



**T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ**

**ORAK HÜCRE ANEMİLİ HASTALARDA FETUİN-A,  
ENFLAMATUVAR MARKER VE OKSİDATİF STRES  
İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Kemal Türker ULUTAŞ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Sadık BÜYÜKBAŞ**

**HATAY – 2013**

**T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ**

**ORAK HÜCRE ANEMİLİ HASTALARDA FETUİN-A,  
ENFLAMATUVAR MARKER VE OKSİDATİF STRES  
İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Kemal Türker ULUTAŞ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Sadık BÜYÜKBAŞ**

**Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)  
tarafından 1104 U 0101 proje numarası ile desteklenmiştir**

# TEZ ONAY SAYFASI

T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**Tez Adı: ORAK HÜCRE ANEMİLİ HASTALARDA FETUİN-A,  
ENFLAMATUVAR MARKER VE OKSİDATİF STRES İLİŞKİSİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Tezi Hazırlayanın Adı: Dr. Kemal Türker ULUTAŞ**

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

(İmza).....  
Prof.Dr. Sadık BÜYÜKBAŞ  
Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının “Tıpta Uzmanlık” derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

(İmza).....  
Doç. Dr. Zafer YÖNDEN  
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

(İmza).....  
Prof.Dr. Sadık BÜYÜKBAŞ  
Tez Danışmanı

## TEZ JÜRİSİ:

1. ....(İsim ve imza).....
2. ....(İsim ve imza).....
3. ....(İsim ve imza).....
4. ....(İsim ve imza).....
5. ....(İsim ve imza).....

# I. İÇİNDEKİLER

## SAYFA

I. İÇİNDEKİLER.....	.iii
II. TABLO DİZİNİ.....	v
III. ŞEKİL DİZİNİ.....	.vi
IV. KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	.vii
V. TEŞEKKÜR.....	.viii
VI. ABSTRACT .....	ix
VII. ÖZET .....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Hemoglobin Yapısı ve Sentezi.....	3
2.2. Orak Hücre Anemisi.....	6
2.2.1. Tanım.....	6
2.2.2. Tarihçe.....	7
2.2.3. Prevalans ve Coğrafi Dağılım.....	9
2.2.4. Patofizyolojisi.....	10
2.3. Orak Hücre Anemisinde Enflamasyon.....	11
2.3.1. Fetuin-A.....	13
2.3.2. Tumor Nekroz Faktör ve Interleukin-6.....	15
2.4. Orak Hücre Anemisinde Oksidatif Stres.....	18
2.4.1. Oksidatif Stres.....	19
2.4.2. Serbest Radikaller.....	20
2.4.3. Hücreler Üzerine Etkileri.....	21
2.4.4. Reaktif Oksijen Türleri.....	23
2.4.5. Reaktif Nitrojen Türleri.....	26
2.4.6. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynağı.....	27
2.4.7. Radikallerin Hücre İçi Kaynakları.....	27
2.4.8. Radikallerin Hücre Dışı Kaynakları.....	31
2.4.9. Antioksidan Sistemler.....	32

2.5. Orak Hücre Anemisinde Endotel Hasarı.....	35
2.5.1. Nitrik Oksit.....	36
2.5.2. Myeloperoksidaz.....	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM	
3.1. Çalışma Şekli.....	39
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	40
3.3. Kimyasal Maddeler.....	40
3.4. Hematolojik Analizler.....	41
3.4.1. Hemogram Tayini.....	41
3.4.2. Hemolizat Hazırlanması.....	41
3.4.3. Manüel Hemogloblin Tayini.....	42
3.5. Analiz Yöntemleri.....	43
3.5.1. Fetuin-A Ölçümü.....	43
3.5.2. Interleukin-6 Ölçümü.....	43
3.5.3. Tumor Nekroz Faktör Ölçümü.....	44
3.5.4. Myeloperoksidaz Ölçümü.....	44
3.5.5. Nitrik Oksit Ölçümü.....	44
3.5.6. Katalaz Ölçümü.....	45
3.5.7. Glutasyon Peroksidaz Ölçümü.....	46
3.5.8. Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz Ölçümü.....	47
3.5.9. Süperoksit Dismutaz Ölçümü.....	48
3.5.10 Malondialdehid Ölçümü.....	49
3.6. İstatistiksel Analiz.....	50
4. BULGULAR.....	51
5. TARTIŞMA.....	69
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	76
7. KAYNAKLAR.....	77
8. ÖZGEÇMİŞ.....	112

## II. TABLO DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1:</b> Normal ve OHA hastalarında hemoglobin tipleri karşılaştırılması	7
<b>Tablo 2:</b> Biyolojik sistemde sık görülen serbest radikaller ve özellikleri	20
<b>Tablo 3:</b> Serbest oksijen radikallerinin endojen ve eksojen kaynakları	31
<b>Tablo 4:</b> Hasta ve kontrol grubun demografik verilerine ait ortalamalar	52
<b>Tablo 5:</b> Hasta ve kontrol grubun hematolojik verilerine ait ortalamalar	53
<b>Tablo 6:</b> Fetuin-A seviyeleri için Pearson bağıntı (korelasyon) analizi	53
<b>Tablo 7:</b> Hasta ve kontrol grubu inflamasyon ve oksidatif stres belirteçleri	54

### III. ŞEKİL DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1: Hemoglobinin molekülünün yapısı	3
Şekil 2: Hem'in ferruz demirle oluşturduğu tetrapirrol yapı	4
Şekil 3: Globin zincir sentezinin evreleri	5
Şekil 4: OHA hastasına ait periferik yayma örneği	6
Şekil 5: OHA'da ağrılı kriz ve iskemik hasar oluşum mekanizması	8
Şekil 6: HbS allelinin Dünya Sağlık Örgütü dağılım haritası	9
Şekil 7: Orak Hücre Anemisinde vasküler inflamasyon	12
Şekil 8: Endotel hücre aktivasyonunun OHA'nın patofizyolojisine etkisi	17
Şekil 9: Lipit peroksidasyonu ve parçalanma ürünleri	21
Şekil 10: OHA'da oksidatif stresin indüksiyonu ve NO oluşumuna etkisi	37
Şekil 11: MDA'nın TBA ile reaksiyonu ve TBA-MDA yapısı	50
Şekil 12: Hasta ve kontrol grubun demografik verilerin dağılımı	55
Şekil 13: Fetuin-A verilerinin gruplara göre dağılımı	55
Şekil 14: Hasta ve kontrol grubun hematolojik verilerin dağılımı	56
Şekil 15: Fetuin-A verilerinin TNF-Alfa'ya göre dağılımı	57
Şekil 16: Fetuin-A ve TNF-Alfa'nın OHA ve Kontrol grupları dağılımı	57
Şekil 17: Fetuin-A verilerinin IL-6'ya göre dağılımı	58
Şekil 18: Fetuin-A ve IL-6 verilerinin OHA ve Kontrol grupları dağılımı	58
Şekil 19: TNF-Alfa verilerinin gruplara göre dağılımı	59
Şekil 20: IL-6 verilerinin gruplara göre dağılımı	59
Şekil 21: G6PD enzim aktivitesinin gruplara göre dağılımı	60
Şekil 22: G6PD ile Fetuin-A arasında noktasal ortak veri dağılım grafiği	60
Şekil 23: Fetuin-A ve G6PD verilerinin OHA ve Kontrol grupları dağılımı	61
Şekil 24: G6PD ile Fetuin-A arasında noktasal ortak veri dağılım grafiği	61
Şekil 25: MDA ve G6PD verilerinin OHA ve Kontrol grupları dağılımı	62
Şekil 26: MDA seviyelerinin gruplara göre dağılımı	63
Şekil 27: MDA ile SOD noktasal ortak veri dağılım grafiği	63
Şekil 28: MDA ile Fetuin-A arasında noktasal ortak veri dağılım grafiği	64
Şekil 29: MDA ve Fetuin-A'nın OHA ve Kontrol gruplarına göre dağılımı	64
Şekil 30: SOD enzim aktivitesinin gruplara göre dağılımı	65
Şekil 31: CAT enzim aktivitesinin gruplara göre dağılımı	65
Şekil 32: GSH-Px enzim aktivitesinin gruplara göre dağılımı	66
Şekil 33: MPO seviyelerinin gruplara göre dağılımı	67
Şekil 34: MPO ve Fetuin-A verilerinin OHA ve Kontrol grupları dağılımı	67
Şekil 35: CRP seviyelerinin gruplara göre dağılımı	68
Şekil 36: CRP ve Fetuin-A verilerinin OHA ve Kontrol grupları dağılımı	68

## IV. SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\delta$	Delta
$\epsilon$	Epsilon
$\zeta$	Zeta
$\gamma$	Gamma
CAT	Katalaz
CRP	C-reactive protein
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
ET-1	Endothelin-1
FAD	Flavin adenin dinükleotid
GSH	Redükte glutatyon
GSH-Rd	Glutatyon redüktaz
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GSSG	Okside glutatyon
G6PD	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
GST	Glutatyon S transferaz
Hb	Hemoglobin
Hct	Hematokrit
Hp	Haptoglobin
IL-6	Interlökün 6
MCV	Ortalama eritrosit hacmi
MCH	Ortalama eritrosit hemoglobini
MCHC	Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu
MDA	Malondialdehit
MPO	Myeloperoksidaz
NADPH	Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NO	Nitrik Oksit
OHA	Orak Hücre Anemisi
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
RBC	Eritrosit (Kırmızı Kan Hücresi)
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
TNF-Alfa	Tümör Nekroz Faktör Alfa



## **V. TEŞEKKÜR**

Uzmanlık öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, hoşgörü ve sabırla her konuda beni destekleyen tez danışmanım sayın Prof. Dr. Sadık BÜYÜKBAŞ'a teşekkürü borç bilirim.

Eğitim ve tez çalışmama bilgi birikimleri ve görüşleriyle katkıda bulunan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalının çok kıymetli öğretim üyeleri, asistanları, arkadaşlarıma, bölüm çalışanlarına ve diğer bölümlerdeki değerli hocalarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmamı, 1104 U 0101 nolu proje ile destekleyen Mustafa Kemal Üniversitesi Rektörlüğüne ve Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca sabır ve desteğini esirgemeyen aileme, hep yanımda olan canım eşim Zehra ve hayat dolu yüzünü esirgemeyen bir tanecik oğlum Muharrem Enes'e şükranlarımı sunarım.

**Dr. Kemal Türker ULUTAŞ**

**HATAY / 2013**

## VI. ABSTRACT

### **Evaluation of Relationship among Fetuin-A, Inflammatory Markers and Oxidative Stress in the Patients with Sickle Cell Anemia**

**Aim:** Sickle cell anemia (SCA), common disease in Çukurova region, is a congenital hemoglobinopathy characterized by production of excessive amounts of reactive oxygen radicals in red blood cells, and microvascular hypoxia-reperfusion process giving rise to chronic inflammation along vascular structure. In the study, Fetuin-A levels and its relationship with inflammation and oxidative stress in SCA were aimed to evaluate.

**Material & Methods:** The study included patients with SCA (n=35) and healthy individuals (n=35) in adult age. After analyzing hematological data, Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GSH-Px) and Malondialdehyde (MDA) were measured from hemolysates. Fetuin-A, TNF-alpha, IL-6, Nitric Oxide (NO) and Myeloperoxidase (MPO) were measured from serum samples.

**Results:** Fetuin-A ( $p<0.001$ ), TNF-alpha ( $p<0.05$ ) and MDA ( $p<0.001$ ) were measured significantly higher in SCA group, but NO was decreased ( $p<0.01$ ). Similarly, G6PD ( $p<0.001$ ), SOD ( $p<0.01$ ) and MPO ( $p<0.01$ ) enzyme activities were determined higher in SCA when compared to the control group. However, there was no statistical significance in terms of IL-6, CAT and GSH-Px.

**Results:** Elevated Fetuin-A in patients with SCA and its positive correlations with both MDA and TNF-alpha levels demonstrated that Fetuin-A had an important role for pathophysiology of SCA in terms of relationship with inflammatory processes and oxidative stress.

**Key words:** Sickle Cell Anemia, fetuin-A, inflammation, oxidative stress

## VII. ÖZET

### **Orak Hücre Anemili Hastalarda Fetuin-A, Enflamatuvar Marker ve Oksidatif Stres İlişkisinin Değerlendirilmesi**

**Amaç:** Orak hücre anemisi, Çukurova bölgesinde yaygın görülen eritrositlerde aşırı reaktif oksijen radikali üretimi, vasküler seviyede kronik inflamasyona sebebiyet veren mikrovasküler hipoksik ve reperfüzyon süreci ile karakterize olan konjenital bir hemoglobinopatidir. Bu çalışmada, Orak hücre anemisinde Fetuin-A seviyesi ile bu hastalarda Fetuin-A'nın inflamasyon ve oksidatif stress ile ilişkisinin gösterilmesi amaçlandı.

**Yöntem:** Çalışmaya Orak hücre anemisi hastası (OHA) olan yetişkin yaş grubu hastalar (n=35) ve sağlıklı bireyler (n=35) dâhil edildi. Tüm örneklerin hematolojik verileri incelendikten sonra hemolizattan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve malondialdehit (MDA) analizi yapıldı. Serum örneklerinden Fetuin-A, TNF-Alfa, IL-6, Nitrik Oksit (NO) ve Myeloperoksidaz (MPO) çalışıldı.

**Bulgular:** Kontrol grubu ile OHA grubu karşılaştırıldığında Fetuin-A ( $p<0,001$ ), TNF-Alfa ( $p<0,05$ ) ve MDA seviyeleri ( $p<0,001$ ), OHA grubunda istatistiksel olarak yüksek tespit edilirken NO seviyesi düşük tespit edildi ( $p<0,01$ ). G6PD ( $p<0,001$ ), SOD ( $p<0,01$ ) ve MPO ( $p<0,05$ ) enzim aktiviteleri de benzer şekilde OHA grubunda kontrole göre yüksek tespit edildi. IL-6, CAT ve GSH-Px sonuçları bakımından gruplar arasında farklılık tespit edilmedi.

**Sonuçlar:** Fetuin-A'nın Orak hücre anemili hastalarda yüksek bulunması ve hem TNF-Alfa hem de MDA ile pozitif yönlü ilgileşim göstermesi, OHA'nın patofizyolojisinde Fetuin-A'nın inflamatuvar süreç ve oksidatif stresle yakın ilişkili olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Orak Hücre Anemisi, Fetuin-A, İnflamasyon, Oksidatif Stres

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Orak Hücre Anemisi (OHA), hemoglobinin tek bir amino asidin moleküler bozukluğu sonucu patolojik olarak polimerizasyonu ve sırasıyla eritrositlerde rijidite meydana gelmesi, kılcak damarlardaki zayıf kan akımı ve doku iskemisi ile karakterize bir hastalıktır (1, 2). Hemoglobinopatiler arasında en sık görülen hastalık olup içinde bulunduğumuz bölgeyi kapsayan Güney Anadolu'da % 0,5 ile % 37 arasında değişen oranlarda görülmektedir (3). Orak hücre hastalığına bağlı komplikasyonlar hastane polikliniklerine sık başvuru nedenleri arasındadır. Bu hastaların hastaneye yatış sebepleri arasında en sık akut ağrılı atak şikâyeti yatmaktadır (4).

