşıyıcı sıklığının Adana'da %10, Antakya'da %10,5, Mersin'de %13,6 ve ülkemizdeki toplam hasta kişi sayısının yaklaşık 1200 civarında olduğu gösterilmiştir.<sup>11,12</sup>

#### 4.1.4 Patofizyoloji

$\beta$  globin zincirinin 6. pozisyonunda yer alan glutamik asitin valinle yer değiştirmesi bir başka deyişle deoksiribonükleik asitte (DNA) adenin yerine timin gelmesine bağlı olarak (GAG-GTG) HbS molekülü meydana gelir. Oksijeni bırakan HbS molekülünün çözünürlüğü azalır, viskozitesi artar. Oksijensiz HbS tetramerleri kendi aralarında etkileşerek polimer lifçikleri oluşturarak lifler halinde biraraya gelirler.<sup>13</sup>

Hb tetramerleri oksijensizliğin süresine ve şiddetine bağlı farklı biçimlerde polimerize olur ve orak biçimli eritrositlere dönüşürek dolaşımında akışkanlığı azaltırlar. Böylece kan akımı yavaşlar ve bu durum küçük damarlarda tıkanıklık ve oksijensiz ortam oluşmasına neden olur. Sıklıkla yeniden oksijenlenme ile orak şeklini almış eritrositler eski biçimini kazanırken, bir kısmı ise hücre membranlarında oluşan kalıcı hasar nedeniyle normal şekline dönemez. Bu eritrositler damar tıkanıklığına yol açarak dokularda hipoksi meydana getirir. Ağrılı kriz ve organ nekrozu ile sonuçta akut ve kronik doku harabiyetine neden olan bir süreç başlar. Her bir hasta için kalıcı oraklaşmış hücre sayısı sıklıkla sabittir ve esas olarak kansızlık derecesiyle ilişkilendirilir.<sup>14</sup>

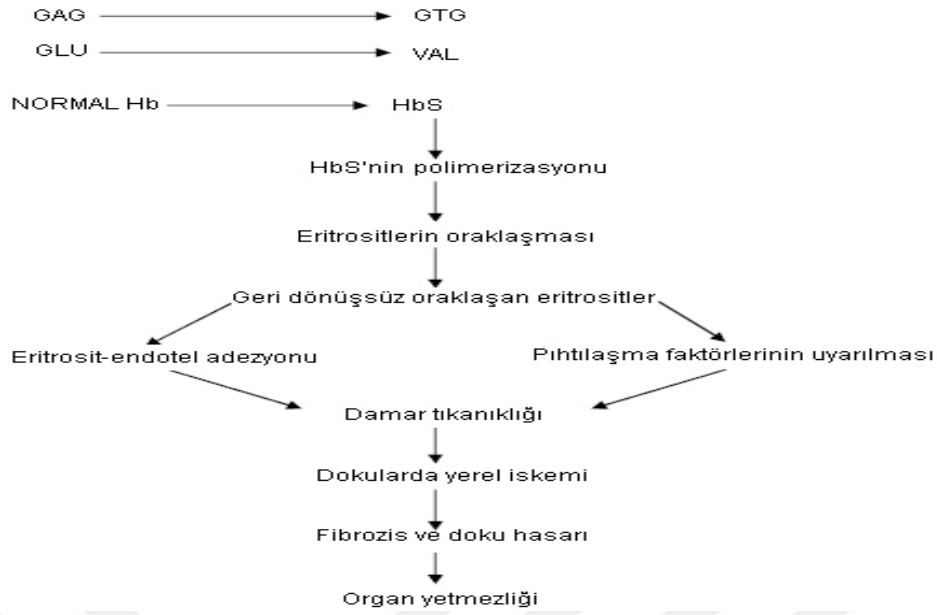
#### 4.1.5 Orak Hücre Hastalığı Ve İnflamasyon

İnflamasyon; patojenlere karşı doğal ve kazanılmış bağışıklıkla ilgili reaksiyonların rol oynadığı immün reaksiyondur. İnvazif patojene yanıt olarak nötrofil ve makrofaj gibi inflamatuvar hücrelerin birikimi, patojenin fagositozu sonrası çeşitli sitokin ve kemokinlerin salgılanması ve bu moleküllerin lenfositleri aktive ederek kazanılmış bağışıklık yanıtı başlatması ile inflamasyon başlar. Bu inflamasyon enfeksiyona yol açan patojenin ortadan kaldırılmasıyla ya da patojenin ortadan kaldırılamadığı durumlarda, uzun süreli inflamatuvar yanıtların başlatılmasıyla sonlanır. Yapılan çalışmalarda, orak hücreli anemi hastalığının patofizyolojisinde inflamasyonun önemli rolü olduğu gösterilmiştir.<sup>15,16,17</sup> Şekil 5'de özetlendiği gibi oksijensizlik, HbS polimerizasyonuna neden olur, bu durum da eritrositleri oraklaştırır. Damar tıkanmaları, orak eritrositlerin lökositlerle ve vasküler endotelle olan etkileşimi sonucu meydana gelir. Bu damar tıkanmaları infarktlara, hemoliz ve inflamasyona neden olur, inflamasyon, salınan adezyon moleküllerinin sayısını artırır, oraklaşmış eritrositlerin vasküler endotele yapışma eğilimini artırır ve bütün bunlar damar tıkanmalarını artırarak döngüyü devam ettirir. İskemik dokunun yeniden kanlanması serbest radikalleri oluşturur ve bu da doku hasarına yol açar. Hasarlanmış eritrositler, plazma

içerisine serbest Hb salar. Bu serbest Hb, NO'ye yüksek oranda bağlanır, fonksiyonel NO eksikliğine neden olur ve damarsal hasar oluşmasına yol açar.<sup>14</sup> Orak hücreli anemide uzun süreli inflamasyon bulguları olmakla beraber, hasta, damar tıkalı krize girdiğinde akut inflamasyon bulguları alevlenir.<sup>16</sup> Uzun süreli hemoliz sonucu açığa çıkan hücre içeriği, plazmanın kimyasal bileşimini değiştirmekte ve inflamatuvar bir ortam hazırlamaktadır.<sup>17</sup>

HbS polimerizasyonu, hiperviskozite, damar tıkanıklığı, hemoliz ve endotelial disfonksiyon söz konusudur.<sup>14</sup> İnflamasyonda; proteinlerin oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu ile zararlı oksidan ürünler ortaya çıkar. Bu süreçte; salınan sitokinler tarafından, aktivasyonun gerçekleşmesiyle birlikte tıkanıklık sonrası inflamatuvar süreç başlayabilir. Olaylar dizisi: ATP'nin hipoksantine yıkımı, ksantin dehidrogenaz'ın ksantin oksidaz'a dönüştürülmesi ve oksijenli kan akımının tekrar gelmesi ile süperoksid radikallerinin üretilmesi şeklindedir.<sup>18,19,20</sup>

Orak hücre hastalığında inflamatuvar yanıtlar, endotel hasarı ve oksidatif stres yakın ilişkilidir. Doku düzeyinde, aktive olmuş inflamatuvar hücrelerden, myeloperoksidaz, NADPH oksidaz ve 12/15-lipoksijenaz gibi yüksek düzeyde oksidan üreten enzimler salınır. Bu enzimler, dokuda oksidatif hasar oluşumuna neden olur ve inflamatuvar yanıtları tetikler.<sup>21</sup> Uzun süreli inflamasyonda anjiyogenezis artmıştır. Plazma vasküler endotelial büyüme faktörü ve plasenta büyüme faktörü de artmıştır. Bu iki madde de proanjiyojenik faktörlerdir. Plasenta büyüme faktörü, artmış eritropoetin seviyeleri ile vasküler endotelial büyüme faktörü ise hem uzun süreli hipoksi, hem de plasenta büyüme faktörü tarafından uyarılabilir. Eritropoetin kendisi de anjiyogenezise neden olmaktadır.<sup>22,23,24</sup> Endotel, normalde pıhtılaşma sisteminin düzenlenmesine yardımcı olan trombojenik olmayan bir yüzey içerir.<sup>25,26</sup> Orak hücreli anemili hastalarda özellikle akut damar tıkalı krizler esnasında pıhtılaşma sistemi aktive olmaya meyillidir. Bu durumun gelişmesinde; ciddi trombin üretimi, trombositlerin uyarılması, fibrinolizis ve antitrombotik yapıların tüketimi rol oynamaktadır. Pıhtılaşma sisteminin tetikleyicisi olan doku faktörü, orak hücre hastalığında monositlerden ve endotel hücrelerinden anormal şekilde salınmaktadır.<sup>27,28</sup>