Orak hücre hastalığı, otozomal resesif iletilen kalıtsal bir kan hastalığı olup en sık görülen hemoglobin sentez bozukluğudur (5). Hastalığın oluşma sebebi globin sentezi esnasında zincirin 6. konumundaki glutamin aminoasidinin valin ile yer değiştirmesine neden olan nokta mutasyon sonucu gelişen anormal hemoglobin sentezidir . Anormal yapılan globin sentezi sonucunda oluşan eritrositler, normal şeklini kaybederek orak hücre halini almaktadırlar (6). Eritrositler oraklaşınca küçük damarlarda tıkanıklık yaparak organ hasarına ve hastalığın klinik bulgularının oluşmasına neden olurlar (7). Hastalığın temel bulguları kronik hemolitik anemi, tekrarlayan ağrılı ataklar ve etkilenen organlarda meydana gelen işlev bozukluğudur. Hastalarda görülen akut vazo-oklüziv ağrılı krizler bu hastalığa bağlı hastaneye başvuruların en sık nedenidir (4, 8).

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, anormal vasküler tonus, aktive adhezif endotelyum bulgularını içeren damar fonksiyonunun patofizyolojisinin bağımsız bir spektrumu gösterildi (9, 10). Bu vasküler menşeli anormaliler, nitrik oksitin etkinliğinde hemoliz ile ilgili defekti, oksidatif stres, iskemi-reperfüzyon hasarı, hemostatik aktivasyon, lökositler ve trombositlere dayandırılmaktadır (11). OHA'daki vaskülopati, pulmoner hipertansiyon, felç, bacak ülseri ve priapizm gelişiminde sorumludur (12, 13). Özellikle de hemolojik durumun ciddiyeti ilişkilidir ve diğer tüm hemolitik bozukluklarda da rapor edilmiştir. Bu vaskülopati, OHA hastalarında görülen kronik organ disfonksiyonunda da rol oynuyor olabilir (14).

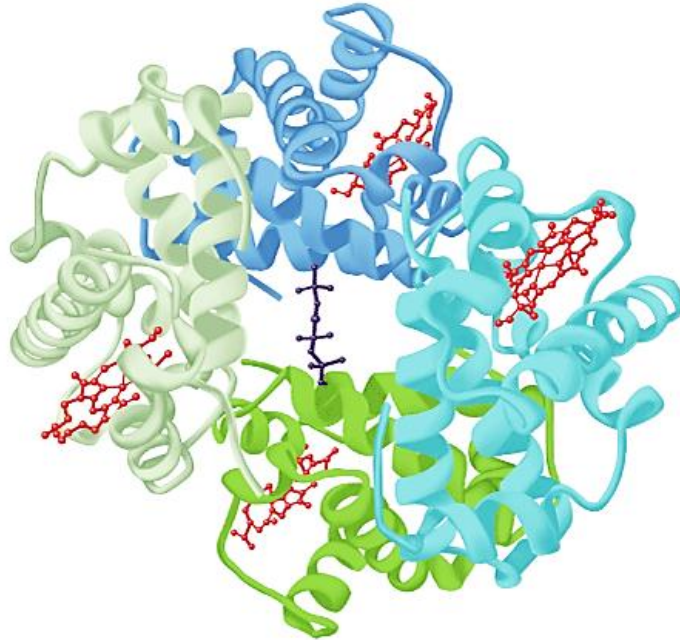
Vazo-oklüziv ağırlı kriz tanısı ile hastaneye başvuran hastalarda etkilenen alanda hassasiyet, ödem, ısı artışı gibi yerel bulgularla beraber ateş ve lökositoz gibi inflamasyonun sistemik belirtileri de tesbit edilebilir (15, 16). Ağırlı krizler sırasında C-reaktif protein,  $\alpha$ 1-glikoprotein ve transferrin gibi akut faz reaktantları belirgin olarak artar (15). Ayrıca inflamatuvar sitokinlerden tümör nekrotizan faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ), interlökin-1alfa (IL-1 $\alpha$ ), interlökin-6 (IL-6), interlökin-8 (IL-8), histamin ve lökotrien-B4 düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (17). Özellikle TNF- $\alpha$  ve IL-8'in orak şekli almış eritrositlerin damar endoteline yapışmasını artırarak kan akımını bozduğu ve iskemik atakların oluşmasına neden olduğu düşünülmektedir (13).

Bu çalışmamızda orak hücre anemili hastaların eritrositlerindeki oksidatif stres durumu ve inflamatuvar süreci birlikte değerlendirmek ve aralarındaki ilişkiyi göstermek amacıyla orak hücre anemili hasta grubu ve kontrol grubu olarak Orak hücre anemisi tanısı konmamış yetişkin grubu bireyler seçilmiş, her iki grupta da aynı parametrelerin çalışılması planlanmıştır. Hasta ve kontrol grubunun numunelerinde oksidatif stres belirteçleri ve anti oksidan sisteme ait enzimler ile birlikte inflamatuvar süreçte görev alan IL-6, TNF- $\alpha$  inflamatuvar süreçte görev alan yeni bir marker olan Fetuin-A parametrelerinin ölçülmesi ve orak hücre anemisi hastalığının patofizyolojisindeki etkinliklerinin birlikte değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

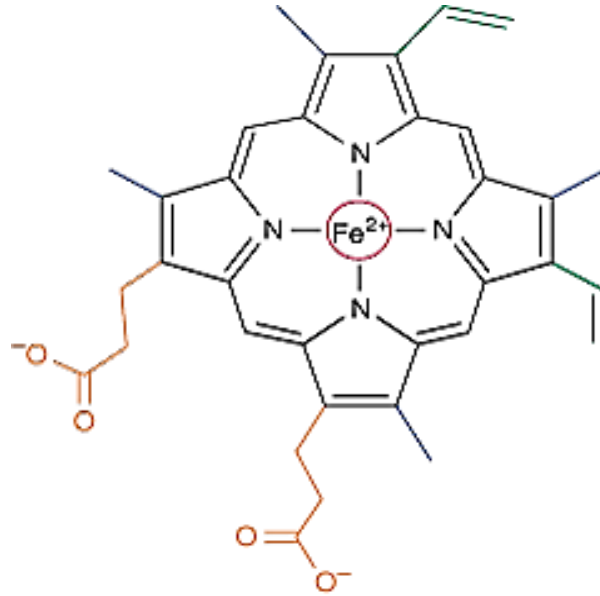
### 2.1. Hemoglobinin Yapısı ve Özellikleri

Hemoglobin, en yüksek oranda eritrositlerde bulunan, 6450Da moleküler ağırlığında, kabaca küresel yapıda yaklaşık 5,5 nm çapında tetramer yapıda bir proteindir (18). Peptid zincirleri arasındaki etkileşimler ile bir arada tutulan iki çift özdeş olmayan polipeptid zinciri ve dört molekül Hem'den oluşmaktadır (19) (Şekil 1). Akciğerlerden alınan oksijenin çevre dokulara ulaştırılması ve dokularda üretilen CO<sub>2</sub>'nin dışarı atılmasını sağlamakla görevlidir.



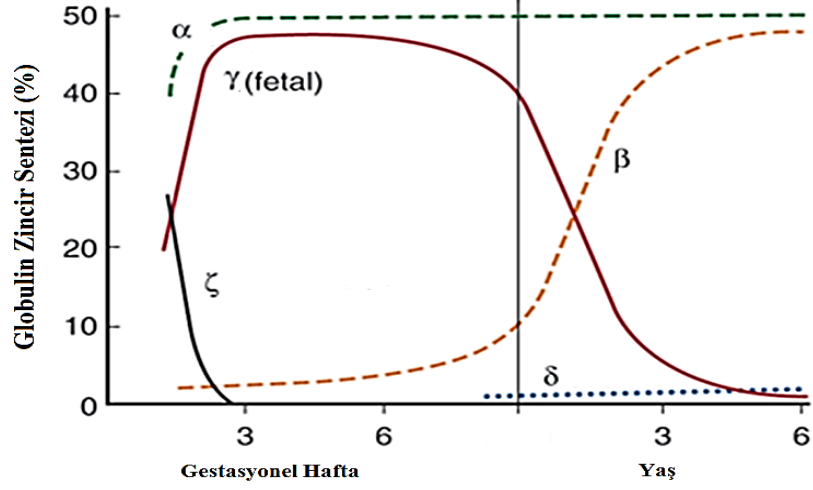
Şekil 1: Hemoglobinin üç boyutlu yapısı (20)

Tetrapirrol yapı düzlemsel bir halka içinde dört  $\alpha$ -metenil köprüsü ile birbirine bağlanmış dört pirrol molekülünden oluşmaktadır (21). Bu düzlemsel halkanın merkezinde bir ferruz demir atomu ( $Fe^{+2}$ ) yer alır. Demir, porfirin halkasının dört azotuyla bağlanarak hem molekülünün ortasında tutulur (22). Hemin,  $Fe^{+2}$ 'i her biri düzlemsel porfirin halkasının ayrı tarafında olan iki bağ daha yapar (Şekil 2). Bu pozisyonlardan biri globin molekülünün bir histidin kalıntısının yan zinciri ile olurken, diğeri oksijen bağlamaya uygun olarak bulunur (23, 24).



**Şekil 2:** Hem'in ferruz demir oluşturduğu tetrapiral yapı (25)

İnsanlarda  $\alpha$  ve  $\beta$  olmak üzere iki gen kümesi, gelişim sırasında hemoglobinlerin sentezini yönetir (26). Yetişkin hemoglobininin yaklaşık %96'sını oluşturan HbA, iki  $\alpha$  ve iki  $\beta$  ( $\alpha_2\beta_2$ ) olmak üzere 4 globin zincirinden oluşur. Minör erişkin hemoglobini olan HbA<sub>2</sub>, iki  $\alpha$  ve iki  $\delta$  ( $\alpha_2\delta_2$ ) zincirinden, fetal hemoglobin olan HbF ise iki  $\alpha$  ve iki  $\gamma$  ( $\alpha_2\gamma_2$ ) zincirinden oluşur (27). Normal erişkin hemoglobinlerindeki  $\alpha$  zinciri 141 aminoasit;  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  zincirleri ise 146 aminoasit içermektedir. Embriyonik gelişim sırasında tanımlanan hemoglobinler ise HbGower I ( $\zeta_2 \epsilon_2$ ), Hb Gower II ( $\alpha_2 \epsilon_2$ ) ve Hb Portland ( $\zeta_2 \gamma_2$ )'dır. Eritropoezin karaciğerde başlamasıyla fetal eritrositler oluşur (Şekil 3) (28).



Şekil 3: Globin zincir sentezinin evreleri (29)

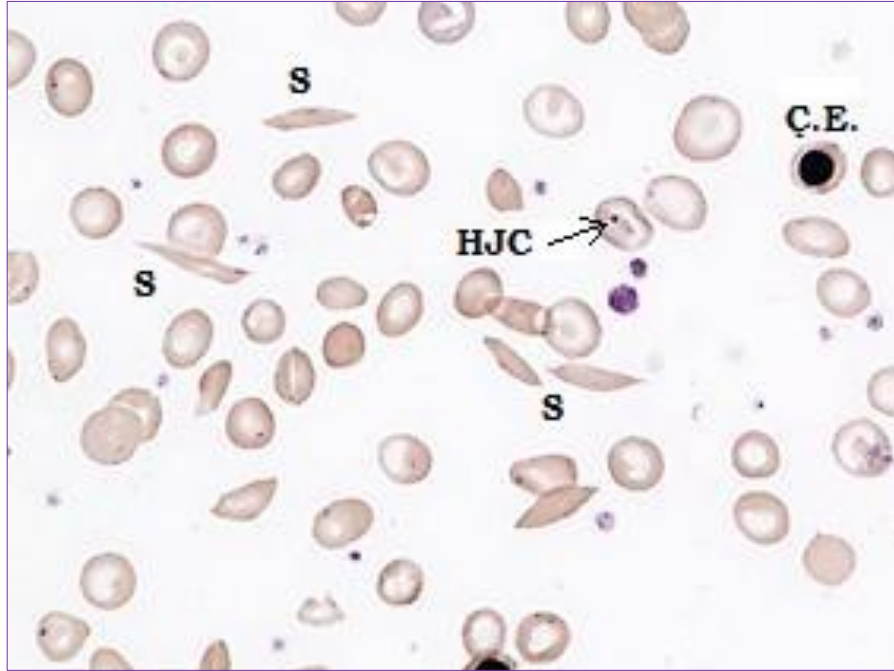
Eritrosit içindeki hemoglobinin kompozisyonu, gebeliğin devrelerine bağlı olarak değişkenlik gösterir (28). Hemoglobin kompozisyonundaki bu değişiklik  $\alpha$  ve  $\beta$  gen kümelerindeki bir dizi aktivasyon ve inaktivasyona bağlı olarak oluşur (30). Gebeliğin erken evrelerinde Hb Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ), Hb Gower I ( $\zeta_2\varepsilon_2$ ) ve Hb Gower II ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ) baskın olarak tespit edilen embriyonik hemoglobinlerdir. Ancak çok az miktarda HbF ve HbA da vardır (31). Gebeliğin 10-11. haftalarında eritropoezin karaciğer ve dalakta başlaması ile embriyonik hemoglobinler azalarak kaybolur ve HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) yapımı başlar. HbF, gama zincirinin 136. pozisyonunda Alanin içeren A $\gamma$  veya Glisin içeren G $\gamma$  olmak üzere iki farklı gama zincirine sahiptir. G $\gamma$ /A $\gamma$  oranı doğumda 3/1 iken beş aylıkken 2/3'e iner (31-33).



## 2.2. Orak Hücre Anemisi

### 2.2.1. Tanım

Orak hücre anemisi (OHA) otozomal resesif kalıtımla geçiş gösteren, birçok organ ve sistemi etkileyen kronik ve hemolitik tipte bir anemidir (34). En sık görülen hemoglobinopati olan OHA,  $\beta$  globin zincirini kodlayan gende meydana gelen mutasyondan kaynaklanmaktadır (35).  $\beta$  globin zincirinin amino ( $-\text{NH}_2$ ) ucunda 6. pozisyondaki glutaminin valin aminoasidi ile yer değiştirmesiyle; baz düzeyinde GAG yerine GTG gelmesiyle oluşur (34-36). Bu mutasyonun sonucu olarak oksijensiz HbS polimerize olur ve katı kristal halinde çöker. Sonuçta Şekil 4'te olduğu gibi eritrositler oraklaşır (37, 38).



**Şekil 4:** OHA hastasına ait periferik yayma örneği: (S) Oraklaşmış eritrosit; (Ç.E) Çekirdekli eritrosit; (HJC) Grunwald-Giemsa ile boyalı Howell-Jolly Cisimi (39)

Hemoglobin (Hb), dokulara oksijeni dağıtır ve eritrositlerin içindeki yüksek yoğunluğu eritrositin şeklini koruma ve şekil değiştirebilme yeteneğini sağlar (2).  $\beta$  zincirlerinden sadece birinde mutasyon olması halinde heterozigot formu, her ikisinde mutasyon olması halinde homozigot formu (SS) oluşur (40). Oraklaşmanın derecesini bu şekildeki mutant hemoglobinin intrasellüler derişimi ve intrasellüler oksijen miktarı belirler. Heterozigot formda eritrosit içi HbS miktarı nispeten az olduğundan genellikle ortaklaşmaya bağlı klinik tablo pek görülmez (34, 36). Diğer taraftan homozigot formda eritrosit içindeki HbS miktarı daha fazla olduğunda, oraklaşma ve oraklaşmanın oluşturduğu klinik tablo esas olarak bu grupta görülmektedir (2, 41).

**Tablo 1:** Normal ve OHA'si hastalarındaki hemoglobin tiplerinin karşılaştırılması (42)

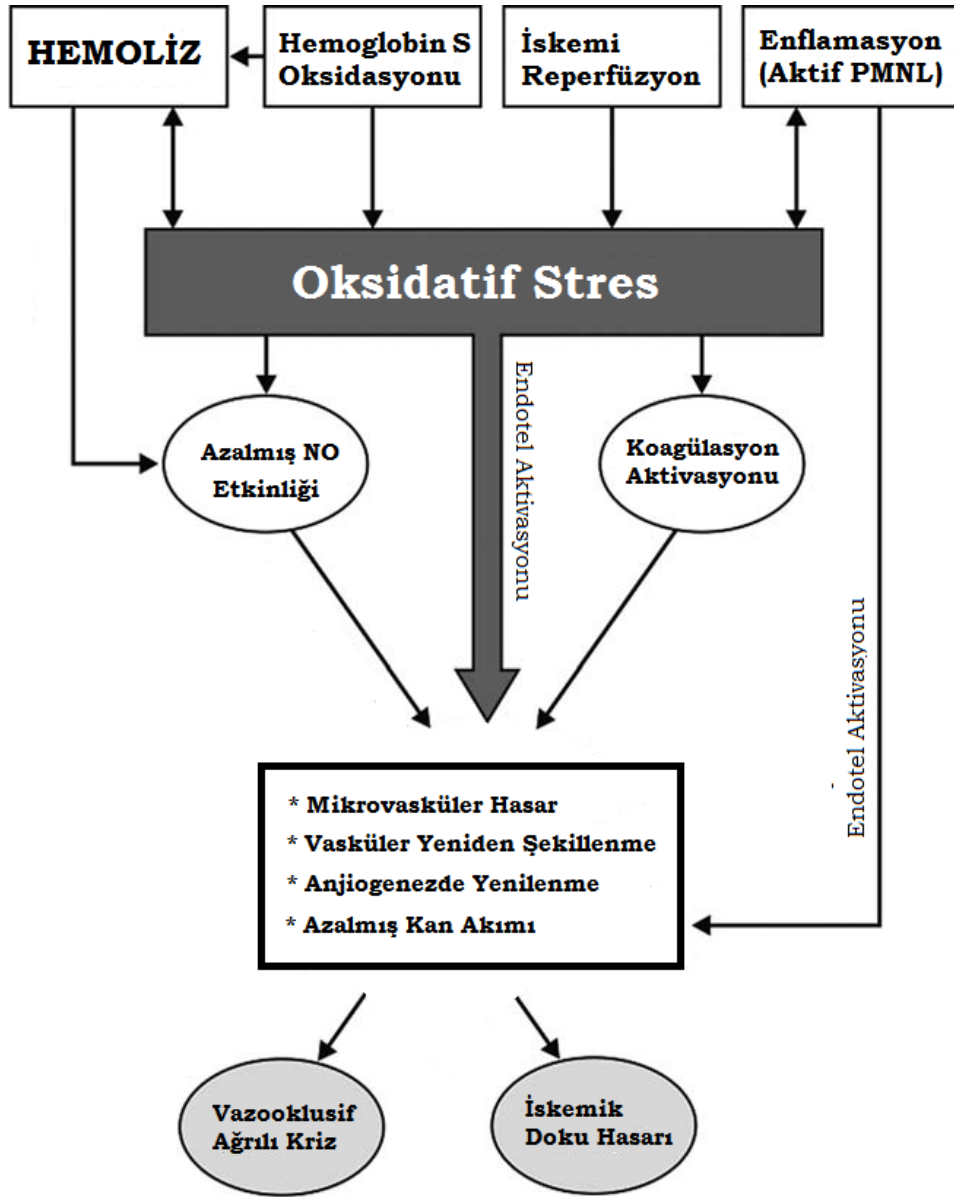
Fenotip	Hemoglobin Tipi	Yüzdesi (%)
Normal Erişkin	HbA HbF HbA <sub>2</sub>	96-98 0,5-0,8 1,5-3,2
Orak Hücre Taşıyıcılığı (Heterozigot)	HbAS	HbA: 60-65 HbS: 35-40 HbF: 2-20
Orak Hücre Hastalığı (Homozigot)	HbSS	HbS: 80-90 HbF: 2-20 HbA <sub>2</sub> : 2-4 HbA: yok

Fetal hayat boyunca HbF düzeyi yüksektir, doğumdan 6 ay sonra ise HbF yerini yavaş yavaş HbS'e bırakmaya başladığında hastalık kendini belli eder ve eritrosit içindeki oranı azalır (35, 40, 43).

### 2.2.2. Tarihçe

Yaklaşık 100 yıl kadar önce, Grenada'da bir diş hekimi olan James Herrick periferik yaymada anormal şekilli eritrositleri gözlemlemiş ve bunu yayınlamıştı. Hemolitik anemi ilk komplikasyonu olarak tanımlansa da, Afrika'da önceki yıllarda ağırlı krizlerle tanınmaktaydı. 1936'lı yıllarda, OHA'lı hastalarda pulmoner

vaskülopatiyeye eşlik eden kor pulmonare tablosu otopside tespit edildi. Yıllar sonra Orak hastası bireylerdeki organ disfonksiyonunun sebebinin rijit yapıya sahip olan eritrositlerin neden olduğu vazo-oklizif krizlerinden kaynaklandığı görüşü hakim oldu. Bu düşünce, 20.yüzyılın sonlarına doğru Mohandas, Hebbel ve Kaul tarafından yapılan ve OHA’da kan damarlarının disfonksiyonunu destekleyen yayınlarla iyice kabul gördü. Ballas (1991), Duits ve Schnog, Serjeant (2004) yaptıkları çalışmalarda OHA’daki vaskülopatiyi ve ağrılı krizlerin patofizyolojisini aydınlatmaya çalıştılar (5, 44-51).

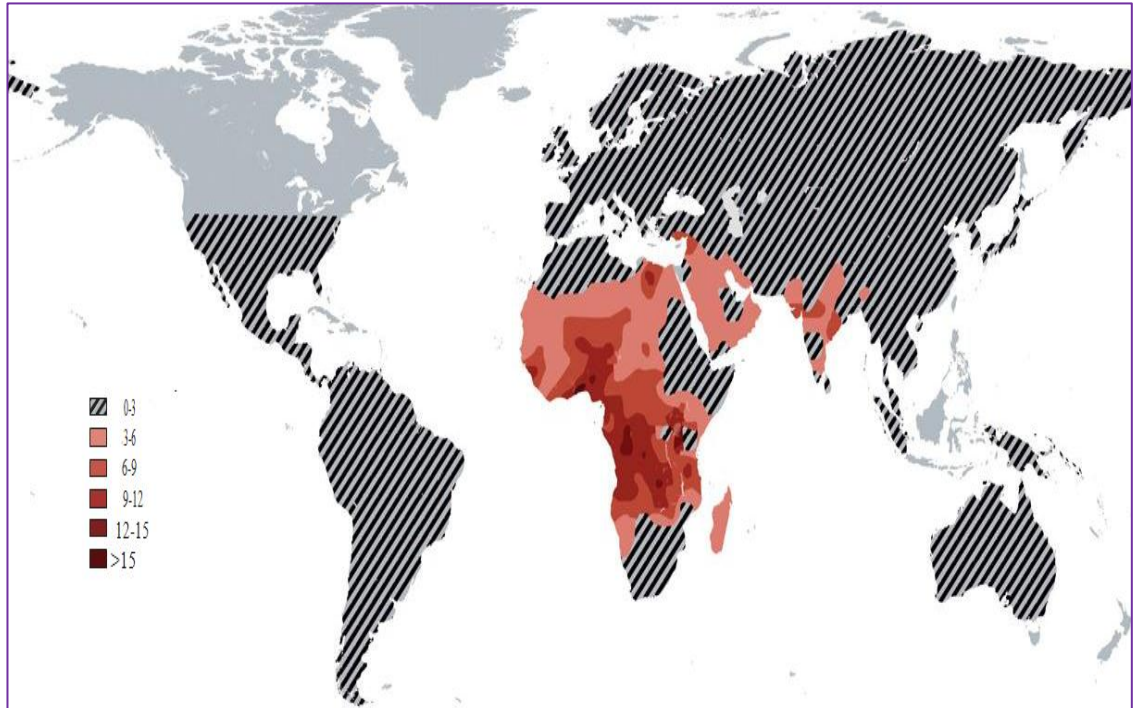


Şekil 5: OHA’da ağrılı kriz ve iskemik doku hasarı oluşum mekanizması (52)

Gladwin ve arkadaşları, intravasküler hemolizin hemoglobin ve argininin eritrositlerden plasmaya yerdeğiştirmesine sebep olduğunu ve bunun mortalite ile yakın ilişkili olduğunu gösterdiler. Yakın zamanda yapılan çalışmalarla (48, 53-58), OHA'da mortalitenin aydınlatılmasında oksidatif stres ve inflamatuvar sürecin önemi üzerinde durulmaktadır (şekil 5).

### 2.2.3. Prevelans ve Coğrafi Dağılım

Dünyada hemoglobinopati sıklığının % 5 olduğu tahmin edilmektedir (59). En sık görülen hemoglobinopati Orak hücre anemisidir. Özellikle Karaipler, Afrika zencileri, Akdeniz kökenli kişilerde (Türkiye ve Yunanistan), Hindistan ve Ortadoğu'da sık görülmektedir (60, 61). En yüksek gen frekansına Afrika'da rastlanır. Bu durum, HbS'nin P.falciparum sıtmasına karşı olan koruyucu etkisine yorumlanmaktadır (62).



**şekil 6:** HbS allelinin Dünya Sağlık rgt (WHO) tarafından kabul gören dağılım haritası (63, 64)

Ülkemizde yapılan tarama çalışmaları OHA'nın bazı bölgelerde daha sık olduğunu göstermiştir. Sağlık Bakanlığı ve Ulusal Hemoglobinopati Konseyi'nin verilerine göre taşıyıcılığın Adana'da % 10,0, Antakya'da % 10,5, Mersin'de % 13,6, Antalya'da % 2,5, Diyarbakır'da % 0,5, Muğla'da % 0,5 sıklıktadır (32).

#### **2.2.4. Patofizyoloji**

HbS'in fiziksel yapısındaki değişim eritrositlerin şekil değiştirmesine yol açar ve eritrositler uzamış yarım ay (orak) şeklini alırlar (65). Bu durum eritrositlerin dolaşım akışkanlığını azaltır ve kan akımını yavaşlatır. Orak şeklini alan eritrositler hem damar içinde, hem de damar dışında yıkıma uğrar (66). Bu durum eritrositlerin kısa ömürlü olmalarının nedenidir ve aneminin şiddetiyle doğrudan ilişkilidir (8). Artmış serbest plazma hemoglobin düzeyleri hemolizin yaklaşık 1/3'ünün damar içinde olduğunu düşündürmektedir (8). Damar içi hemolizin bir mekanizması hücrelerin kompleman aracılığı ile oluşabilecek yıkıma karşı savunmasız bırakılmasıdır. Diğer bir mekanizma ise hücrelerin kırılganlığındaki artışa bağlı hemolizin hızlanmasıdır (11, 48).

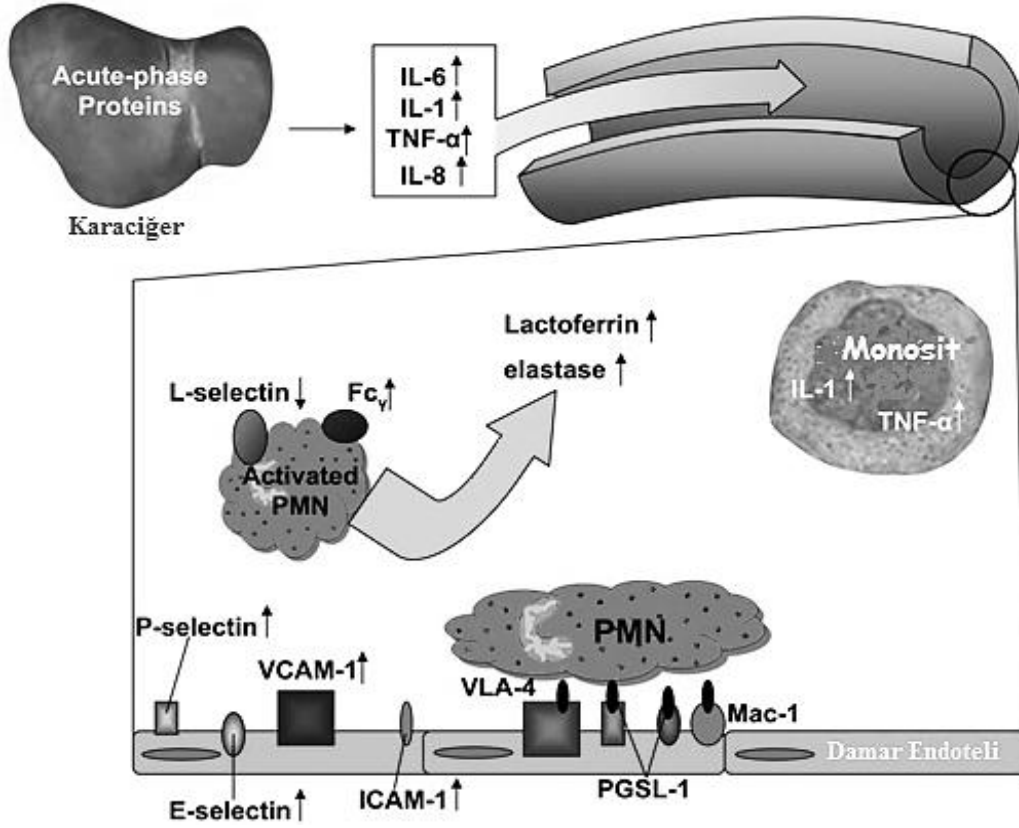
Bunun sonucunda özellikle küçük damarlarda tıkanıklık, ağrılı kriz ve organ nekrozuna, sonuçta akut ve kronik süreçte doku harabiyetine neden olur. Hücresel düzeyde reperfüzyon yaralanmaları, enfeksiyonlar, oksijen basıncında azalma, alkol, gebelik, dehidratasyon, damar çapını azaltan durumlar ve inflamatuvar yanıt gibi etkenler oraklaşmaya eğilimi artırır (67-70).

### 2.3. Orak Hücre Anemisi ve Enflamasyon İlişkisi

Yakın zamandaki gelişmeler Orak hücre anemisinde mikrovasküler yapıda meydana gelen geri dönüşümsüz etkileşimlere açıklık getirdi (71). Bu etkileşimler, vazomotor tonus ve damar düz kasının endotel hücre regülasyonunun daha iyi anlaşılması ile dahi iyi gösterilmeye başladı (72). Endotel hücresinin Nitrik oksidin (NO) regüle ekspresyonu üzerinden vasküler düz kasın kontraktıl durumunun anahtar bir düzenleyicisi olduğu gösterildi (73).