**Şekil 2.** OHA patofizyolojisi <sup>2</sup>

#### 4.2.1 NETosis

İlk olarak 2004 yılında, nötrofillerin hücre dışına kromatin ağları salarak patojenleri etkisiz hale getirebildiği keşfedilmiştir.<sup>30</sup> 2007 yılında bu cevabın sonucunda nötrofillerin canlılıklarını yitirdikleri görülerek bu yolak NETosis (nötrofil hücre dışı tuzakları) terimi ile tanımlanmıştır.<sup>31</sup> Nekroz ve apoptozdan farklı mekanizmalarla endojen ve ekzojen uyarılarla bu yanıtın eozinofiller, mast hücreleri, monosit ve makrofajlar tarafından da verilebileceği düşünülmektedir. İnterlökin-1 alfa, amfoterisin B, hmgB 1 (yüksek motilite grup 1), ürik asit kristalleri, HPS (ısı şok proteinleri) gibi endojen uyarılar genellikle hasar görmüş dokulardan salınarak, steril inflamasyona neden olurken çeşitli mikroorganizma yapıları, patojen ilişkili moleküler patternler gibi ekzojen uyarılarla farklı bir NETs yanıtı meydana getirmektedirler.<sup>32</sup> İlk olarak, PMA (forbol miristat asetat) ile 4 saat inkübe edilerek uyarılmış nötrofillerin, hücre dışına bakterisidal etkili intrastoplazmik granüllerden salınan proteinleri, açılmış DNA parçalarını ağ benzeri bir yapı şeklinde saldırdığı ortaya konmuştur. Günümüzde NETs aktivitesinin, mikroorganizmaları bağladığı, yayılmalarını engellediği ve ek olarak kronik inflamasyonun, otoimmün hastalıkların bağışıklık sistemi açısından önemli bir bileşeni olduğu düşünülmektedir.<sup>30, 33,34,35</sup>

#### 4.2.2 NETs Çeşitleri

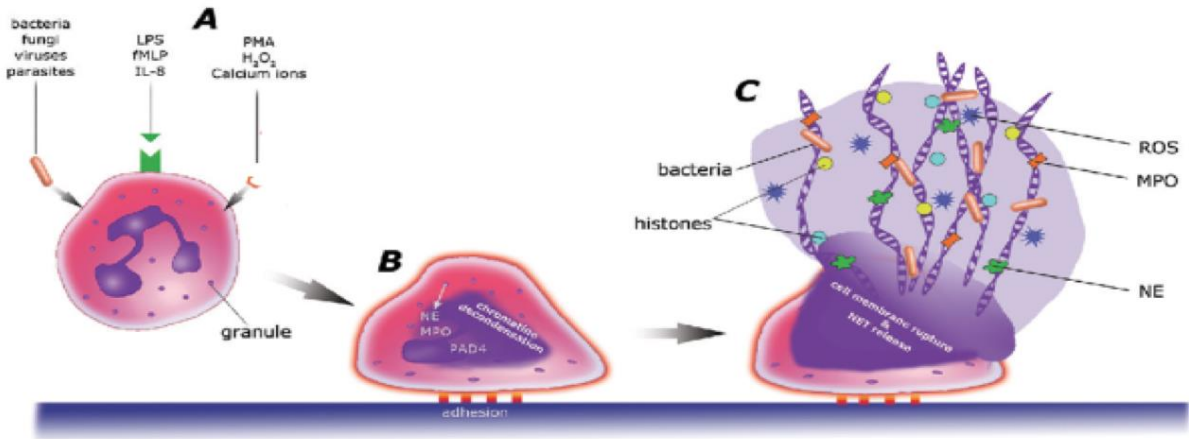
NETS yanıtının heterojendir; vital (yaşamsal) ve suicidal (öldürücü) olarak adlandırılan iki farklı yol ile bu yanıtların oluştuğu görüşü son yıllarda önplandadır.<sup>32</sup> Nötrofil fonksiyonlarından fagositoz ve kemotaksis işlevlerinin korunduğu olaylarda vital NETosis, hücre ölümünün gerçekleştiğinde ise suicidal NETosis söz konusudur. İki yoldan hangisinin aktive olacağını belirleyen temel etken, uyarının çeşididir. Suicidal NETs ile ilgili in vivo ve in vitro birçok çalışma yapılmakta iken, vital NETS ile ilgili bilgiler henüz başlangıç aşamasındadır.<sup>32,36,37</sup>

Yapılan çalışmalarda PMA uyarısının en potent uyarıcı olarak ROS yolağını aktive ederek suicidal NETS oluşumunu tetiklediği görülmüştür.

Toll like reseptörler gibi konağın spesifik hale getirdiği, mikrobiyal spesifik patternlerle ise vital NETS aktivitesinin tetiklendiği görülmüştür.<sup>30,38</sup>

Suicidal NETs yanıtı NADPH oksidaz bağımlı reaktif oksijen radikalleri (ROS; süperoksidad, hipoklorid, peroksidad) oluşumu ile aktive olmaktadır. Aktivasyondan dakikalar sonra nötrofiller düzleşerek patojene tutunur. Yaklaşık bir saat içerisinde hücrenin çok loblu çekirdek yapısı birleşerek tek bir lob haline gelir. Sonraki bir saat içerisinde PAD 4 (peptidil arjinin deiminaz 4) bağımlı sitrüllemiş histonların ROS aktivasyonu sonucu salınan myeloperoksidad ve nötrofil elastaz enzimlerinin çekirdek içine salınması ile kromatin yapı açılır, çekirdek vakuolleşir, mitokondriyal disfonksiyon meydana gelir. İntrasitoplazmik granüllerden salınan myeloperoksidad, nötrofil elastaz, katepsin G, proteinaz 3, bakterisidal proteinlerden katyonik bakterisidal/permeabilite arttıran protein, kalgranulin, alfa defensin, laktoferrin, parçalanmış nötrofil hücre membranından ekstraselüler ortama salınır. Ekstraselüler alanda sadece ince uzamış filamentler değil, aynı zamanda hücrenin kapladığı alanı 10-15 kat büyüten bulutsu yapılar meydana gelir.<sup>34,39,40</sup>

Vital NETs yanıtında ise ROS'den bağımsız şekilde DNA parçalarının ekstraselüler alana salınımı, veziküllerle hücre membranı dağılmadan suicidal yola göre daha hızlı olmaktadır. Bu şekilde geriye kalan anükleer hücreler, fonksiyonlarını korumuş olmaktadır. İnsanlarda incelenen abses örneklerinde bu şekilde anükleer nötrofillere sıklıkla rastlanmaktadır.



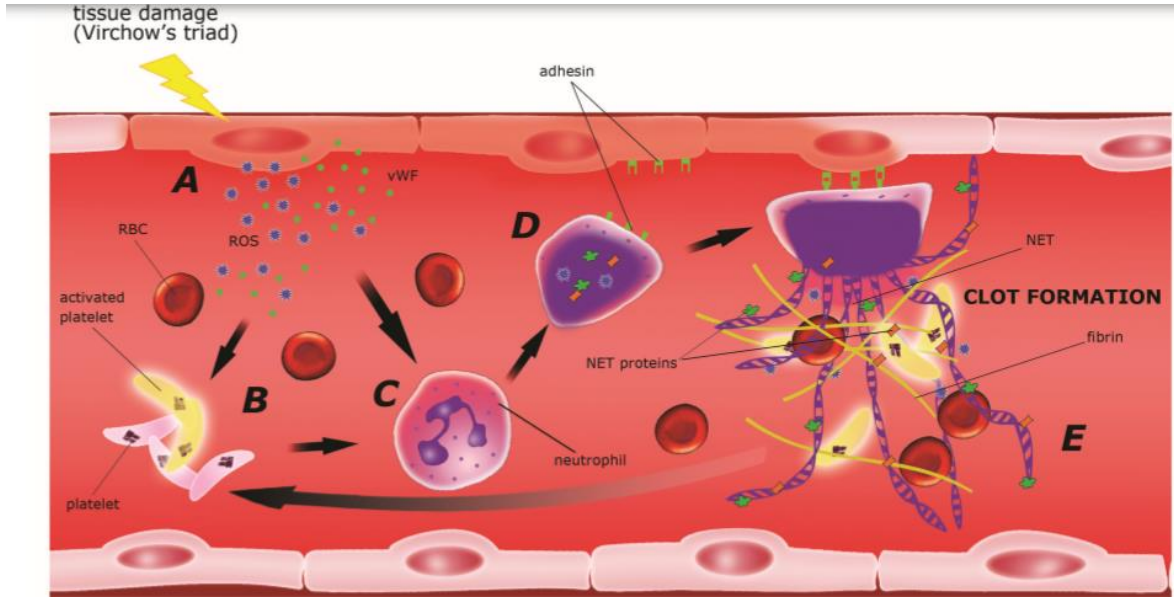
**Şekil 3.** NETs oluşum mekanizması: reseptörlerin uyarılarla (bakteri, fungus, virüs, parazit, kimyasal faktörler- lipopolisakkardiler gibi-)stimulasyonu (A) PAD4 uyarısının oluşması, histonların sitrüllenmesi ve nötrofil elastaz, myeloperoksidaz ile histon bölünmesi sonucunda kromatin dekonsandasyonu, nötrofillerin endotele tutunması(B) NETs salınması ve bakterileri yakalaması (C).