Orak hücre anemisi sistemik kronik bir enflamasyon durumuna sahiptir (48). Yeni çalışmalar, sitokin üretimi ve adhezyon moleküllerinin ekspresyonu gibi inflamatuvar olayların Orak hücre krizinin patogeneğinde rol oynayabileceğini gösterdi (74). OHA'da mortalite ve morbiditenin işareti olan lökositoz gibi bir dizi klinik tablonun eşlik ettiği ilişkili birçok inflamatuvar durum mevcuttur (75). Ana etken olarak sürekli tekrarlayan vazo-okluzif kriz ve doku iskemisi OHA'da sürekli bir inflamatuvar yanıt oluşmasını indüklemektedir (74). Sürekli olarak reaktif oksijen radikallerinin üretimi, inflamasyonun oluşumda önemli rol oynar ve birçok kronik inflamatuvar hastağın patofizyolojisinde etkilidir (76).

ROS, sadece patojenleri öldürmekle kalmaz, aynı zamanda da inflamatuvar mediyatörlerin aktivasyonu, adezyon moleküllerinin ekspresyonu ve endotel hasarı gibi inflamatuvar olayları da indükler (76). Kronik inflamatuvar durum, OHA hastalarında sadece kriz hallerinde değil aynı zamanda stabil haldeyken de mevcuttur (77). Enflamatuvar yanıtın oluşmasında önemli bir faktör endoteli geçip yaralı dokunun etkilenen alanlarına göç eden ve aşırı ROS üretiminde katkısı bulunan lökositlerdir (54). Şekil 7'deki şemada OHA'da artmış lökosit adhezyonuna sebep olan inflamatuvar olaylar gösterilmiştir (77).



**Şekil 7:** Orak Hücre Anemisinde vasküler inflamasyon (78). PMN, polimorf nükleer lökositler; IL-1, interlökin-1; IL-6, interlökin-6; IL-8, interlökin-8; TNF- $\alpha$ , Tümör Nekroz Faktör-Alfa; PGSL-1, P-selektin glikoprotein ligand-1; Fc, Yüksek Afiniteli Fc gama reseptör; ICAM-1, interselüler adhezyon molekül-1.

Lökositlerin kan akımından vasküler endotele olan migrasyonu, doku makrofajlarından salgılanan ve OHA'da yüksek tespit edilen interlökin-1 (IL-1), IL-6, IL-8 ve Tümör Nekroz Faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gibi proinflamatuvar uyarıcı sitokinler tarafından sağlanır (79, 80). OHA'da, dolaşımdaki uyarılmamış monositlerin sağlıklı kişilere göre daha fazla TNF- $\alpha$  ve IL-1 üretmektedirler (81). Interleukin-1 ve TNF- $\alpha$ , damar endotelini aktive ederek endotel markerları, E-selectin, P-selectin, VCAM-1 ve ICAM-1 seviyelerini arttırmaları (82). Interlökin-1, TNF- $\alpha$  ve IL-6 ayrıca hepatositleri aktive ederek akut faz proteinleri olan ve OHA hastalarında yüksek tespit edilen alpha-1-antitripsin, seruloplasmin, alfa 2-makroglobulin ve CRP'nin sentezini arttırır (83). Bunun sonucunda, OHA hastalarında normalden farklı olarak sürekli bir inflamatuvar yanıt oluşması söz konusudur.

Reaktif oksijen radikallerinin üretimi, inflamasyonun oluşumda önemli rol oynar ve birçok kronik inflamatuvar hastağın patofizyolojisinde etkilidir (76). ROS, sadece patojenleri öldürmekle kalmaz, aynı zamanda da enflamatuvar mediyatörlerin aktvasyonu, adezyon moleküllerinin ekspresyonu ve endotel hasarı gibi enflamatuvar olayları da indükler (76). Kronik enflamatuvar durum, OHA hastalarında sadece kriz hallerinde değil aynı zamanda stabil haldeyken de mevcuttur (77).

Hangi konsantrasyonlarda yaptığı bilinmemekle birlikte, plasmada artan Hem miktarının endotelde ve eritrositlerde enflamatuvar adezyon moleküllerinin ekspresyonunu arttırdığı ve böylece vasküler geçirgenliği, lökositlerin girişini (84) ve ROS üretimini arttırdığı yakın zamanda gösterildi (77, 82). Kaul ve arkadaşları tarafından transgenik farelerde yapılan deneyde hipoksi sonrası tekrar oksijenasyon sonrası meydana gelmesiyle ortaya çıkan inflamatuvar yanıt ve artmış adezyon molekülleri ve lökosit sayıları görüldü (50).

### **2.3.1. Fetuin-A**

Fetuin A (Alpha-2-Heremans Schmid Glycoprotein, AHSG), fetal gelişim esnasında birçok dokudan üretilmesine rağmen erişkin dönemde karaciğerden sentezlenen 59 kDa glikoproteindir (85, 86). Sistein proteaz inhibitörlerinden sistatin süper ailesinin bir üyesidir. Fetuin A serum elektroforezinde geniş a-2 bandı oluşturur (87). Normal serum konsantrasyonu 0,5-1 g/L'dir ve inflamasyonda düzeyi azalır. Serum fetuin A ile CRP arasında ters ilişki rapor edilmiştir (87). Hemodiyaliz hastalarında düşük fetuin A düzeyleri, yüksek kardiyovasküler hastalık ve artmış mortalite ile ilişkilidir (88). Asıl rolü Ca-Pi çökmesinin inhibisyonudur. İn vitro osteoblast kültürlerinde apatit oluşmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (89). Ek olarak, makrofajlar aracılığıyla apoptotik cisimciklerin fagositozunu düzenleyerek antiinflamatuvar etki gösterir (86, 87).

Akut inflamasyonda Albümin ile birlikte serum seviyelerinin azaldığı düşünülerek negatif akut faz reaktanı olduğu öne sürülmüştür. Lebreton ve arkadaşları (90), fetuin-A konsantrasyonunun inflamasyon ve travma boyunca



azaldığını göstermişlerdir. Wang ve arkadaşları (91), katyonik bir molekül olan sperminden kaynaklanan anti-enflamatuvar olayları araştırırken, tesadüfen düşük serum seviyesinde kültür yapınca, makrofajların spermine olan ilgisinin azaldığını gördüler. Sonuçta, spermının TNF inhibisyonu için Fetuin-A'ya ihtiyaç duyduğunu ve seruma aç olan bu makrofajların aslında Fetuin-A'dan mahrum kaldığını fark ettiler (91). Sperminin TNF'yi etkilemesi sonucu olan immunsupresyon olayının Fetuin-A olan alakası, ortama yüksek saflıkta Fetuin-A veya Fetuin-A antikoru eklenerek doğrulandı (91). Dziegielewska ve arkadaşları yapılan bir çalışmada yüksek konsantrasyonlarda Fetuin-A uygulamasının, endotoksin kaynaklı IL-1 ve nitrik oksit salınımını ortadan kaldırdığını gösterdi (92).

Akut alkolik hepatit, akut toksik hepatit, kronik otoimmün hepatit, yağlı karaciğer, alkolik ve primer bilyer siroz, hepatoselüler kanserde düzeyi azalır (93). Fetuin-A seviyesinin proinflamatuvar sitokinler olan IL-1, IL-6 ve TNF- $\alpha$  kan düzeyleri ile ters yönlü ilişkili olduğunu gösterilmiştir (94). Ketteler ve arkadaşları (95), stabil hemodiyalize giren kronik renal yetmezlikli hastalarda düşük saptanan fetuin-A düzeyinin, bir inflamasyon göstergesi olan CRP düzeyi ile zıt ilişkili olduğunu saptamışlardır.

Yapılan çalışmalarda Fetuin-A seviyelerinin, pankreatit (96), kronik böbrek hastalıkları (89, 97), romatoid artrit (97) gibi kronik inflamatuvar hastalıklarda %20 ile %30 arasında azaldığı gösterildi. Bu hastalardaki Fetuin-A seviyeleri IL-6 gibi enflamatuvar sitokinlerle ters bir korelasyon göstermediği (96); fakat mortalite oranları ile direk ilişki gösterdiği tespit edildi (89, 97). Bütün bu bilgilerin ışığında Fetuin-A negatif akut faz reaktanı olarak değerlendirilmektedir.

Fetuin gen ablasyonunun yapıldığı farelerde doğuştan kalsifikasyona yatkınlık oluşmakta ve bunlar da böbrek, testisler, deri, kalp ve damarlarda ölümcül kalsifikasyonlar oluşmaktadır (86). Fetuin-A, tip II TGF- $\beta$  reseptörleri ve insülin reseptör tirozin kinazları ile yapısal benzerlik göstermektedir (98). Bundan dolayı TGF- $\beta$  veya insülin sinyal yollarının inhibitörü olduğu kabul edilmektedir (99). TGF- $\beta$ 1'e bağlandıktan sonra TGF- $\beta$ 'nın kendi reseptörüne bağlanmasını önler. Böylece TGF- $\beta$ 1 ilişkili anti-proliferatif etkileri antagonize eder (98, 99). Benzer şekilde, insülin reseptörüne de bağlanabilir ve tirozin kinazı inaktive eder (100). Bu

neden bazı tip 2 diabetli hastalarda insülin direncinin yüksek Fetuin-A seviyesiyle ilişkili olduğunu bir nebze de olsa açıklamaktadır (101).

Fetuin-A, sialik asit kalıntılarını kesip atan iki N-bağlı ve üç O-bağlı oligosakkarit taşıyan bir glikoproteindir ve katyonik kalsiyum iyonuna bağlanabilir. Fetuin-A bu sebepten yumuşak dokudaki patolojik mineralizasyon veya kalsifikasyonunun endojen inhibitörü olarak bilinir (102-104). Fetuin-A özellikle kalsiyum ve fosfatla protein-mineral kolloidleri oluşturur. Bu sayede patolojik durumlarda ortaya çıkabilecek diğer türlü kontrolsüz kalsifiaksiyonları önler (103, 105-107).

Fetuin-A'nın kardiyomiyositlerde ve beyinde iskemiye karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (95, 108). Düşük fetuin-A konsantrasyonu, miyokardiyal fonksiyonlar üzerine direkt kötüleştirici etkiye sahiptir (108). Merx ve arkadaşları (109), fetuin-A yoksun farelerin kalplerinde katekolamin rezistansının olduğunu ve iskemi toleransı ile diyastolik fonksiyonların bozulduğunu bildirmişlerdir.

Fetuin-A molekülü gerek dolaşım gerekse vasküler patolojileri ilgilendiren durumlarda karşımıza önemli bir marker olarak çıkmaktadır. Hemoglobinopatilerde inflamasyon ilgili çalışma yapılmasına karşın, Fetuin-A'nın hemoglobinopatilerin inflamatuvar proçesi ile ilgili patofizyolojisinin aydınlatılmasında mevcut bir çalışma bulunmamaktadır.

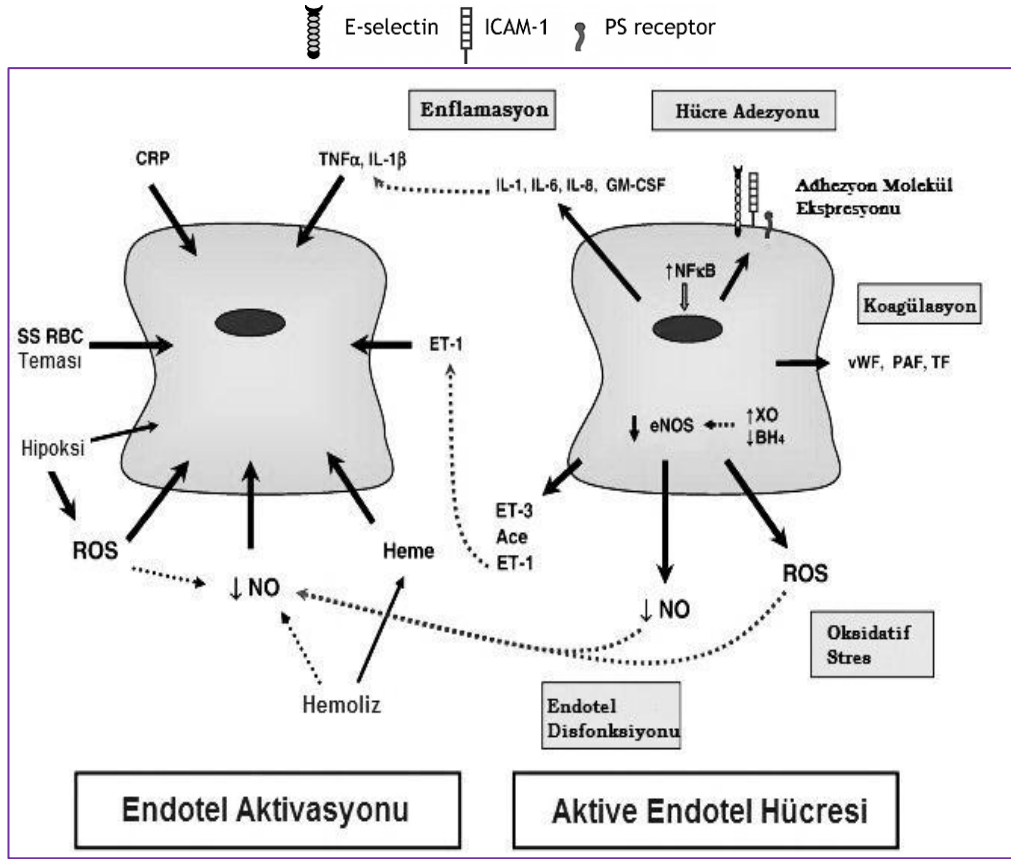
### **2.3.2. Tümör Nekroz Faktör (TNF-a) ve İnterlökin-6 (IL-6)**

TNF ve IL-6, proinflamatuvar moleküller olup endotel ve lökosit aktivasyonu, makrofaj situmilasyonu, lökosit yüzey moleküllerinin ve endotel reseptörlerinin aktivasyonu, lökosit kemotaksisi ve iyileşmesinde görev alırlar (110). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada OHAS hastalarında hem stabil durumda hem de kriz durumunda dolaşımdaki TNF ve IL-6 seviyeleri yüksek tespit edilmiştir (75). Bu iki önemli inflamatuvar molekül yüksek olasılıkla vasküler seviyedeki oklüzyon olaylarındaki kompleks mekanizmalara dahildirler (94).

Endotel aktivasyonu için ortamda tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interlökin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and C-reaktif protein (CRP) gibi inflamatuvar mediatörlerin bulunması gerekmektedir (111). Potent bir vazokonstriktör ajan olan Endotelin-1 (ET-1) de adhezyon molekül ekspresyonu gibi endotelial değişiklikleri uyarmaktadır (112). HbS'li eritrositlerin (SS RBC) endotel hücresiyle direk teması bilinmeyen bir mekanizma ile endotel aktivasyona neden olmaktadır (Şekil 8). Hemoliz sonucu eritrositi terk eden Hem'in de endotel hücresi üzerinde yıkıcı ve aktive edici etkileri vardır (113). Hemoliz ve reaktif oksijen ürünleri (ROS), nitrik oksit (NO) parçalayıcı sisteme katkıda bulunurlar (78). Bunun neticesinde azalan nitrik oksit biyoetkinliği, ET-1 üretimini ve adhezyon molekül ekspresyonunu uyarmaktadır (114-116).

Hipoksi, vasküler sistemde ROS oluşumuna neden olması yanında, HIF-1'in (hipoksi-indükleyici faktör-1) aktivitesini de indükler (114). Ayrıca ACE'in (Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim) salınımını artırır. ROS, membranda lipid peroksidasyonuna sebebiyet verir ve endotel hücresi üzerinde güçlü aktive edici güce sahiptir (47). ROS üretimi, eNOS ayrışması ve daha ileri seviyede süperoksit üretimine sebebiyet veren azalmış BH4 seviyeleri ve endotelial ksantin oksidaz aktivasyonuna bağlı olarak endotel hücresi tarafından artırılır (47, 78).

Nükleer Faktör KB (NFkB) gibi transkripsiyon faktörleri aktive olmuş endotel tarafından indüklenirler (117, 118). Bu faktörler, adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırmasının yanı sıra sitokinler, lökotrienler, vazokonstriktör ajanları gibi inflamatuvar medyatörler ile Willebrand faktör (vWF), platelet aktive edici faktör (PAF) ve doku faktörü (TF) gibi koagulan faktörlerinin üretimini artırır (119, 120). E-selectin, P-selectin, VCAM-1, ICAM-1 ve fosfatidilserin (PS) reseptörleri gibi adhezyon moleküllerinin endotelden salınması sonucunda eritrosit ve löksitler endotele hücum ederler (74, 118). Bu moleküllerin çoğu, Şekil 8'teki gösterildiği üzere OHA'da karakteristik olarak görülen kronik inflamatuvar duruma neden olan endotel aktivasyonunun sürmesini sağlarlar (75).



**Şekil 8:** Endotel hücre aktivasyonunun OHA'nın patofizyolojisine etkisi; endotel aktivasyonu ve sonrasında endotel hücrede meydana gelen değişiklikler

Nitekim hücre etkileşim ve aktivasyonundaki sapmalar, inflamatuvar ve oksidan profilin varlığı, genetik altyapı ve çevresel faktörler sürekli vasküler olayların meydana gelmesi ile sonuçlanır (71). OHA'da sitokin dengesindeki değişiklik klinik olayların ortaya çıkmasında kritik öneme sahiptir (81).

## 2.4. Orak Hücre Anemisi ve Oksidatif Stres İlişkisi

Orak hücre anemisi ile ilgili çalışmalarda, vitamins A, C and E, selenyum and glutatyon peroksidaz gibi anti-oksidan etkili moleküller düşük tespit edildi (121). Hebbel ve arkadaşları (122), yaptıkları çalışmada HbS'in oksijen varlığında HbA'ya oranla yüksek miktarda otooksidasyona uğradığını gösterdiler. Buna bağlı olarak bu hastaların eritrositlerinde normal bireylere göre daha yüksek oranda süperoksit ve hidroksil radikali tespit edildi (123).

Transgenik fare modellerinde yapılan çalışmalarda (124, 125), hipoksik krizi uyarmak amacıyla yapılan sistemik hipoksik/oksijenasyon uygulamasıyla postkapiller venüllerin endotel hücrelerinde ROS formasyonu oluştuğu tespit edildi. Orak hücre anemili farelerin pulmoner arteriollerinde artmış XO aktivitesi ve lipid peroksidasyon belirteci olan 8-isoprostan'ın biriktiği görüldü (121). Bu deneklerde SOD, Katalaz ve GSH-Px gibi anti-oksidan enzimlerin ve ROS üretimini azaltan allopurinol gibi maddelerin azalmasının, arterioler dilatasyonu ve lökosit adezyonunu bozduğu gözlemlendi (51). Ayrıca, oksidanlara duyarlı transkripsiyon faktörü NFkB'in aktive olduğu ve suldfazalin ile bu aktivasyon ortadan kaldırıldığında endotel ROS'un da azaldığı tespit edildi (126, 127).

Orak hücre anemisinde dolaşımda yüksek sayıda bulunan ve süperosit salınımını ikiye katlayan lökositler, bu hastalıkta üretilen ROS'un potansiyel kaynağını teşkil ederler (128). Lökosit kaynaklı ROS'un enfeksiyonla ortaya çıkan hemolize olan katkıları ve hidroksiüre tedavisinin görülen anti-oksidan etkileri gösterdi ki lökositler de oraklı eritrositlerde olduğu gibi hem L-selectin hedefi hem de lipid peroksidasyonunu kaynağı gibi çalışabilir (129-131). Lökositlerdeki en büyük süperoksit üretici enzim olan NADPH oksidaz, Orak hücre anemisi için en önemli ROS üretim kaynağıdır (130).

Orak hücre anemisinde görülen hiperhomosisteinemi tablosu da ROS üretimine katkıda bulunmaktadır. Nitrik oksit sentazın (NOS) substratı olan L-arjininin ile yarışmaya giren ADMA (asimetrik dimetil arjinin)'nin oluşumunu destekleyerek ROS üretimini artırır. L-arjinin yokluğunda, NOS kopmuş (uncoupled) hale gelir ve nitrik oksit yerine tercihen süperoksit üretir (132).

Sonuç olarak Oraklı eritrositlere bağlı artmış oksidatif stres, lipid peroksidasyonu ile başlayıp eritrositlerin lizisi ile sonuçlanan otokrin ve parakrin etkilere neden olmaktadır (51, 133). Oraklı eritrositler ROS üretiminin bir sonucu olarak membran rijiditesine ve mekanik stabilet bozukluğuna karşı aşırı yatkınlık gösterirler. Bu hastalarda ekstrasellüler üretilen süperoksite bağlı eritrosit ve lökositlerde artmış adhezyon yatkınlığı; artan ROS sinyalizasyon mekanizmasına bağlı olarak aktive endotele aşırı platelet bağlanması görülmektedir (128). Nitrik oksitin inaktivasyonuna bağlı olarak vasküler endotel dilatasyonunda bozulma görülmektedir (134). Bu durumun ROS'a bağlı olduğunu göstermek için yapılan deneyde SOD verildiğinde vazodilatasyonun düzeldiği gözlenmiştir (134).

#### **2.4.1. Oksidatif Stres**

Oksijen canlılar için hayati önemi olan bir moleküldür ve hücrede enerji üretim süreçlerinde kullanılır (135, 136). Serbest oksijen radikalleri enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünü olup yüksek düzeyde reaktif ve potansiyel olarak zararlı maddelerdir (135). Serbest radikaller hücrelerimizde DNA'ya, proteinlere ve lipitlere saldırarak zarar verir (136). Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için hücreler bunları nötralize eden antioksidanlar üretmektedir (137).

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır (137). Bu denge, hücreyi serbest radikallerin olumsuz etkilerinden korunur. Eğer bu denge serbest radikaller lehine bozulursa hücrede serbest radikallerin miktarı artar (137). Serbest radikallerin hücrede artışı ve hücre fonksiyonları üzerinde yaptıkları olumsuz etkiye 'oksidatif stres' denir (137). Birçok metabolik ve sistemik hastalığın etiolojisinde oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (138-150).

## 2.4.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır (151). Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir (151). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir (152). Oksijen, süperoksit grubuna bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve şavoproteinlerin etkisiyle indirgenir (153). Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubu, bakırlı bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığında hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve oksijene çevrilir (154). Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan  $H_2O_2$ , dokularda bulunan katalaz, peroksidaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz hale getirilir (155). Dietilditiyokarbamat gibi süperoksit dismutazın etkinliğini engelleyen maddeler, süperoksit gruplarının zararsız hale getirilmesini sınırlandırırken, lipid peroksidasyonu hızlandırırlar (154).

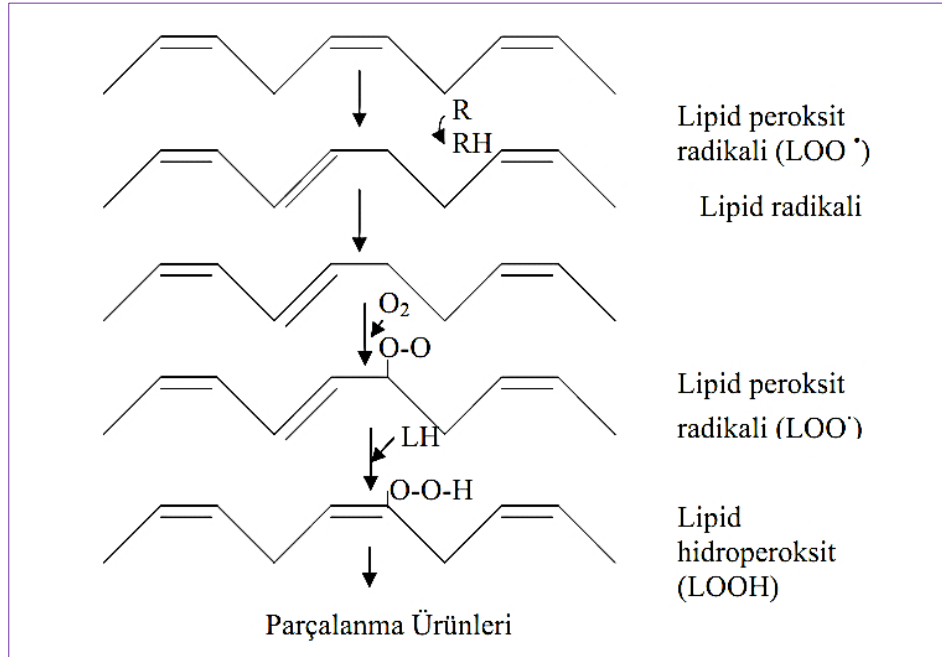
**Tablo 2:** Biyolojik sistemde sık görülen serbest radikaller ve özellikleri (156)

<b>RADİKALLER</b>	<b>SİMGE</b>	<b>ÖZELLİKLER</b>
Hidrojen Radikali	$H$	Bilinen en basit radikal
Süperoksit Radikali	$O_2$	Oksijen metabolizmasının ilk ana ürünü
Hidroksil Radikali	$OH$	En toksik oksijen metaboliti
Singlet Oksijen	$^1O$	Yarılanma ömrü kısa, güçlü oksidatif yapı
Hidrojen Peroksit	$H_2O_2$	Düşük Reaktivite, zayıf hasar yeteneği
Perhidroksi Radikal	$HO_2^-$	Lipidlerde hızlı çözünüp peroks. artırır
Peroksil Radikali	$ROO^-$	Perhidroksile oranla zayıf, lipide lokalize
Triklorometil	$CCl_3$	$CCl_4$ metabolizma ürünü, K.C.'de üretilir
Thyl Radikali	$RS^{\cdot}$	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içerir
Alkoksil	$RO^{\cdot}$	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilir
Nitrojen Oksit	$NO$	L-arjinin aminoasitinden in vivo üretilir
Nitrojen Dioksit	$NO_2$	$NO$ 'in oksijen ile reaksiyonundan üretilir

Serbest radikallerin atomlarında elektronlar orbital adı verilen uzaysal bölgede çiftler halinde bulunurlar (157). Atomlar arasında etkileşim ile bağlar meydana gelmekte ve moleküler yapı oluşmaktadır. Serbest radikal, atomik ya da moleküler yapılarda çiftleşmemiş tek elektron bölümleri olduklarından başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girerler (157).

### 2.4.3. Hücreler Üzerine Etkileri

Serbest radikaller, orbital yapısına göre kararsız olan moleküllerdir (151). Hücreye mekanizma ve yapıtaşları üzerinden zarar vermektedir. Bunlardan birincisi membran lipitlerinin peroksidasyonudur (LPO) (158, 159). Serbest radikaller, hücre membranının istikrarını ortadan kaldırarak, hızlı bir şekilde hücre ve doku bozulmalarına neden olurlar (151). Oluşan hasar sonucunda membranın yapısı ve fonksiyonları büyük ölçüde bozulur. Poliunsature yağ asitlerinde (PUFA) oluşan oksidatif hasar LPO olarak bilinmektedir (160), (161).



Şekil 9: Lipit peroksidasyonu ve parçalanma ürünleri



Lipid molekülünde iki doymamış bağ arasında yerleşmiş olan bir metilen grubundan bir hidrojen atomunun çıkarılması ile başlayan kompleks olay LPO'dur (159). LPO bir kez oluştuğundan sonra hücrede kendi kendine devam eden zincir tepkimeler başlar. LPO sonucu oluşan lipid peroksil radikalleri (LOO.) bir sonraki PUFA'yı okside eder ve yeni zincirleme tepkimeleri başlatırlar (162). Devam eden tepkimeler sonucunda hidroperoksitler (LOOH) ve bunların da devam eden parçalanması ile daha şiddetli radikal özelliği olan türlere özellikle de rölatif olarak daha kararlı hal alan MDA'ya dönüşürler. Dokuda MDA seviyesinin artması o dokuda serbest oksijen radikallerinin arttığını gösterir (163). MDA oluştuğu ortamda diffüze olarak ya hücrenin dış ortamına ya da iç kısmına gidip hasar oluşturabilir. Hücre içine girince birçok yapı için zararlı etki gösterir (164-166).

Radikallerin diğer bir zararlı etkisi proteinler üzerinedir. Proteinler serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden (PUFA) daha az hassastırlar (167, 168). Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır (167, 168). Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler (169). Glutatyon (GSH) gibi tiyollerin (R-SH) oksidasyonu, tiyol ve oksijen radikallerinin oluşumuna neden olur. Bunlar sülfür merkezli radikallerdir (RSH) ve proteinlerdeki homolitik fisyon (sülfürlerin karşılıklı bağlanması) reaksiyonları disülfid bağı oluşturur. Böylece proteinlerin yapısını bozarak vücuttaki metabolik aktivitelerini engeller (170, 171).

Serbest radikallerin etkileri sonunda, yapılarında fazla sayıda disülfid bağı bulunan immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulur, normal fonksiyonlarını yerine getiremezler (172, 173). Prolin ve lizin reaktif oksijen türleri (ROS) üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler (113). Hemoglobin gibi hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler (114, 174-176). Özellikle hemoglobinin süperoksit radikali veya hidrojen peroksitle reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur. Enzimler protein yapısında olduklarından enzim aktivitelerinde de değişiklik meydana gelir (177).

Radikallerin karbonhidratları etkilemesi sonucu, monosakkaritlerin otooksidasyonu ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peroksitler ve okzalaldehyitler oluşabilir. Okzalaldehyitler DNA, ribonükleik asit (RNA) ve proteinlere bağlanarak antimitotik etki göstererek kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar (174-176).

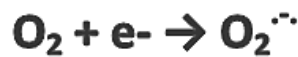
Serbest oksijen radikallerinin en önemli hasarı ise DNA hasarı yaparak meydana getirir (178). DNA molekülü yeniden sentezlenemeyen ancak kopyalanabilen bir molekül olduğundan DNA modifikasyonları mutasyonlara ve genetik bozukluklara neden olmaktadır (179, 180). Proteinler, DNA tamir enzimleri ve DNA polimerazlar serbest oksijen radikallerinin major hedefleri arasındadır. DNA molekülü serbest radikaller için önemli bir hedefdir ve kolaylıkla hasara uğratılır (179, 180). DNA molekülü hasarı sonucu kronik inflamasyon, enfeksiyon, yaşlanma, karsinogenezis, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli patolojilerin görüldüğü bilinmektedir (181-184). Radikaller, protein yapısındaki enzimlerin aktivitelerini değiştirir, membran transporter proteinlerini ve reseptör etkileşimlerini bozar (185).

#### **2.4.4. Reaktif Oksijen Türleri**

Oksijen metabolizması ara ürünleri olan oksijen türleri, brom ve klor gibi tek atomlu yapılar, sodyum ve potasyum gibi alkali metal atomları, bir orbitalinde tek elektron bulunduran NO, NO<sub>2</sub> gibi atom bileşikleri; oksijen radikalleri olarak bilinmektedir (186). İntoksikasyon, hemoraji, iskemi, radyoaktivite durumlarında mitokondride aerobik oksidatif fosforilasyon dengesi bozulur. Elektron taşıma sisteminden elektron kaçakları meydana gelir (187).