#### 4.2.3 NETs ve Kronik İnflamasyon

Konak bağışıklık yanıtında mikroorganizmaların eliminasyonu açısından hem vital hem suicidal NETs her ne kadar önemli bir rol oynasa da özellikle suicidal NETs yanıtının damar endotel hücrelerinde hasara, tromboza ve diyabetik yaraların iyileşmesinde gecikmeye yol açabildiği görülmüştür. Ek olarak, suicidal NETs yolağında bozulmuş regülasyonun, kronik inflamasyonun görüldüğü otoimmün hastalıklarda (sistemik lupus eritematozis, romatoid artrit, gut, psöriazis, ANCA ilişkili vaskülit), kanser, TRALI (transfüzyon ilişkili akut akciğer hasarı), trombotik olaylarda rol oynadığı belirtilmiştir.<sup>34,40,41</sup>

#### 4.2.4 NETs ve Tromboz

Virchow triadı, staz, endotel hasarı ve hiperkoagülasyon bileşenleri olan bir tromboz oluşum mekanizmasıdır. Staz, platelet birikimine ve prokoagülan maddelerin artmasına ve trombüs formasyonuna neden olur. Ek olarak lokal hipoksi de endotel aktivasyonuna neden olabilmektedir. Aktive endotelden, platelet tutunmasına ve birikmesine neden olan von Willebrand faktör salgılanmaktadır. Aynı zamanda aktive endotelden NETosis'i tetikleyen uyarılar da salgılanmaktadır.<sup>41,42,43,44</sup>



**Şekil 4.** Damar hasarı sonrası pıhtı oluşumu: Endotel hücrelerinde damar hasarı sonrası vWF (von Willebrand faktör) salınımı (A) Platelet ve nötrofillerde aktivasyon (B) Aktive plateletlerin de nötrofilleri uyarabilmesi (C), Çekirdekte değişimler (D), NETs oluşumunun kan hücrelerini, proteinleri, fibrin yapılarını bağlaması ve pıhtı oluşumuna neden olması (E)<sup>34</sup>

#### 4.2.5 NETs Belirteçleri ve NETosis Saptama Yöntemleri

NETs oluşumu, vital ve suicidal yolların her ikisinde de işleyişlerinin ve hücresel mekanizmalarının farklı olması nedeniyle in vivo ve in vitro farklı yöntemlerle ortaya konulabilmektedir.

NETs oluşumunu saptamak için kullanan kantitatif yöntemlerin başında klasik mikroskopik analiz gelir. İmmun boyamalarla çekirdek dağılımı, çekirdek ve granüler proteinlerin görülebilmesi çoğu zaman mümkün olabilmektedir. Bu yöntemin öznel olması ve pozitif ayrımcılığa açık olması objektivitesini azaltmaktadır.

Multispektral görüntüleme ve flow sitometri yöntemi ise floresan mikroskobu ve akım sitometri yöntemlerini harmanlayarak objektif bir incelemeyi mümkün kılmaktadır.<sup>45</sup>

Başlıca kullanılan yöntem ve belirteçler şunlardır:

- Hücre dışı DNA ve bu DNA'ya eşlik eden nötrofillerden salınan proteinlerin mikroskop ile immün boyama sonrası incelenmesi: Günümüzde kullanılan en popüler yöntemdir. İşlenmesi kolaydır; nötrofillerin inkubasyonu sonrası myeloperoksidaz, proteinaz 3, nötrofil elastaz gibi proteinlerin ve hücre dışı



- DNA'nın immun fiksasyon sonrası boyanmasına dayanır. Fotoğrafik görüntü alınır. Objektivitesi düşüktür. NETs spesifitesi önlem gerektirir.<sup>45,46,47,48,49,50</sup>
- b) Sitrüllemiş histonların varlığı: İşlenmesi kolaydır, ancak sadece PAD-4 bağımlı yol ile oluşan NETs saptanabilir. Objektivitesi düşüktür. NETs spesifitesi önlem gerektirir.<sup>45, 47, 48, 49, 51</sup>
- c) Hücre yapısı olmadan DNA aranması: Kit gereklidir, diğer hücre ölümlerinden ortaya çıkan DNA parçaları da saptanabilir. Objektivitesi yüksektir. NETs spesifitesi önlem gerektirir.<sup>52,53,54</sup>
- d) Myeloperoksidaz/Nötrofil elastaz- DNA kompleksi: Standardizasyon gereklidir. Objektivitesi yüksektir. NETs spesifitesi yüksektir.<sup>45,46,47,54,55</sup>
- e) NETosisin görüntüye dayalı akım sitometri yöntemi ile saptanması: Yaygın kullanıma ihtiyaç vardır. Objektivitesi yüksektir. NETs spesifitesi yüksektir.<sup>57</sup>
- f) Hücreye eklenmiş NET bileşenlerinin akım sitometrik yol ile saptanması: İleri çalışmalara ihtiyaç vardır. Objektivitesi yüksektir. NETs spesifitesi potansiyel olarak yüksektir.<sup>58</sup>

#### **4.3 Orak Hücre Anemili Hastalarda Nötrofil Aktivasyonu**

Orak hücre anemili hastalarda görülen morbidite ve mortalitenin en önemli nedeni vasküler oklüzyondur. Vazo- oklüziv olaylarda nötrofil aktivasyonunun önemli rol oynaması, NETs oluşumunun ve bunun sonucunda meydana gelen çeşitli belirteçlerin saptanması, bu hastaların mortalite ve morbiditesinin ortaya konmasında önemli bir rol oynamaktadır.<sup>41,59,60,61</sup>

## 5. HASTALAR VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Mersin Üniversitesi Hematoloji polikliniğine 01.01.2018 – 01.07.2017 tarihleri arasında başvuran ve çalışmaya katılmayı kabul edenorak hücre hastalığı dışında bilinen herhangi bir hastalığı olmayan bireyler hasta grubu olarak, bilinen herhangi bir kronik hastalığı olmayan bireyler ise kontrol grubu olarak çalışmaya alınmıştır. Güç analizi PASS v.11 paket programı deneme sürümü ile yapılmıştır. Çalışmadan elde edilen veriler istatistiksel değerlendirmesinde grupların karşılaştırılmasında verilerin dağılım şekline bağlı olarak Independent Samples t test ve ANOVA veya Mann- Whitney U test ve Kruskal- Wallis testlerinden yararlanılmıştır. Kategorik değişkenler bakımından çapraz tablo istatistikleri ve Logistic Regression analizi ile değerlendirme yapılmıştır. Güç analizi için etki büyüklüğü d=25 olarak dikkate alınmıştır. Minimum örneklem genişliği, %5 I. Tip hata payı ve %80 güç ile 50 birey olarak saptanmıştır.

Orak hücre anemili bireylerin dahil edilme kriterleri:

1. 18-50 yaş arası
2. 01.01.2018-01.07.2018 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Polikliniği'ne başvuru
3. Folik asit ya da hidroksiüre tedavisi alanl vakaların dahil edilebilmesi planlanmıştır
4. Aktif enfeksiyon bulgusu olmaması
5. Son 3 ayda kan transfüzyonu yapılmaması
6. Son 1 ay içinde ağrılı kriz geçirmemek
7. Gebelik ya da laktasyon döneminde olmamak
8. Orak hücreli anemi dışında kronik hastalığın olmaması (diyabet, hipertansiyon, hiperlipidemi, kalp, karaciğer, böbrek yetmezliği, koroner arter hastalığı, serebrovasküler hastalıkları, kalıtsal hastalıklar, malignite)

Orak hücre anemili bireylerin dışlanma kriterleri:

1. 18 yaşından küçük, 50 yaşından büyük hastalar
2. Aktif enfeksiyon döneminde olmak
3. Son 3 ay içinde kan transfüzyonu yapılması
4. Son 1 ay içinde ağrılı kriz geçirmek
5. Gebelik ya da laktasyon döneminde olmak
6. Folik asit ya da hidroksiüre dışında ilaç kullanmak

7. Kronik hastalık olması (diyabet, hipertansiyon, hiperlipidemi, kalp, karaciğer, böbrek yetmezliği, koroner arter hastalığı, serebrovasküler hastalıkları, kalıtsal hastalıklar, malignite)

Sağlıklı bireylerin kontrol grubu olarak dahil edilme kriterleri:

1. 18-50 yaş arası
2. Kronik hastalığı olmaması (diyabet, hipertansiyon, hiperlipidemi, kalp, karaciğer, böbrek yetmezliği, koroner arter hastalığı, serebrovasküler hastalıkları, kalıtsal hastalıklar, malignite)
3. Düzenli ilaç kullanımı olmayan bireyler
4. Gebelik ya da laktasyon döneminde olmamak

Sağlıklı bireylerin dışlanma kriterleri:

1. 18 yaşından küçük, 50 yaşından büyük olmak
2. Kronik hastalığı olmaması (diyabet, hipertansiyon, hiperlipidemi, kalp, karaciğer, böbrek yetmezliği, koroner arter hastalığı, serebrovasküler hastalıkları, kalıtsal hastalıklar, malignite)
3. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi personeli olmak
4. Gebelik ya da laktasyon döneminde olmak

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji bölümüne başvuran orak hücreli anemili hastaların ve sağlıklı kişilerin kan örnekleri, onamları alındıktan sonra alınmıştır. Çalışmaya 25 orak hücreli anemi hastasının ve kontrol grubuna da 25 sağlıklı birey dahil edilerek hastaların ve sağlıklı bireylerin 2 mL'lik venöz kan örnekleri, nötrofil elastaz enzim düzeyi için EDTA'lı tüpe, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi hematoloji polikliniğinde Dr. Anıl Tombak ve Dr. Gizem Hatem tarafından alınmıştır. Nötrofil izolasyonu için EDTA'lı tüpe alınan kan örnekleri 4000 devirde 10 dakika santrifüj edildikten sonra +4 °C'de Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, biyokimya laboratuvarında saklanmıştır. Tüm kan örnekleri aynı anda çalışılmıştır. MACSxpress® Neutrophil Isolation Kit Human kullanılarak elde edilen nötrofiller NETs oluşumu için kullanılmıştır. NETosis ASSAY Kit aşamasında hücreler NET assay buffer ile süspansiyon edilip inkübe edildikten sonra santrifüj edilerek nötrofil elastaz enzim aktivitesi çalışılması için toplanmıştır. Elde edilen supernatantlara NET Assay Neutrophil Elastase Substrate eklenerek inkübe edildikten sonra plate üzerindeki film açılarak 405 nm'de okutulmuştur. Standartlardan faydalanarak konsantrasyon absorbans grafiği çizilmiş ve hesaplamalar Tıbbi Farmakoloji Laboratuvarında ve Biyokimya Bölümü'nde yapılmıştır.

Bu alışma, tek merkezli, rutin muayene, tetkik, tahlil ve tedavi işlemleri sırasında elde edilmiş kan örnekleri ile yapılmış kontrollü bir çalışmadır. Mersin Üniversitesi Etik Kurulu'ndan 28.04.2017 tarihinde 2017/134 sayılı etik kurulu kararı ile onay alınmıştır.



## 6. BULGULAR

Orak hücreli anemili hastalarda NETosis oluşumunu gösterebilmek amacıyla yapılan çalışmamıza Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Polikliniğine başvuran 25 orak hücre anemili gönüllü, 25 sağlıklı gönüllü dahil edilmiştir. Her 2 grubun cinsiyet oranları benzerdi ( $p=0,859$ ). Hasta grubunun ortalama yaşı  $36,24\pm 9,58$ , sağlıklı kontrol grubunun ortalama yaşı  $31,75\pm 7,94$  idi ( $p=0,081$ ). Hasta grubunun 17'si HbS beta (+), 8'i HbSS vakalarından oluşuyordu.

### 6.1. Hasta ve kontrol grubu ile NETs oluşumu

Hasta ve kontrol grubu olarak NETs oluşumunun nötrofil elastaz enzim düzeyi ölçülerek hesaplaması yapıldığında, istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamakla beraber, NETs oluşumunun hasta grubunda, sağlıklı kontrol grubuna göre daha fazla olduğu bulundu. Hasta grubunda ortalama NETosis değeri  $1,016\pm 1,59$  iken, sağlıklı kontrol grubunda  $0,657\pm 0,63$  olarak bulundu ( $p=0,329$ ). Hasta grubunda kendi içinde bakıldığında ise HbS beta (+) vakalar ile HbSS vakaları arasında NETosis açısından fark saptanmadı (ortalama NETosis değeri sırayla  $1,07\pm 1,91$  ve  $0,901\pm 0,57$ ,  $p=0,811$ )(tablo 9 ve 10).

**Tablo.1:** NETs oluşumunun hasta ve kontrol grupları ile korelasyonu

| NETS    | N  | Mean  | Std. Deviation | p     | Minimum | Maximum |
|---------|----|-------|----------------|-------|---------|---------|
| kontrol | 22 | 0,657 | 0,632          |       | 0,05    | 2,43    |
| SS      | 8  | 0,901 | 0,575          | 0,595 | 0,36    | 2,10    |
| SB      | 17 | 1,070 | 1,916          |       | 0,12    | 8,37    |

## 6.2 Hidroksiüre kullanımı ve NETs ilişkisi

Hastaların 7'si hidroksiüre kullanırken 18'i kullanmıyordu. Bu 2 grupta NETosis oluşumunun benzer oranda olduğu bulundu (hidroksiüre kullananlarda  $1,18 \pm 1,85$ , kullanmayanlarda ise  $0,58 \pm 0,34$ ,  $p=0,411$ ).

## 6.3 Ağrılı kriz ve NETs ilişkisi

Vakaların 12'si son 1 yıl içinde ağrılı kriz geçirmemişken, 9'u 1, 2'si 2, 1'i 3 ve 1'i de 4 kez ağrılı kriz geçirmişti ( $n=13$ ). Son 1 yıl içinde ağrılı kriz geçirenlerle geçirmeyenler arasında NETs oluşumu açısından fark saptanmamakla beraber, ağrılı kriz geçirenlerde NETs oluşum oranı daha fazla idi ( $1,40 \pm 2,12$ 'ye karşı  $0,59 \pm 0,50$ ,  $p = 0,212$ ).

**Tablo.2:** Ağrılı kriz varlığı ile NETS

|      | ağrılı_kriz | N  | Mean  | Std. Deviation | p     |
|------|-------------|----|-------|----------------|-------|
| NETS | yok         | 12 | 0,595 | 0,507          | 0,212 |
|      | var         | 13 | 1,405 | 2,127          |       |

**Tablo.3:** Ağrılı kriz sayısı ile NETS ilişkisi

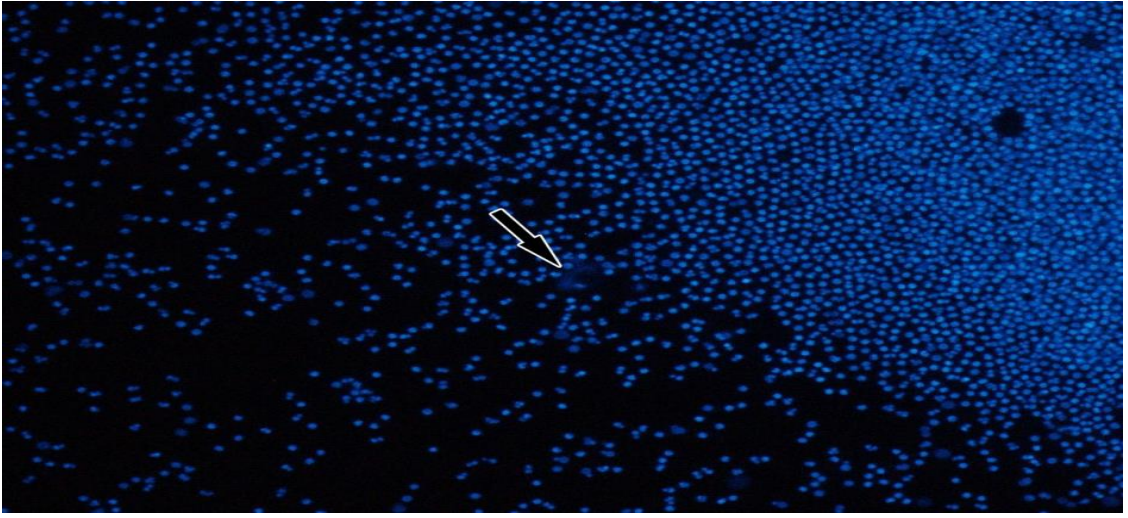
| NETS  | N  | Mean   | Std. Deviation | p      | Minimum | Maximum |
|-------|----|--------|----------------|--------|---------|---------|
| 0     | 12 | 0,5950 | 0,50657        |        | 0,12    | 2,10    |
| 1     | 9  | 1,6578 | 2,55233        |        | 0,36    | 8,37    |
| 2     | 2  | 0,7100 | 0,49497        |        | 0,36    | 1,06    |
| 3     | 1  | 0,8700 |                |        | 0,87    | 0,87    |
| 4     | 1  | 1,0500 |                |        | 1,05    | 1,05    |
| Total | 25 | 1,0160 | 1,59722        | ,31944 | 0,12    | 8,37    |

#### 6.4 Diğer parametreler ve NETs ilişkisi

NETosis gelişimi; hasta grubunda, HbS, HbF, HbA2 düzeylerine, Hb, platelet, lökosit, nötrofil ve lenfosit düzeylerine, LDH, ferritin ve CRP seviyesine göre farklılık göstermiyordu.