#### **Süperoksit Radikali**

Canlılarda oluştuğu ilk gösterilen radikal olan süperoksittir. Canlılarda tek bir elektronun transfer yoluyla oksijene verilip oksijenin tek değerlikli indirgenmesi ile O<sub>2</sub><sup>-</sup> oluşmaktadır (137).



Süperoksit radikali başlıca şu mekanizmalarla üretilmektedir:

1. İndirgeyici özellikteki biyomoleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşur. Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotidler ve indirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu gibi yüzlerce biyolojik molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına neden olurlar (137, 178).

2. Enzimin katalitik etkisiyle süperoksit radikali bir ürün olarak oluşabilir.

3. Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin % 1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni nikotinamid adenin dinükleotid dehidrogenaz (NADH) ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçığının olmasıdır (188, 189).

4. Aktive edilen fagositik lökositler bol miktarda süperoksit üreterek fagozom içine ve buldukları ortama verirler. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatır (190, 191).

### **Hidrojen Peroksit**

Oksijenin 2 elektronla redüklenmesi veya  $O_2$ ·<sup>-</sup>'nin dismutasyonu ile  $H_2O_2$  meydana gelir (192). Bu reaksiyon, radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir. Spontan olarak gerçekleşir veya SOD (süperoksit dismutaz) enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon pH 4.8'de en hızlıdır, enzimatik dismutasyon ise spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da daha belirgindir (193-198).



Hidrojen peroksit serbest radikal olmadığı halde “ROS” kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Belirtilen potansiyel oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan  $H_2O_2$ 'nin derhal ortamdaki uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirirler (199-202).



$\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  veya diğeri geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu süperoksit radikalinin ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini ( $\text{OH}\cdot$ ) oluşturur (203-205).

### **Hidroksil Radikali**

Hidroksil radikali, ‘‘Fenton reaksiyonu’’ ve ‘‘Haber-Weiss reaksiyonu’’ sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır (204). Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikalidir ve tüm biyolojik moleküllerle reaksiyona girebilir. Yarılanma ömrü çok kısadır (206). Hızlı üretilip hızlıca ortamdan uzaklaştırılır. Buna karşın meydana getirdiği yıkıcı hasar büyüktür (206). Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan  $\text{OH}\cdot$ , su dâhil ortamda rastladığı her biyomolekülle diffüzyon limiti hızı ile tepkimeye girer (203-205).

Her tür biyolojik molekül hidroksil radikalinin bir hedefi ise de, özellikle elektronca zengin bileşikler seçilen tercihli hedeflerdir (207, 208). Nükleik asitler, proteinler ve lipidler de başlatılan radikalik tepkimelerde binlerce farklı ara ürünler oluşturabilir. Deoksiribonükleik asit (DNA) ile tepkimesi sonucu baz modifikasyonları, baz delesyonları, zincir kırılmaları gerçekleşebilir; ileri derecedeki DNA hasarları tamir edilemediğinden hücre ölümüne neden olur. Proteinler üzerinde oluşan oksidasyonlar, yapı değişimine neden olacağından proteinler proteolitik yıkıma götürülür (209-217). Hücre zarı su içermediğinden hidroksil radikalinin ( $\text{OH}\cdot$ ) başlıca hedefi yağ asitleridir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne neden olabilir (53, 160, 206).

Bütün bu etkiler ne kadar hidroksil radikali üretildiğine bağlıdır ve gerek  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'den gerekse de organik peroksitlerden ( $\text{ROOH}$ ), hidroksil radikali ( $\text{OH}\cdot$ ) yapımı ortamdaki serbest metal iyonları tarafından katalizlenir (118, 155, 171).

## Singlet Oksijen Atomu

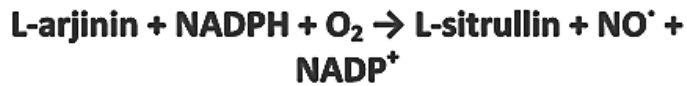
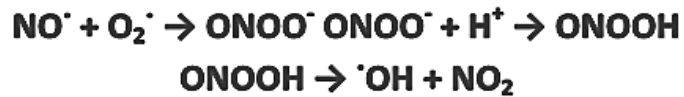
Dış yörüngede eşlenmemiş bir elektronu bulunmadığından serbest radikal olarak kabul edilmemektedir. Fakat serbest radikal reaksiyonlarını başlattıklarından serbest radikal sınıfına dâhil edilmiştir (157, 218).

Singlet oksijen ( $O_2$ ), oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi neticesi oluşabileceği gibi, süperoksit radikalinin dismutasyonu ve hidrojen peroksidin hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir (219-221). Vücutta deri ve retina gibi gün ışığına maruz kalan bölgelerde sıkça oluştuğu tespit edilmiştir (222, 223).

### 2.4.5. Reaktif Nitrojen Türleri (RNS)

Nitrik oksit, yüksek yapılı canlılarda amaçlı olarak ve çok önemli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen nitrojen merkezli bir radikaldir (224). Lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir (225). Düşük konsantrasyonlarda iken, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilir (226). Diğer radikallerden farklı olarak düşük dozlarda toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevleri gerçekleştirir (227). NO bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftleşmemiş elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir ve bu yüzden radikal tanımına uymaktadır (225-227).

Bu lipofilik serbest radikal damar endotel hücrelerinde Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla L-arjininden sentezlenir (228, 229). NOS'ın birçok izoformu tanımlanmıştır. Oksijen radikalleri çok sayıdaki enzimatik ve enzimatik olmayan yollar ile fiziksel ve kimyasal mekanizmalarla oluşturulur iken, vücudumuzda NO. sentezini sağlayan mekanizmalar son derece kısıtlıdır.



Vücuda giren nitro bileşiklerinin metabolize edilmesi sırasında oluşan NO. bir tarafa bırakılacak olursa, endojen NO. oluşturan tek kaynak nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleridir (230-233). NO'nun ROS'leri ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan olan peroksinitriti (ONOOH) oluşturduğu ve bunun da ileri dekompozisyonla OH radikalinin oluşumuna yol açtığı ifade edilmektedir (230). OH radikali ise biyolojik olarak yıkıcı bir moleküldür. Ayrıca, peroksinitrit de tirozin gibi fenolik aminoasitleri nitrolayarak toksik nitro-türevlerini (nitrotirozin) oluşturmaktadır (230). Sonuç olarak NO, endotel hücre disfonksiyonu ve buna bağlı ateroskleroz, hipertansiyon, şizofreni, ikiüçlü bozukluk, otizm ve Diabetes mellitus gibi bazı önemli hastalıklarda rol oynayabilmektedir (234, 235).

#### **2.4.6. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynağı**

İnsan vücudunda serbest radikallerin fizyolojik koşullarda oluşturulduğu pek çok mekanizma ve metabolik yol vardır. Hücrelerde genel olarak elektron transfer reaksiyonları ile enzim aracılı veya enzimatik olmadan üretilirler (153). Normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda enzimlerin aktif yerinde ara ürünler olarak devamlı şekilde serbest radikaller oluşabilir. Bazen bu serbest radikal ara ürünler enzimlerin aktif yerinden sızarlar, moleküler oksijenle tesadüfen etkileşirler ve sonuçta serbest oksijen radikalleri oluşur. Reaktif oksijen türlerinin, endojen ve eksojen olmak üzere iki önemli kaynağı bulunmaktadır (157, 220, 236).

#### **2.4.7. Serbest Radikallerin Hücre İçi Kaynakları**

*Mitokondriyal elektron transport zinciri:* Normalde hücrelerde en büyük serbest oksijen radikali kaynağı mitokondriyal elektron transport zincirinden sızıntıdır. Normal elektron akışı esnasında en son oluşan ürün sudur. Hâlbuki elektronların elektron transport zincirinden kaçıp moleküler oksijenle direkt olarak reaksiyona girmesi süperoksit radikalini oluşturur. Mitokondriyal solunum zincirinde akan elektronların yaklaşık olarak %1-2'si bu şekilde toksik bir ürün oluşturmak üzere sızıntıya uğrar. Süperoksit radikalinin üretimi ve salınımı sitozolik tarafa doğru olur. Bununla beraber mangan süperoksit dismutaz (Mn-SOD) aktivitesinin oldukça

yüksek olmasına bağlı olarak mitokondrideki süperoksit düzeyi denge halinde tutulur. Solunum zincirinde  $H_2O_2$ 'de meydana gelmektedir ve  $H_2O_2$  mitokondri membranını geçerek sitoplazmaya ulaşabilir (237-240).

*Mikrozomal elektron transport zinciri:* Endoplazmik retikulumda özellikle ksenobiyotiklerin metabolizmaları esnasında ve diğer endojen maddelerin metabolizmaları esnasında yan ürün olarak serbest radikaller üretilir. Burada elektronların kaçak yaptığı en önemli yapı nikotinamid adenin dinükleotit fosfat redüktaz P450 enzimidir (241-244).

*Küçük moleküllerin oto-oksidasyonu:* Koenzimler, flavinler, antibiyotikler, askorbik asitler, tiyoller, katekolaminler, hidrokinonlar gibi küçük moleküllerin otooksidasyonu ile serbest oksijen radikalleri oluşur (245, 246). Mesela katekolaminlerin otooksidasyonu süperoksit üretir, bu da iskemiye bağlı miyokard hasarı sebebidir (247, 248).

*Oksido-redüksiyon reaksiyonları:* Geçiş metalleri, özellikle demir ve bakır olmak üzere, fizyolojik şartlarda elektron alışverişi şeklinde gerçekleşen oksido-redüksiyon reaksiyonlarında görev alırlar (249). Geçiş metalleri bu özellikleri nedeniyle serbest radikal reaksiyonlarını hızlandıran katalizör vazifesi görürler.  $Mn^{2+}$ 'nin,  $O_2$  tarafından oksidasyonu  $Mn^{+3}$  veya Mn-Oksijen kompleksinin oluşumunu sağlar, bunlar da  $O_2\bullet$  den daha çok oksitleyicidirler (250). Metal iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarındaki asıl önemi lipit peroksidasyonundaki etkileriyle ilgilidir. Geçiş metalleri lipit peroksidasyonunu başlatmaktan çok, sentezlenmiş olan lipit hidroperoksitlerinin (LOOH) parçalanmalarını ve lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalize ederler. Böylece daha az zararlı olan radikalleri daha zararlı hale getirirler (206).

*Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transfer sistemleri:* Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda serbest radikal üretimi, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda üretilen serbest radikaller organelerin içine girebilir ve sitozolik reaksiyonlara katılabilir. Nükleer membranda oluşan serbest radikaller özellikle DNA'da hasar oluştururlar (251, 252).

*Peroksizomlar ve miks fonksiyonlu oksidazlar:* Peroksizomlar çok önemli hücre içi hidrojen peroksit kaynağıdır. Peroksizomlardaki aminoasit oksidaz, urat oksidaz, L-hidroksil asit oksidaz ve yağ asidi açıl-CoA oksidaz gibi oksidazlar, süperoksit üretmeden bol miktarda hidrojen peroksit üretimine neden olurlar (253-255).

*Çözünür enzimler ve proteinler:* Birçok enzimin katalitik döngüsü sırasında da serbest radikaller ortaya çıkar. Bu enzimlerden biri ksantin oksidazdır. Pürinlerin yıkılım yolunda en son iki reaksiyonu katalizleyen enzim ksantin oksidazdır. Ksantin oksidazın oksidaz olarak aktivite göstermesi durumunda hipoksantin ksantine ve ksantin ürik aside dönüşürken moleküler oksijen kullanılmakta, moleküler oksijen hidrojen peroksit indirgenmektedir. İskemi durumlarında oksijen seviyesi düşük olduğundan önemli hasar olmaz. Ancak oksijen seviyesi reperfüzyon sırasında normale dönünce iskemi yerinde ksantin oksidaz etkisiyle fazla miktarda hidrojen peroksit ve süperoksit radikali oluşur, bunların etkisiyle de “iskem-reperfüzyon hasarı” denen durum ortaya çıkar. Ksantin oksidazın özellikle intestinal mukoza hücrelerinde görülen iskemi-reperfüzyon hasarında önemli faktör olduğu düşünülmektedir (256, 257).

*Plazma membranı:* Ekstrasellüler olarak üretilen serbest radikaller, plazma membranından geçerken membranda toksik reaksiyonlar başlatabilirler. Membrandaki doymamış yağ asitleri ve transmembran proteinlerdeki aminoasitler serbest radikal hasarına duyarlıdır. Hidrojen peroksit, membrandan kolayca geçebilir. Süperoksit ise transmembran anyon kanalları ile geçer. Fagositik hücrelerin plazma membranındaki NADPH oksidaz aracılı serbest radikal üretimi de serbest radikallerin önemli bir biyolojik kaynağını oluşturur (258-260).

Mikrozomal ve plazma membranlarında enzimlerle ilişkili serbest radikal üretimi mevcuttur. Araşidonik asit metabolizması sonucu lipooksijenaz yolu ile süperoksit radikali üretilir. Siklooksijenaz yolunda serbest radikal ara ürünler oluşur. Araşidonik asidin biyoaktif ürünlere çevrimi sırasında, hemoprotein-oksijen ve karbon merkezli serbest radikal ara ürünleri üretilir ve bunlar doku hasarına öncülük ederler (261-263).



*Araşidonik Asit ve Prostaglandin Sentezi:* Hücre membranında prostaglandin için en önemli doymamış yağ asidi prekürsörü araşidonik asittir. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonu, plazma membranlarında araşidonik asidin salınımına yol açar. Araşidonik asidin siklooksijenaz ve lipooksijenaz tarafından katalizlenen oksidasyonu sırasında serbest radikaller oluşur. Siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerinin her ikisi de aktiviteleri için peroksitlere ihtiyaç duyarlar. Siklooksijenaz aktivitesi sonucu prostaglandinlerin sentezi içinde gerekli olan endoperoksitlerin oluşumuyla sonuçlanır. Lipooksijenaz ise lipid peroksitleri üzerinden lökotrienlerin oluşumunu katalize eder (262, 264-267).

*Solunum patlaması:* Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofiller fagositoz esnasında membran ve sitoplazmalarında buldukları NADPH oksidaz ve myeloperoksidaz enzimleri ile hem serbest oksijen radikalleri hem de aşırı okside edici hipoklorik asit (HOCl) gibi ajanları üreterek karşılaştıkları virüs, bakteri, mantar gibi ajan patojenleri yok ederler. Bu işlemler esnasında hem ara hem de ana ürün olarak çok fazla miktarda reaktif oksijen metabolitleri oluşur (133, 243).

Her ne kadar serbest radikal reaksiyonları bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil ve makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da; serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Fagositin kendisi de reaktif oksidanların zarar vermelerine karşı hassastır. Bununla birlikte kendilerini oksidanlarına karşı koruyabilirler (268). Fagositlerin antioksidan sistemleri, süperoksidi hidrojen perokside dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD), hidrojen peroksidi suya indirgeyen katalaz (CAT), hidrojen peroksidi detoksifiye edici glutatyon peroksidaz-glutatyon redüktaz sistemi, antioksidan vitaminlerden a-tokoferol (vitamin E) ve askorbik asit (vitamin C) gibi antioksidanlardır (268-270).