#### 6.4. İmmunfloresan görüntüleme:

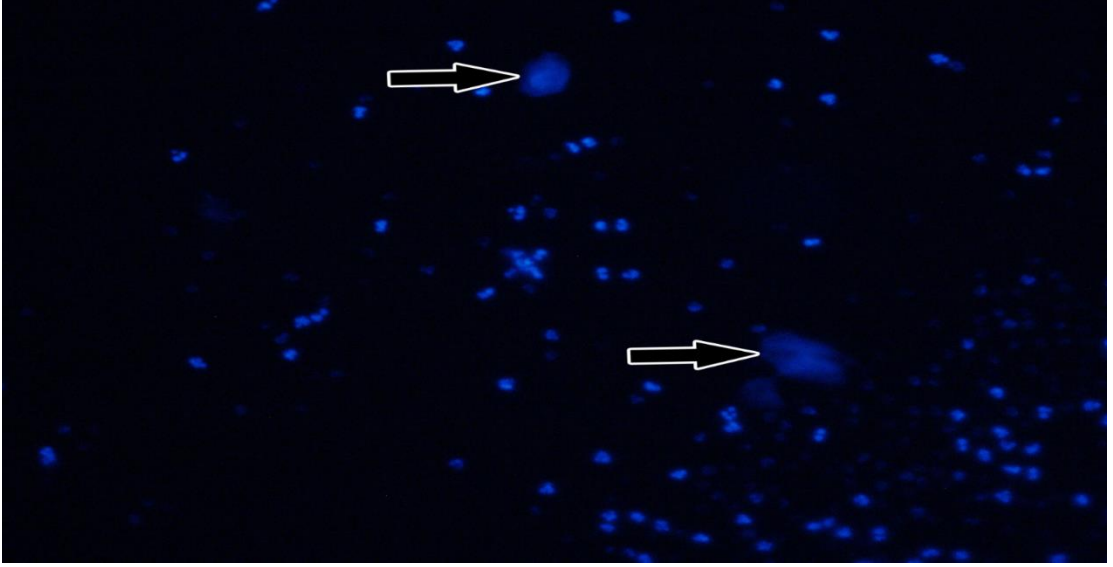
Kontrol grubundan alınan kan örnekleri immunfloresan görüntüleme protokolüne göre hazırlanmıştır.



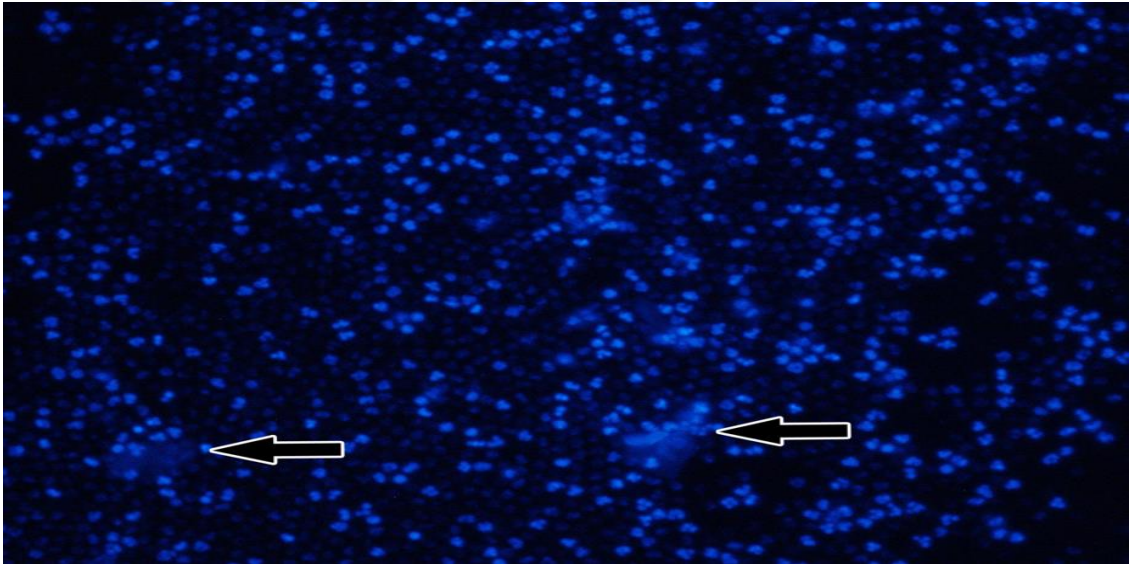
**şekil 5:** Kontrol grubu NETosisimmnfloresan görüntüsü (ok ) (10X Büyütme)

#### 6.5. Hasta grubu immunfloresan görüntüleme:

Hasta grubundan alınan kan örnekleri immunfloresan görüntüleme protokolüne göre hazırlanmıştır.



**Şekil 6:** Orak hücre anemili hastalarda NETosis immünfloresan görüntüsü (Ok) (20X Büyütme)

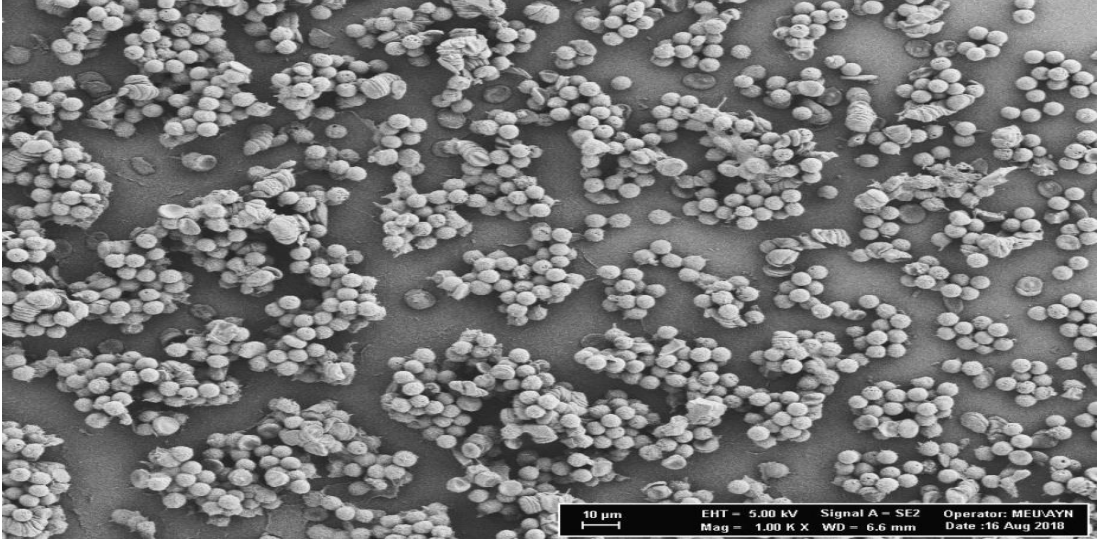


**Şekil 7:** Orak hücre anemili hastalarda NETosis immünfloresan görüntüsü (Ok) (20X Büyütme)

#### 6.6. Kontrol grubu Taramalı elektron mikroskopi (SEM)görüntüsü

Kontrol grubundan alınan kanlar SEM protokolüne göre hazırlanmıştır.

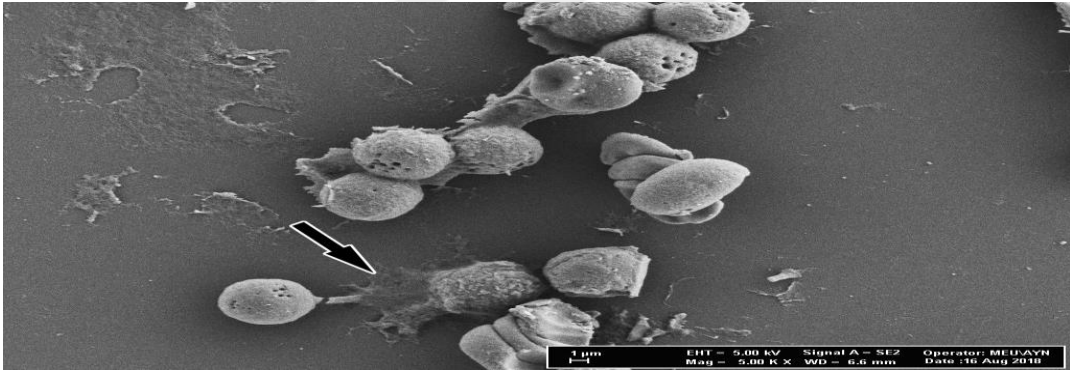




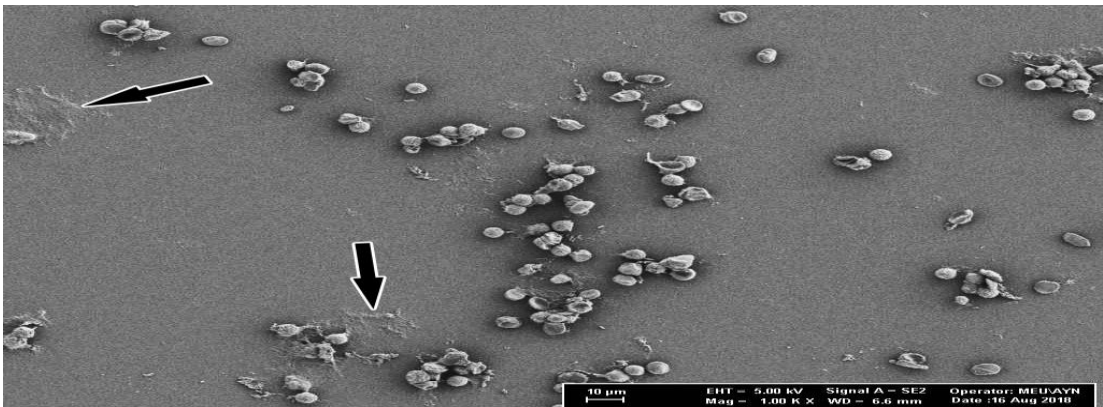
**Şekil.8 :** Kontrol grubu SEM görüntüsü

### 6.7. Hasta grubu SEM görüntüsü

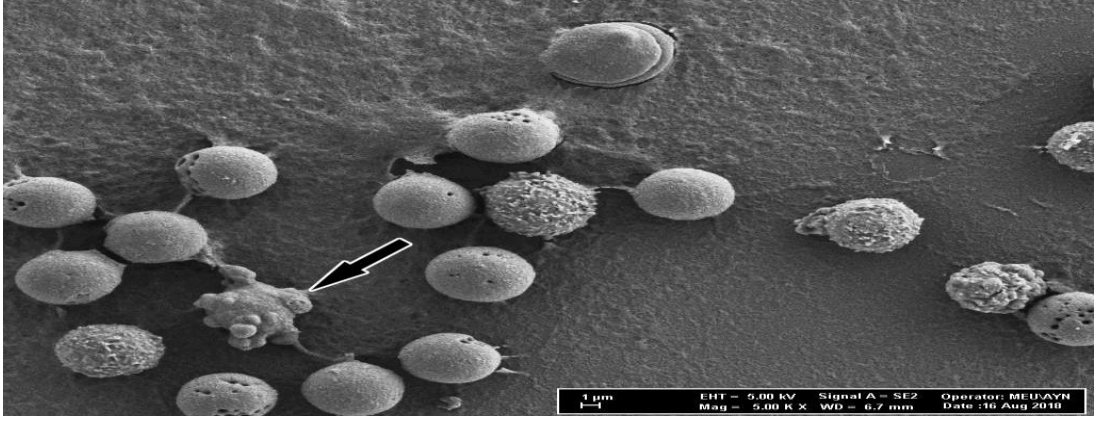
Hasta grubundan alınan kan örnekleri SEM protokolüne göre hazırlanmıştır.



**Şekil.9:** Orak hücre anemili hastalarda NETosis SEM görüntüsü



**Şekil.10:** Orak hücre anemili hastalarda NETosis SEM görüntüsü



**Şekil.11:** Orak hücreli anemili hastada apoptotik hücre SEM görüntüsü



## 7. TARTIŞMA

Orak hücreli anemi, ülkemizde ve dünyada genetik geçişli kan hastalıklarından mortalite ve morbiditeye neden olan en sık görülen hemoglobinopatilerdendir. Klinik tabloda; tekrarlayan ağrılı krizler, kronik hemolitik anemi, akut göğüs sendromu, pulmoner hipertansiyon, stroke, böbrek yetmezliği, priapizm, bacak ülserleri, osteonekroz ve kardiyak hastalık yer almaktadır. Hastalık patogenezinde, artmış vasküler inflamasyon, endotel hasarı ve koagülasyon aktivasyonu da yer almaktadır. Tekrarlayan inflamasyon, ilerleyen uç organ hasarı ve erken mortaliteye neden olmaktadır. Kronik inflamasyon, endotelyal disfonksiyonun önemli rol oynadığı orak hücreli anemide NETosisin patofizyolojide anahtar bir bileşen olduğu gösterilmiştir.

NETosis SLE, ANCA ilişkili vaskülit, romatoid artrit, antifosfolipid sendrom gibi otoimmün hastalıklarda, trombotik süreçlerde, bakteriyel, fungal enfeksiyonlarda, in vivo ve in vitro koşullarda hastalık anlarında ya da verilen uyarılarla birçok çalışmada oluşturularak, ELİSA, immunfloresan, SEM yöntemleri ile ortaya konmuştur.

İlk defa 2004 yılında Brinkmann ve arkadaşları tarafından nötrofillerin kromatin ve antimikrobiyal proteinler salarak gram pozitif ve negatif bakterileri bağladığı ortaya konmuştur. 2010 yılında Brinkmann ve arkadaşları tarafından çalışmamıza benzer şekilde insan kanından nötrofiller izole edilmiş, forbol miristat asetat (PMA) ile uyarılmıştır. Sonrasında taramalı elektron mikroskobu ile NETosis oluşumu morfolojik olarak görülmüştür.<sup>62</sup> Henüz NETosis saptanmasında standardize edilmiş bir yöntem yoktur.

Bu çalışmada orak hücreli anemili hastalarla sağlıklı kişilerden aldığımız kan örneklerinde nötrofil izolasyonu yaparak uygun ortamda NETosis oluşumu sağlanmıştır. Sonrasında NETosis belirteçlerinden nötrofil elastaz enzim düzeyi belirlenerek hasta ve kontrol gruplarında klinik ve demografik kriterlere göre istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı araştırılmıştır.

Barbu ve arkadaşları 2018 yılında 16orak hücreli anemili ile sağlıklı gönüller karşılaştırılmıştır. Hasta grubundan ağrılı kriz esnasında alınan kan örnekleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında NETosis flowsitometrik ve immunfloresan yöntem ile saptanmış, hasta grubunun tamamında nötrofil membranlarında hasar görülmüştür, NETosis oluşumunun ise heterojen olduğu gösterilmiş ve bu alanmda daha fazla araştırma gerektiği belirtilmiştir.<sup>63</sup>

Çalışmaya 25 hasta (17 HbS beta (+) talasemi ve 8 HbSS hastası) ve 25 sağlıklı gönüllüde kontrol grubu olarak dahil edilmiştir. İki grup arasında NETosis

ilişkinine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olmamasına rağmen hasta grubunda NETosis oluşumunun daha fazla olduğu saptandı (p= 0,329). İnflamasyonun arttığı orak hücreli anemi hastalığında NETs oluşumunun artması, inflamatuvar süreçlere ve endotelial hasara eşlik ediyor olabilir. Hasta grubunda NETosis oluşumunun, hemoglobin, nötrofil, CRP, ferritin ve LDH düzeylerinden etkilenmediği de bu çalışmada gösterildi. HbS, HbA2 ve Hb F düzeyleri ile HbF oluşumunu arttıran hidroksiüre kullanımının da NETosis oluşumunu etkilemediği gösterildi. Bununla beraber sık ağırlı kriz geçiren vakalarda, istatistiksel farklılık olmasa da NETs oluşumunun daha fazla olduğu bulundu.

Çalışmanın en önemli eksik kısmı, hem hasta, hem kontrol grubundaki vaka sayılarının az olmasıdır. Daha fazla sayıda vaka dahil edilmiş olsaydı, her 2 grup arasında istatistiksel bir fark saptanma olasılığı yüksekti.

## 8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmaya 01.01.2018-01.07.2018 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Polikliniği'ne başvuran, yaşları 18-50 arasında 25 hasta, 25 sağlıklı gönüllü dahil edildi. Hasta ve kontrol gruplarının demografik özellikleri, klinik bulguları, laboratuvar verileri karşılaştırmalı olarak değerlendirildi ve şu sonuçlar elde edildi.