**Tablo 3:** Serbest oksijen radikallerinin endojen ve eksojen kaynakları (153)

<b>ENDOJEN KAYNAKLAR</b>	<b>EKZOJEN KAYNAKLAR</b>
Yaşlanma	Egzersiz
İskemi, travma, intoksikasyon	Metal iyonları
Elektron transport sistemleri ve Peroksizomlardaki enzimler	Ksenobiyotikler: hiperoksi, hava kirliliği, anestezi
Mitokondri elektron transport sistemi	Alkol ve uyuşturucu maddeler
NADPH oksidaz, lipooksijenaz gibi plazma membranı enzimleri ve lipid peroksidasyonu	Strese bağlı vücutta katekolamin düzeyinin artması
Ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, denozin deaminaz, hemoglobin	Yiyeceklerde bulunan çeşitli katkı maddeleri
Katekolaminler, tioller, tetrahidroproteinler, hidrokinonlar moleküllerin oksidasyonu	İyonize ve non-iyonize radyasyon
Geçiş metallere afinitesi olan antibiyotikler	Antineoplastik ilaçlar
Makrofaj ve fagosit hücrelerin hiperaktivasyonu	

#### **2.4.8. Serbest Radikallerin Hücre Dışı Kaynakları**

Bazı yabancı toksik maddeler hücrede serbest radikal üretimini artırır. Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal üretirler ya da serbest radikallerin ortadan kaldırılmasını sağlayan antioksidan aktiviteyi düşürürler. Çevresel faktörlerden radyasyon, hava kirliliği, azot dioksit, ozon, sülfür dioksit, böcek ilaçları, sigara kullanımı, titanyum, alüminyum, kurşun, molibden, civa, nikel, arsenik, kobalt gibi metaller, toksik kimyasallar, antineoplastik ajanlar, anestezi, antibiyotikler gibi ilaçlar serbest radikallerin hücre dışı kaynaklarıdır (137, 220, 225).

#### 2.4.10. Antioksidan Sistemler

##### Enzimatik Olmayan Antioksidanlar:

**Melatonin:** Primer olarak pineal bezde sentezlenen, özellikle gece salgılanan ve triptofandan sentez edilen bir hormondur. Lipofilik özelliği yüksek olup membranları kolaylıkla geçer. Organizmada yapılan ve tahrip edici özelliği çok yüksek olan hidroksil radikali temizler (236, 271-273).

**Glutasyon (GSH):** Glutamat, sistein ve glisin aminoasitlerinden genetik bilgiye sahip olmadan karaciğerde tripeptid yapıda sentezlenmektedir. Glutasyon, oksidatif stresin ölçümünde kullanılan çok güçlü bir antioksidandır. Redükte glutasyon (GSH)/okside glutasyon (GSSG) oranı, oksidatif durumlarda azalmaktadır. Proteinlerdeki sülfidril (-SH) gruplarını redükte halde tutarak oksidasyondan korur. Serbest radikaller ve peroksitlerle tepkimeye giren glutasyon; hücreleri oksidatif hasara karşı korur (274).

**E Vitamini:** Lipid peroksidlerini inaktive eder. Ayrıca lipid peroksid zincirini kırar ve LPO tepkimelerini durdurur (275, 276).

**Seruloplazmin:** Süper oksit ve Hidroksil radikallerini temizler. Ferröz demirin, ferrik demire yükseltgenmesini sağlar böylelikle Fenton tepkimesini inhibe eder. Bu olayın sonucunda serbest radikal oluşumu inhibe olur (277).

**C vitamini:** Çok değerli bir antioksidan olup hücre dışı sıvılarda bulunur. Süper oksit ve hidroksil radikallerini direkt olarak temizleyebilmektedir (278-280).

**Transferin:** Dolaşımdaki serbest demiri bağlamakla görevlidir (281, 282).

**Ürik asit:** Normal plazmadaki süper oksit, hidroksil ve peroksil radikallerini temizlemekle görevlidir (282, 283).

**Albümin:** Geçiş metallerini bağlar, lipid hidroperoksit (LOOH) ve hipoklorit (HOCl) toplayıcısıdır (157).

**Bilirubin:** Radikalleri tutar, süper oksit ve hidroksil radikalleri toplar (157).

**Taurin:** Ksenobiotiklere bağlanır. Hipoklorit ile tepkimeye girer ve etkisini azaltırlar. LPO ve nötrofil infiltrasyonunu inhibe eder. Antioksidan etkisinin olduğu gösterilmiştir (199).

**Sistein:** Potent bir antioksidandır. Glutasyon sentezi için prekürsördür (178).

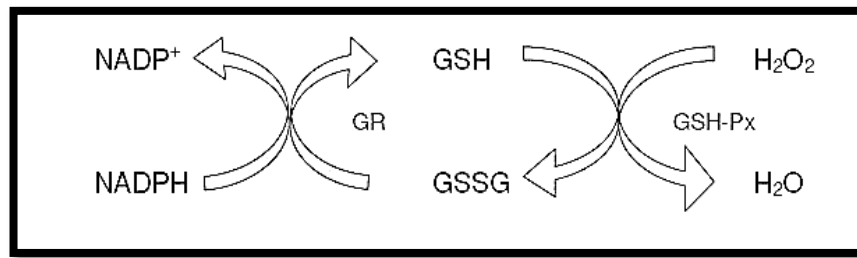
**$\beta$ -Karoten:** A vitamininin öncüsüdür ve membranlarda bulunur. Serbest radikal temizleyicisidir. Peroksitlere doğrudan (156) etki ederek peroksitleri inaktif hale getirir (174, 278).

#### Enzimatik Antioksidanlar:

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) belli başlı antioksidan enzimlerdir (140). Bu enzimler, oksidatif strese bağlı oluşan aşırı hasarın dengelenmesinde büyük öneme sahiptir.

#### **Glutasyon Peroksidaz Enzimi**

Yapısında selenyum metalini bulundurur. Bu nedenle metalloenzim grubunda değerlendirilir. İn vitro ortamda Redükte glutasyon (GSH), okside glutasyona (GSSG) çevrilir (156). Bu tepkimede hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) yüksek özgülük ile katalizleyerek detoksifiye eder. Tepkimede GSH, GSSG haline dönüşürken glutasyon peroksidaz enzimi  $H_2O_2$ 'yi suya indirger. GSSG ise glutasyon redüktaz (GR) enziminin katalizlediği tepkimeyle NADPH harcanarak tekrar redükte hale çevrilir (156, 258, 284). Tepkime aşağıdaki şekilde şematize edilmiştir. Ortamda  $H_2O_2$  düşük konsantrasyonda bulunduğu glutasyon peroksidaz enzimi (GSH-Px), katalaz enziminine göre daha etkili bir antioksidandır (156).



#### **Katalaz Enzimi**

Katalaz enzimi (CAT) glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. Ferri protoporfirin grubu içeren dört alt üniteden oluşmuştur. Prostetik grubunda Fe<sup>+3</sup> bulunan protoporfirin IX içerir. Dokularda enzimin aktivitesi büyük farklılık gösterir. Karaciğer ve böbrekte en yüksek aktivite, destek dokuda ise en düşük aktivite

gösterdiği tespit edilmiştir (285, 286).  $H_2O_2$ 'in yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ortamlarda oldukça etkilidir. Ortamda oluşan  $H_2O_2$ 'yi okside edici enzimlerin etkisiyle direkt olarak suya dönüştürür. CAT enzim aktivitesi, ortamda  $H_2O_2$  konsantrasyonunun çok arttığı durumlarda aşikar olarak artmaktadır (287-289).

Ortamdaki  $H_2O_2$  konsantrasyonu düşük olduğu durumlarda hidrojen peroksiti substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (GSH-Px gibi) devreye girerek hidrojen peroksiti ortamdan uzaklaştırırlar (285). CAT ve GSH-Px enzimlerinin benzer etkisi olduğu halde hücre içindeki yerleşim ve etki yerleri bakımından farklılık vardır. GSH-Px enzimi başlıca sitozol ve mitokondride bulunurken, CAT enzimi peroksizomlarda mevcuttur (290-293).

### **Süperoksit Dismutaz Enzimi**

Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksitin  $H_2O_2$ 'e dismutasyonunu katalizleyen enzim grubudur. Bu tepkime spontan olarak oluşabilmektedir. SOD enzimi bu tepkimeyi katalize ettiğinde hız normale göre 4 kat artar (294, 295). Radikallere karşı hücreyi koruyan savunma mekanizmaları arasında SOD enzimi ilk görevi üstlenir. SOD enzimi ile katalizlenen tepkime sonucu oluşan ürünlerin birikmesi CAT enzimi tarafından bertaraf edilmektedir. Fizyolojik şartlarda metabolik aşamalarda süperoksit radikalinin oluşumu oldukça fazladır. Süperoksit radikalinin hücre içi konsantrasyonunu düşük seviyelerde tutarak süperoksit seviyelerinin kontrolünü sağlayıp hücreleri süperoksit radikallerinin etkilerinden korur (296, 297).

Süperoksit distumaz formları arasında aminoasit dizilimi, aktif metal bölgesi ve hücresel dağılım farkı vardır. Prokaryotlarda Fe ve Mn-SOD bulunurken, ökaryotlarda Mn, CuZn ve ekstrasellüler SOD (EC-SOD) bulunur (298). Mn-SOD homotetramer yapıdadır, her subünitesinde bir Mn iyonu bulunur ve 88 kDa ağırlığındadır. Hücresel Mn-SOD içeriği kalp, beyin, karaciğer, böbrek gibi yüksek metabolik aktivitesi olan dokularda daha fazladır (299, 300). CuZn-SOD 32 kDa ağırlığında olup memelilerde en çok karaciğer, böbrek, eritrosit ve santral sinir sisteminde bulunur. İki protein subünitesi içerir her subünitede Cu ve Zn atomları bulunur. EC-SOD ise en çok akciğer ve tiroid bezinde bulunur (295, 301).

## **2.5. Orak Hücre Anemisinde Endotel Hasarı**

Endotel, eritrositten kopmuş olan serbest hemoglobine olan yakınlığı ve iskemi-reperfüzyon hasarının etki yeri olarak OHA'da oksitadif stresin en büyük hedefidir. Çeşitli oksidatif stresle ilişkili mekanizma serebral vaskülopati, pulmoner hipertansiyon ve retinopati gibi patolojilerde rol oynayan endotel hasarına sebep olur (14, 302). Aslında ROS'un membran lipidleri, peptitler ve nükleik asitlere yaptığı hasar, oksidatif stresin endotel hücrelerine yaptığı direk hasardır (303-305). Bu durum endotel hücrelerinde şişme ve bazal membrandan ayrışmaya sebebiyet verir.

Sonuçta subendotel tabakada bulunan doku faktörü gibi proteinlere maruz kalınması ile OHA'deki aşırı koagülatif klinik tablo ortaya çıkar. Bundan başka olarak Nükleer Faktör-KB (NFkB)'nin aktive olması ile ROS, inflamatuvar durumun ortaya çıkmasına neden olacak olan proinflamatuvar sitokinleri (IL-1, IL-6 ve TNF-a) bunların gen ekspresyonunu, vasküler ve intrasellüler adezyon moleküllerininin (VCAM-1 ve ICAM-1) üretimini arttırır (84, 305, 306).

Endotel adezyon moleküllerinin aşırı artışı vazooklusif krizin daha da kötüleşmesine katkıda bulunabilir (307). Ayrıca, OHA'de endotel hasarına bağlı bozulan vazodilatasyon mekanizması XO kaynaklı süperoksit tarafından NO'un inaktivasyonuna sebep olabilir. SOD gibi antioksidan ilaçların kullanılması ile bozulan vazodilatasyon mekanizmasının normale dönmesi ROS'un bu durumdaki etkisini kanıtlamaktadır (114, 134).

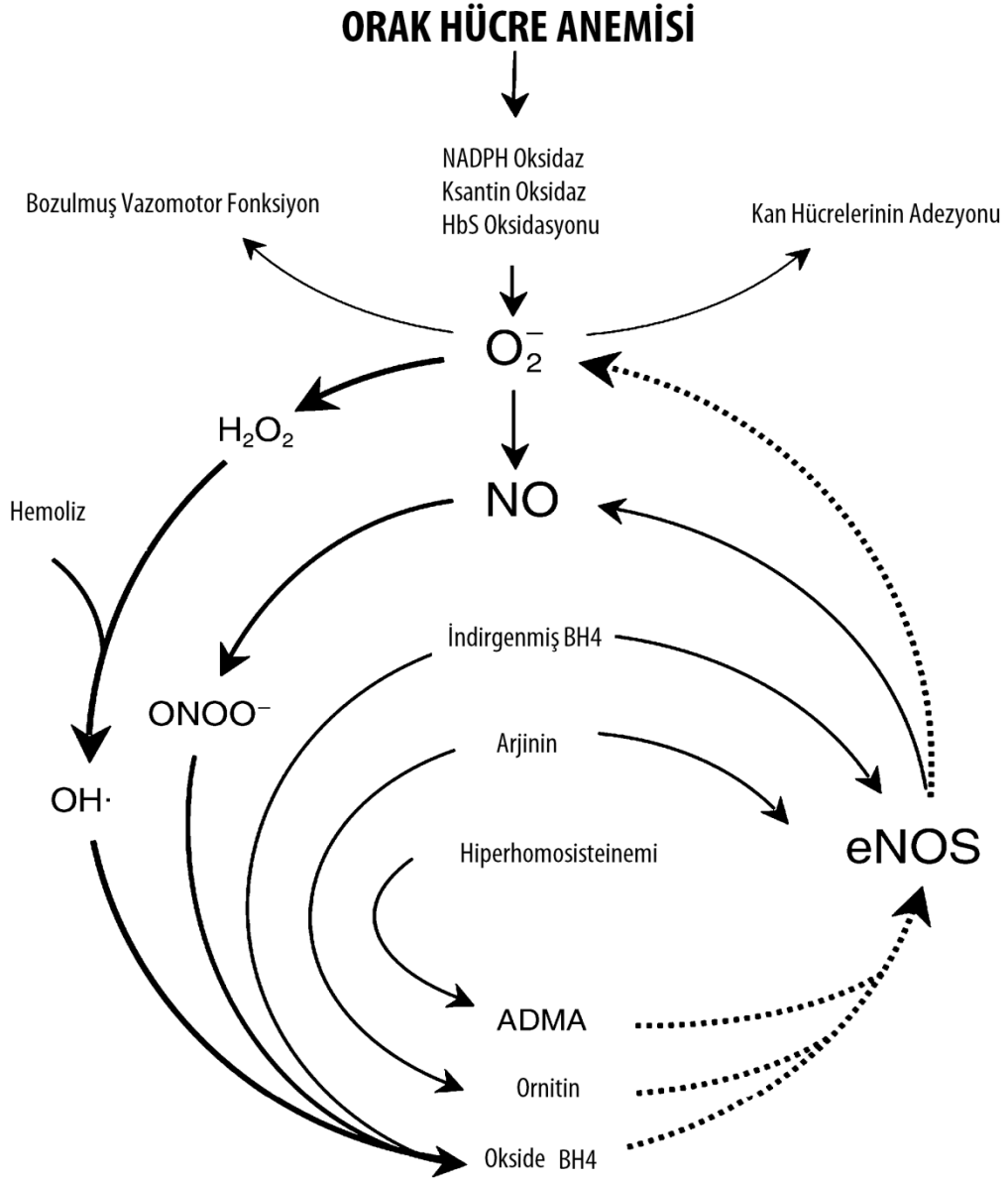
### **2.5.1. Nitrik Oksit**

Vasküler endotel kaynaklı NO, OHA'de meydana gelen vazokontraksiyonun açıklanması ve lokal etkili vazodilatasyonun sağlanmasında çok önemli bir moleküldür. Çünkü OHA'de endotel hasarının meydana gelmesi ve farklı birçok molekülün salınması sonucunda indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) aktivitesi de etkilenmektedir. Fare ve insan deneylerinde OHA'de böbrek ve karaciğer

dokusunda NOS gen ekspresyonunun arttığı tespit edildi (115, 308, 309). OHA'nın patogeneğinde nitrotirozinle beraber bu dokularda lokalize olan iNOS kolonizasyonunun, hücre apoptozu ve değişen eritrosit hücre iskeleti ile birliktelik gösterir (308, 309). OHA'de endotelial NOS (eNOS)'un rolü ise tartışmalıdır. eNOS'un etkisini destekleyen en tatmin edici kanıt, OHA'de bozulan endotel kaynaklı vazodilatasyon ve aortik halkanın aşırı vazokonstrüksiyonunu işaret eden sonuçlardır (134).

eNOS bulunmayan ve eNOS aşırı eksprese olan farelerle yapılan deneylerde, OHA kaynaklı kan hücre adezyonunun uyarılmasında eNOS'un etkili olduğu gösterildi. eNOS'tan yoksun OHA'lı farelerde platelet ve lökositlerin adezyonu azalırken, aksine eNOS aşırı eksprese olan farelerde bu adezyon molekülleri aşırı yüksek tespit edilmiştir (310, 311).