1. Çalışmaya benzer yaş gruplarında ve benzer cinsiyetlerde 25'er orak hücreli anemi vakası ile 25 sağlıklı birey dahil edildi.
2. Hasta grubunda Hb SS tipte 5 erkek, 3 kadın hasta, HbS beta (+) tipte 8 erkek, 9 kadın hasta mevcuttu.
3. Hb SS grupta yaş ortalaması  $38,75 \pm 14,30$ , Hb S beta (+) grupta yaş ortalaması  $35,06 \pm 6,59$  idi.
4. Son bir yıl içinde 12 (%48) hasta hiç ağrılı kriz geçirmezken, 1-5 arası kriz geçiren 13 (%52) hasta idi.
5. Hasta ve kontrol grubu olarak NETs oluşumunun nötrofil elastaz enzim düzeyi ölçülerek hesaplaması yapıldığında kontrol grubunda ortalama değer  $0,65 \pm 0,63$ , Hb SS grupta  $0,901 \pm 0,575$ , Hb S beta grupta ortalama  $1,070 \pm 1,916$  olduğu görüldü. Gruplar arasında istatistiksel fark saptanmamakla beraber, hasta grupta sağlıklı bireylere göre NETosis'in arttığı saptandı. ( $p=0,595$ )
6. Hidroksiüre kullanımı ile NETs oluşumu arasındaki ilişkiye bakıldığında ilaç kullanmayan grupta ortalama değer  $0,584 \pm 0,346$ , kullanan grupta  $1,184 \pm 1,858$  idi. ( $p=0,411$ )
7. Ağrılı kriz geçirme ile NETs ilişkisinde ise son 1 yılda kriz geçirmeyen hastalarda ortalama  $5,955 \pm 0,507$  ( $p=0,212$ ), 1-5 arası kriz geçirenlerde ortalama  $1,405 \pm 2,12$  ( $p=2,127$ ) idi.
8. Ağrılı kriz sayısı arttıkça NETS değerinin arttığı, son 1 yıl içindeki ağrılı kriz sayısı ile NETS değeri arasında pozitif yönlü zayıf düzeyde korelasyon olduğu görüldü.
9. İmmunfloresan görüntülerde hasta ve kontrol grubundan örnekler gösterildi. Hasta kanından çalışılan görüntüde NETs oluşumuna görsel olarak daha yoğun rastlandı
10. Taramalı elektron mikroskopik görüntülerde hasta ve kontrol grubundan örnekler gösterildi. Hasta kanından çalışılan görüntüde NETs oluşumuna görsel olarak daha yoğun rastlandı

Bu çalışmada, her ne kadar istatistiki fark saptanmamış olsa da inflamasyonun arttığı orak hücreli anemili hastalarda sağlık bireylere kıyasla NETosis oluşumunun arttığı gösterilmiştir. NETosis oluşumun orak hücreli anemi hastalığının etiyopatogenezinin katkısına dair daha fazla sayıda vaka ile yapılmış daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır. Aynı zamanda, NETosis saptama yöntemleri standardize edilmelidir.



## 9. KAYNAKLAR

1. Frenette PS, Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest* 2007;117:850-8
2. Tüzmen Ş, Scheter A N. 'Genetic Diseases of Hemoglobin: Diagnostic methods for elucidating Sickle Cell Mutations'. *Blood Reviews* 2001; 15:19-25.
3. Harris JW. Studies on the destruction of red blood cells. VIII. Molecular orientation in sickle cell hemoglobin solutions. *Proc Soc Exp Biol Med* 1950; 75:197-201.
4. Schroeder WA, Kay LM, Wells IC, et al. Amino acid composition of hemoglobins of normal negroes and sickle cell anemics. *Journal of Biological Chemistry* 1950; 187:221-240
5. Marotta CA, Wilson JT, Forget BJ, et al. Human  $\beta$  globulin Messenger RNA III. Nucleotide sequences derived from complementary DNA. *Journal of Biological Chemistry* 1977; 252:40-
6. Stamatoyannopoulos G, Fessas P. Observation on hemoglobin 'Pylos'. The hemoglobin Pylos-hemoglobin S combination. *Journal of laboratory and clinical medicine* 1963; 62:193-200.
7. Dover G, Platt O. Sickle cell disease. *Hematology of Infancy and Childhood*. Saunders Company, Philadelphia 2003; 790- 841
8. Kılınç Y, Tanyeli A, Kümi M, et al. Hemoglobinopathies and thalassemia in Tarsus in Southern Turkey. *International Conference on Thalassemia, India, 1993*
9. Kulozik A, Waiscoat JS, Serjeant GR. Geographic survey of  $\beta$ S globulin gene Hablotypes: evidence for an independent Asian origin of the sickle cell mutation. *Annals of Journals of Human genetics* 1986; 39:239-44.
10. Serjeant GR. *Sickle Cell Disease*, ed 2. Oxford, Oxford University Pres 1992
11. Arcasoy A, Canatan D. Dünyada ve Türkiye'de talasemi ve hemoglobinopatiler. *Ulusal Hemoglobinopati Konseyi-Sağlık Bakanlığı, 2. baskı. AntalyaTürkiye* 2003:11-19.
12. Canatan D, Kose MR, Ustundag M, et al. Hemoglobinopathy Control Program in Turkey. *Community Genet* 2006; 9:124-126.
13. Eaton WA, Hofrichter J. Sickle cell hemoglobin polymerization. *Adv Protein Chem* 1990; 40:63-279
14. Embury SH. Sickle cell anemia and associate hemoglobinopathies. *Cecil Textbook of Medicine*. 21st Edition, Philadelphia: WB Saunders Company 2000:893-905.

15. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease, *Lancet* 2010; 376:2010-31.
16. Redding-Lallinger R, Knoll C. Sickle cell disease pathophysiology and treatment. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2006; 36:346-376.
17. Platt O.S. Sickle cell anemia as an inflammatory disease. *J Clin Invest* 2000; 106:337-338.
18. Granger DN, Korthuis RJ. Physiologic mechanisms of postischemic Tissue injury. *Annu Rev Physiol* 1995; 311-332.
19. Grisham MB, Granger DN, Lefer DJ. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: Relevance to ischemic heart disease. *Free Radic Biol Med* 1998; 25:404-433
20. De Caterina R, Libby P, Peng HB, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduce endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995; 96:60-68.
21. Kaul DK, Hebbel RP. Hypoxia/ reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *J Clin Invest* 2000; 106:411-420.
22. Solovey A, Gui L, Ramakrishnan S, et al. Sickle cell anemia as a possible state of enhanced anti-apoptotic tone: survival effect of vascular endothelial growth factor on circulating and unanchored endothelial cells. *Blood* 1999; 93:3824-3830.
23. Perelman N, Selvaraj SK, Batra S, et al. Placenta growth factor activates monocytes and correlates with sickle cell disease severity. *Blood* 2003; 102:1506-1514
24. Ribatti D, Presta M, Vacca A, et al. Human erythropoietin induces a proangiogenic phenotyp in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood* 1999; 93:2627—2636.
25. Preissner KT, Nawroth PP, Kanse SM. Vascular protease receptors: Integrating haemostasis and endothelial cell functions. *J Pathol* 2000; 190:360—372.
26. Silverstein RL. The vascular endothelium. In: *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates* (Jl Gallin and R Snyderman, Eds. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins 1999; 207-225.
27. Kurantsin-Mills J, Ofosu FA, Safa TK, et al. Plasma factor VII and thrombinantithrombin III levels indicate increased tissue factor activity in sickle cell patients. *Br J Haematol* 1992; 81:539-544.
28. Tomer A, Harker LA, Kasey S, et al. Thrombogenesis in sickle cell disease. *J Lab Clin Med* 2001; 137:398-407



29. Canatan D. Orak Hücre Anemisi. XXX. Ulusal Hematoloji Kongresi, 7. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu. İstanbul-Türkiye 2003; 93-99
30. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532–1535.
31. Brinkmann V, Zychlinsky A (2012) Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* 198: 773–783.
32. Brinkmann V, Zychlinsky A ,Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* 2012,198: 773–783.
33. Sakiko Masuda a , Daigo Nakazawa b , Haruki Shida b , Arina Miyoshi b , Yoshihiro Kusunoki b , Utano Tomaru c , Akihiro Ishizu a, 2016 NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers, *Clinica Chimica Acta*, 2016;459: 89-93
34. Aarbiou J, Tjabringa GS, Verhoosel RM, Ninaber DK, White SR, Peltenburg LTC, Rabe KF, Hiemstra PS ,Mechanisms of cell death induced by the neutrophil antimicrobial peptides alphadefensins and LL-37. *Inflamm Res* 2006,55: 119–127
35. Marcin Zawrotniak and Maria Rapala-Kozik, Neutrophil extracellular traps (NETs) — formation and implications, *Biochimica Polonica*, 2013, 60;277-284
36. Li P, Li M, Lindberg M. R, Kennett M. J, Xiong N, Wang ,PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med*2010; 207: 1853–1862.
37. Papayannopoulos V, Zychlinsky A ,NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol* 2009, 30: 513–521.
38. Parker H, Winterbourn CC ,Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps. *Frontiers Immunol* 2012,3: 424.
39. Mariana J. Kaplan, Marko Radic, Neutrophil extracellular traps (NETs): Double-edged swords of innate immunity, *J Immunol*. 2012 September 15; 189(6): 2689–2695. doi:10.4049/jimmunol.1201719
40. Jessica Cedervall , Anna-Karin Olsson, NETosis in cancer, *Oncoscience* 2015, Vol.2, No.11
41. Gretchen S. Selder , Allison E. Fetz , Marko Z. Radic ,Gary L. Bowlin, An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration, *Regenerative Biomaterials*, 2017, 55–68 doi: 10.1093/rb/rbw041
42. Brill A, Fuchs T, Chauhan AK, Yang JJ, De Meyer SF, Köllnberger M, Wakefield T, Lämmle B, Massberg S, Wagner DD ,von Willebrand factor-

- mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood* ,2011,117: 1400–1407.
43. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, De Meyer SF, Bhandari AA, Wagner DD ,Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thrombosis Haemostasis* 2012,10: 136–144
  44. Von Brühl M-L, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, Khandoga A, Tirniceriu A, Coletti R, Köllnberger M et al. Monocytes neutrophils and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*,2012, 209: 819–835.
  45. Demers M, Wagner DD ,Neutrophil extracellular traps: A new link to cancer-associated thrombosis and potential implications for tumor progression. 2012,*Oncoimmunol* 2: e22946.
  46. D. Nakazawa, U. Tomaru, A. Suzuki, S. Masuda, R. Hasegawa, T. Kobayashi, S. Nishio, M. Kasahara, A. Ishizu, Abnormal conformation and impaired degradation of propylthiouracil-induced neutrophil extracellular traps: implications of disordered neutrophil extracellular traps in a rat model of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis, *Arthritis Rheum.* 64 2012, 3779–3787.
  47. K. Kessenbrock, M. Krumbholz, U. Schonermarck, W. Back, W.L. Gross, Z. Werb, H.J. Grone, V. Brinkmann, D.E. Jenne, Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis, *Nat. Med.* 15 2009, 623–625
  48. D. Nakazawa, H. Shida, U. Tomaru, M. Yoshida, S. Nishio, T. Atsumi, A. Ishizu, Enhanced formation and disordered regulation of NETs in myeloperoxidaseANCA-associated microscopic polyangiitis, *J. Am. Soc. Nephrol.* 25 2014,990–997
  49. B.E. Steinberg, S. Grinstein, Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death, *Sci. STKE* 2007,pe11.
  50. D. Nakazawa, U. Tomaru, C. Yamamoto, S. Jodo, A. Ishizu, Abundant neutrophil extracellular traps in thrombus of patient with microscopic polyangiitis, *Front. Immunol.* 3, 2012,333
  51. M. Yoshida, M. Sasaki, K. Sugisaki, Y. Yamaguchi, M. Yamada, Neutrophil extracellular trap components in fibrinoid necrosis of the kidney with myeloperoxidaseANCA-associated vasculitis, *Clin. Kidney J.* 6 ,2013, 308–312.
  52. T. Imamoto, D. Nakazawa, H. Shida, A. Suzuki, N. Otsuka, U. Tomaru, A. Ishizu, Possible linkage between microscopic polyangiitis and thrombosis via neutrophil extracellular traps, *Clin. Exp. Rheumatol.* 32 2014,149–150.

53. S. Zhang, X. Lu, X. Shu, X. Tian, H. Yang, W. Yang, Y. Zhang, G. Wang, Elevated plasma cfDNA may be associated with active lupus nephritis and partially attributed to abnormal regulation of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with systemic lupus erythematosus, *Intern. Med.* 53 (2014) 2763–2771.
54. Y.H. Ma, T.T. Ma, C. Wang, H. Wang, D.Y. Chang, M. Chen, M.H. Zhao, High-mobility group box 1 potentiates antineutrophil cytoplasmic antibody-inducing neutrophil extracellular traps formation, *Arthritis Res. Ther.* 18 (2016) 2
55. A.J. Bronkhorst, J. Aucamp, P.J. Pretorius, Cell-free DNA: preanalytical variables, *Clin. Chim. Acta* 450 (2015) 243–253.
56. D. Soderberg, T. Kurz, A. Motamedi, T. Hellmark, P. Eriksson, M. Segelmark, Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the circulation of patients with small vessel vasculitis, but an inverse correlation to anti-neutrophil cytoplasmic antibodies during remission, *Rheumatology (Oxford)* 54 (2015) 2085–2094.
57. A. Miyoshi, M. Yamada, H. Shida, D. Nakazawa, Y. Kusunoki, A. Nakamura, H. Miyoshi, U. Tomaru, T. Atsumi, A. Ishizu, Circulating neutrophil extracellular trap levels in well-controlled type 2 diabetes and pathway involved in their formation induced by high-dose glucose, *Pathobiology* 83 2016, 243–251.
58. W. Zhao, D.K. Fogg, M.J. Kaplan, A novel image-based quantitative method for the characterization of NETosis, *J. Immunol. Methods* 423 (2015) 104–110.
59. M. Gavillet, K. Martinod, R. Renella, C. Harris, N.I. Shapiro, D.D. Wagner, D.A. Williams, Flow cytometric assay for direct quantification of neutrophil extracellular traps in blood samples, *Am. J. Hematol.* 90 2015, 1155–1158.
60. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011;11:519–31
61. Kumar V, Sharma A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol* 2010;10:1325–34
62. Young RE, Voisin MB, Wang S, et al. Role of neutrophil elastase in LTB<sub>4</sub>-induced neutrophil transmigration in vivo assessed with a specific inhibitor and neutrophil elastase deficient mice. *Br J Pharmacol* 2007;151:628–37.
63. Volker Brinkmann , Britta Laube , Ulrike Abu Abed , Christian Goosmann , Arturo Zychlinsky, Neutrophil Extracellular Traps: How to Generate and Visualize Them ,Core Facility Microscopy, Max Planck Institute for Infection Biology, Cellular Microbiology, Max Planck Institute for Infection Biology 2010 Feb 24; (36). pii: 1724. doi: 10.3791 / 172

64. Emilia Alina Barbu, Venina M. Dominical, Laurel Mendelsohn and Swee Lay Thein, J Immunol May 1, 2018, 200 (1 Supplement) 42.9;



## 10. SİMGELER ve KISALTMALAR

ANCA: ANTİ NÖTROPİLİK SİTOPLAZMİK ANTİKOR

ATP: ADENOZİN TRİFOSFAT

CRP: C- REAKTİF PROTEİN

DNA: DEOKSİRİBONÜKLEİK ASİT

ELISA: ENZYM-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

GAG: GUANİN- ADENİN- GUANİN

GLU: GLUTAMİK ASİT

HB: HEMOGLOBİN

HSP: ISI ŞOK PROTEİNİ

IL: İNTERLÖKİN

NADPH: NİKOTİNAMİD ADENİN DİNÜKLEOTİT FOSFAT

NET: NEUTROPHIL EXTRACELULER TRAP

NO: NİTRİK OKSİT

OHA: ORAK HÜCRELİ ANEMİ

PAD4: PEPTİDİL ARGİNİN DEAMİNAZ 4

PMA: PHORBOL MYRICTATE ACETATE

ROS: REAKTİF OKSİJEN RADİKALLERİ

SEM: SCREENING ELECTRON MICROSCOPE

TRALI: TRANSFUZYON İLİŞKİLİ AKCİĞER HASARI

VCAM: VASKÜLER HÜCRE ADEZYON MOLEKÜLÜ

## 11. ŞEKİL LİSTESİ

|  |    |
|--|----|
| <b>ŞEKİL 1:</b> NORMAL ERİTROSİT VE ORAK ŞEKLİNİ ALMIŞ ERİTROSİT | 10 |
| <b>ŞEKİL 2:</b> OHA PATOFİZYOLOJİSİ                              | 14 |
| <b>ŞEKİL 3:</b> NETS OLUŞUM MEKANİZMASI                          | 16 |
| <b>ŞEKİL 4:</b> DAMAR HASARI SONRASI PIHTI OLUŞUMU               | 17 |
| <b>ŞEKİL 5:</b> KONTROL GRUBU NETosis                            | 24 |
| <b>ŞEKİL 6:</b> HASTA GRUBU İMMUNFLORESAN GÖRÜNTÜŐÜ              | 25 |
| <b>ŞEKİL 7:</b> HASTA GRUBU SEM GÖRÜNTÜŐÜ                        | 25 |
| <b>ŞEKİL 8:</b> KONTROL GRUBU SEM GÖRÜNTÜŐÜ                      | 26 |
| <b>ŞEKİL 9:</b> HASTA GRUBU SEM GÖRÜNTÜŐÜ                        | 26 |
| <b>ŞEKİL 10:</b> HASTA GRUBU SEM GÖRÜNTÜŐÜ                       | 27 |
| <b>ŞEKİL 11:</b> HASTA GRUBU APOPİTOTİK HÜCRE SEM GÖRÜNTÜŐÜ      | 27 |



## 12. TABLOLAR DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| <b>Tablo.1:</b> NETs oluşumunun hasta ve kontrol grupları ile korelasyonu | 22 |
| <b>Tablo.2:</b> Ağırlı kriz varlığı ile NETs ilişkisi                     | 23 |
| <b>Tablo.3:</b> Ağırlı kriz sayısı ile NETs ilişkisi                      | 23 |