OHA'de eritrositlerde meydana gelen hemoliz, olan arjinaz ve serbest hemoglobin artışına katkıda bulunarak azalmış NO biyoaktivitesine neden olur. L-arjininin arjinazı tüketmesi sonucunda NO sentezleyen NOS için gerekli substrat azalmış olur. Serbest hemoglobin ise gaz haldeki monoksiti parçalamak için sınırlı bir difzyon oranında NO ile reaksiyona girer (312).



**Şekil 10:** OHA'da oksidatif stresin indüksiyonu ve NO oluşumuna etkisi: NADPH oksidaz, ksantin oksidaz ve HbS'in oto-oksidasyonu süperoksit üretiminin esas kaynağıdır. Hemoliz L-arjininini tüketen arjinazı, hidroksil radikalini katalizleyen demiri ve NO parçalayan hemoglobini serbestleştirir. L-arjinin biyoetkinliği hiperhomosisteinemi ile ilişkili olan asimetrik dimetilarjinin (ADMA) oluşumun etkiler. Süperoksitinn NO ile reaksiyonu sonucu tetrahidrobiyopterin okside olur. Normalde NO sentezi için yeterli olan BH4 ve L-arjinin miktarı OHA'de yetersiz kalır ve eNOS tarafından NO yerine süperoksit üretilir. Sonuçta artan ROS üretimi ile kısır döngü oluşur ve klinik tablo daha da ağırlaşır.  $O_2^-$ , süperoksit;  $H_2O_2$ , hidrojen peroksit;  $OH\cdot$ , hidroksil radikali; ONOO, peroksi nitrit (313).



### 2.5.2. Myeloperoksidaz

Nötrofilden türeyen ve Hem içeren Myeloperoksidaz (MPO), Nitrik oksiti (NO) direkt olarak tüketir ve Nitrik oksitin biyoaktivitesinin düzenleyerek vazomotor fonksiyonları olumsuz yönde etkiler. Nitrik oksitin metaboliti olan Nitrit de benzer şekilde MPO'un substratıdır ve reaktif oksidize eden ve nitratlayan nitrogen dioksit'e ( $\bullet\text{NO}_2$ ) oksidize olur. Önemli bir diğer nokta ise OHA gibi yaygın inflamatuvar hastalığı bulunan hastaların dokularında subendotelyal boşluk boyunca MPO'un diffüz immunoreaktivitesi, endotel hücreleri ve MPO arasındaki farklı etkileşimleri açıklayan invitro gözlemleri güçlendirmektedir. OHA'lı hastaların akciğer dokularında muhtemelen pulmoner hipertansiyona ve akut göğüs sendromununun oluşmasına katkıda bulunan alveolar epiteli boyunca artmış MPO immunoreaktivitesi mevcuttur (314, 315).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Çalışma Şekli**

Orak Hücre Anemili hastaların kan örnekleri, Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Anabilim Dalı'nda tanısı konmuş ve üç ay transfüzyon almamış remisyon dönemindeki 40 yetişkin hastadan, kontrol grubunun kan örnekleri ise HPLC ile herhangi bir hemoglobinopatisi bulunmadığı tespit edilmiş 40 yetişkin sağlıklı bireyden alındı. Olgulardan venöz staza yol açmadan, jelli biyokimya tüpü ve EDTA içeren antikoagulanlı tüplere alınan kan örnekleri +4°C'de 15 dakika bekletilip soğutmalı santrifüjde (+4°C) 3500 devirde 10 dakika çevrildikten sonra 8 ayrı ependorf tüpe porsiyonlandı.

Hematolojik testleri yapıldıktan sonra çalışma yapılana kadar 4 ay süreyle -80°C derin dondurucuda saklandı. EDTA'lı tüplere porsiyonlanan kanlardan 3 ayrı ependorf hemolizat hazırlandı. Bütün numuneler soğuk zincire göre dondurulup çözüldükten sonra, serum numunelerden Fetuin-A, IL-6, TNF $\alpha$ , NO ve MPO düzeyleri ELISA yöntemiyle; CRP, Albümin, Transferrin düzeyleri oto analizör cihazı ve antioksidan enzimler (MDA, SOD, CAT, GSH-Px, G6PD) manüel spektrofotometrik olarak ölçüldü.

### 3.2. Kullanılan Cihazlar

#### Cihazlar

- Spektrofotometre
- UV spektrofotometre
- Su Banyosu
- Kan sayım cihazı
- Buz makinesi
- Soğutmalı Santrifüj
- Santrifüj
- Manyetik karıştırıcı
- Vorteks
- Dijital pH metre
- Elektrikli Terazî
- Otomatik pipet
- Aspiratör

#### Marka & Model

Bausch and Lomb Spectronic 20D  
Schimadzu-UV 260  
Thermomix BU  
CellDyne-3700  
Scotsman AF-10  
NUVE Centrifuge 5403  
NUVE D7200  
Heidolph MR 2002  
Elektro-mag M-16  
WTW pH S25  
Mettler P 1210  
Gilson P-20, P-100, P-200, P-1000 µl  
Vacumat

### 3.3. Kimyasal Maddeler

#### Kimyasallar (Alfabetik)

- Ammonium sulfate ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )
- n-Butanol ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ )
- Bovine Serum Albumin
- Kloroform ( $\text{CHCl}_3$ )
- Cupric chloride ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- $\text{Na}_2\text{EDTA}$
- Glutathione Redüktaz
- Glutathione-reduced (GSH)
- Hidrojen Peroksit %30
- Reduced NADPH
- Nitroblue tetrazolium (NBT)
- Potasium dihidrogen phostphate
- Sodium azid ( $\text{NaN}_3$ )
- Sodium Carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
- Sodium Cyanide ( $\text{NaCN}$ )
- Sodium phospate dihydrate
- 2- Thiobarbituric acid (TBA)
- Xanthine ( $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$ )
- Xanthine Oxidase (XO)

#### Firma

Sigma A6387  
Merck 1.00988  
Sigma A-2153  
Merck 24.31  
Sigma C-6641  
Sigma ED2SS  
Sigma G-3664  
Sigma G-6529  
Merck 1,08597  
Sigma N-1630  
Sigma N-6876  
Sigma N-6872  
Merck 6688  
Merck 1.06398  
Sigma S3296  
Merck 1.0398  
Sigma T-5500  
Sigma X-7375  
Sigma X-1875

#### Kullanım Yeri

*SOD, GSH-Px*  
*MDA*  
*SOD*  
*SOD*  
*SOD*  
*SOD, GSH-Px*  
*GSH-Px*  
*GSH-Px*  
*CAT, SOD, GSH-Px*  
*GSH-Px*  
*SOD*  
*GSH-Px*  
*GSH-Px*  
*SOD*  
*SOD*  
*SOD*  
*MDA*  
*SOD*  
*SOD*

### **3.4. Hematolojik Analizler**

#### **3.4.1. Hemogram Tayini**

EDTA'lı tüplere alınan hasta kanları ve sağlık bireylerin kanları +4°C'de 15 dakika bekletilip soğutmalı santrifüjde (+4°C) 3500 devirde 10 dakika çevrildi. Numunelerden Beckmann Counter CellDyne-3700 Hemogram Otoanalizör cihazıyla Hemoglobin (Hb), Hematokrit (Hct), Eritrosit (RBC), Ortalama Eritrosit Hacmi (MCV), Ortalama Eritrosit Hemoglobini (MCH) ve ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) değerlerinin ölçümleri yapıldı ve sonuçları kaydedildi.

#### **3.4.2. Hemolizat Hazırlanması**

1. Numuneden 2 mL tam kan 1500 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Plazma ve beyaz hücrelerin bulunduğu en üst katmanı (aliquat) uzaklaştırıldı.
2. Numuneye 10 mL soğuk % 0.9 NaCl eklenip alt-üst edildi.
3. Numune 1500 x g'de 10 dakika tekrar santrifüj edildi.
4. Süpernatant ve lökositlerden zengin beyaz en üst tabaka uzaklaştırıldı.
5. NaCl ilâvesi ile olan işlem (2-4. basamaklar) 3 defa tekrarlandı.
6. Hacim 0,5 mL olacak şekilde ependorf tüplerde -80°C'ye kaldırıldı.

#### **Eritrosit numune eldesi için hazırlanan solüsyonlar:**

1. Hemoliz için hacim 1/10 oranında buz gibi soğuk distile su.
2. SOD ekstraktı için Kloroform / Etanol = 3/5 (v/v) oranında karışım.

#### **3.4.3. Hemoglobin Tayini**

##### **Deney Prensibi**

Hemoglobin molekülündeki +2 değerlikli demir drabkin çözeltisindeki ferrosiyandır ile +3 değerliğe yükseltgenerek methemoglobine daha sonra potasyum siyanür ile kararlı bir bileşik olan siyanmethemoglobine dönüşür. Bu molekül 540 nm dalga boyunda verdiği transmitans değeri ölçülerek hemoglobin (Hb) miktarı belirlenir (316).

**Reaktifler:**

- \* Drabkin Çözeltisi hazırlanır,
  - $K_3Fe(CN)_6$  0,198 gr
  - KCN 0,052 gr
  - $NaHCO_3$  1,0 gr
  - Saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

**Deneyin Yapılışı**

Eğri çizimi için 2, 4, 8, 12, 18, 20 g/dl'lik derişimlerde standartlar hazırlanarak 15 dakika oda ısında bekletilir. Spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda tansmitans okunarak standart eğri çizilir.

Çözeltiler tüplere aşağıdaki gibi konulur.

	<b>Kör (ml)</b>	<b>Örnek (µl)</b>
Drabkin Çözeltisi	5	5
Hemolizat	-	20

Tüpler 15 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 540 nm'de transmitans değeri okunarak standart eğriden hemoglobin (Hb) miktarı saptanır.

## **3.6. Analiz Yöntemleri**

### **3.5.1. Fetuin-A Ölçümü**

Fetuin-A tayinleri Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarlarında yapıldı. Çalışmada serum Fetuin-A düzeyleri Sandwich Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle ölçüldü. Ölçümler için 96 numunelik BioVendor marka ticari Fetuin-A kiti kullanıldı (Human Fetuin-A ELISA Kit, Katalog No: RD-191037100, Üretici Firma: Bio Vendor Research and Diagnostic Products, Candler, NC 28715, USA). Kullanılan kit prosedürüne çalışma öncesindeki inkübasyonlar yapıldıktan sonra 450 nm dalga boyunda ölçüm yapıp Human Fetuin-A standartları ile çizilen standart eğri grafiğinden, çalışılan örneklerin Fetuin-A konsantrasyonları hesaplandı.

### **3.5.2. Interlökin-6 Ölçümü**

IL-6 tayinleri Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarlarında yapıldı. Çalışmada serum IL-6 düzeyleri Sandwich Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle ölçüldü. Ölçümler için ASSAYPRO marka ticari IL-6 kiti kullanıldı (AssayMAX Human IL-6 ELISA Kit, Katalog No: EI1006-1, Lot: 03411203, Üretici Firma: ASSAYPRO LLC, Triad South Drive St. Charles, MO 63304, USA). Kullanılan kit prosedürüne göre çalışma öncesindeki inkübasyonlar yapıldıktan sonra 450 nm dalga boyunda absorbans ölçüm ve çizilen standart eğri grafiğinden, çalışılan örneklerin IL-6 konsantrasyonları hesaplandı.

### **3.5.3. Tümör Nekroz Faktör Ölçümü**

TNF-Alfa tayinleri Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarlarında yapıldı. Çalışmada serum TNF-a düzeyleri

Sandwich Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle ölçüldü. Ölçümler için ASSAYPRO marka ticari TNF-Alfa kiti kullanıldı (AssayMax Human TNF-Alfa ELISA Kit, Katalog No:ET2010-1, Lot: 03651225, Üretici Firma: ASSAYPRO LLC, Triad South Drive St. Charles, MO 63304, USA). Kullanılan kit prosedürüne göre çalışma öncesindeki inkübasyonlar yapıldıktan sonra 450 nm dalga boyunda absorbans ölçüm ve çizilen standart eğri grafiğinden, çalışılan örneklerin TNF-Alfa konsantrasyonları hesaplandı.

#### **3.5.4. Myeloperoksidaz Ölçümü**

Myeloperoksidaz (MPO) tayinleri Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarlarında yapıldı. Çalışmada serum MPO düzeyleri Sandwich Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle ölçüldü. Ölçümler için 96 numunelik BioVendor marka ticari Myeloperoksidaz kiti kullanıldı (Human MPO ELISA Kit, Katalog No: RHK-324R, Üretici Firma: BioVendor Research and Diagnostic Products, Candler, NC 28715, USA). Kullanılan kit prosedürüne göre substratın enzimatik yıkımının derecesi, 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümüyle tespit edildi. Ölçülen absorbans, serumdaki MPO konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Human MPO standartları ile çizilen standart eğri grafiğinden, çalışılan örneklerin MPO konsantrasyonları hesaplandı.

#### **3.5.5. Nitrik Oksit Ölçümü**

Nitrik Oksit (NO) tayinleri Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarlarında ile yapıldı. Çalışmada serum NO düzeyleri Sandwich Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle ölçüldü. Ölçümler için 96 numunelik CUSABIO marka ticari Nitrik Oksit kiti kullanıldı (Human Nitric Oxide ELISA Kit, Katalog No: CSB-E13209h, Üretici Firma: Scientific Research Center Cusabio Biotech Co., Ltd. 113 Barksdale Professional Center Newark, DE19711). Kullanılan kit prosedürüne göre substratın enzimatik yıkımının derecesi, 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümüyle tespit edildi. Human NO standartları ile çizilen standart eğri grafiğinden, çalışılan örneklerin NO konsantrasyonları hesaplandı.

### 3.5.6. Katalaz Ölçümü

#### Deney Prensipli

Katalaz aktivitesi Aebi'nin metoduna göre çalışıldı (317). Deney ortamına eklenen  $H_2O_2$  'nin numune içinde bulunan katalaz tarafından ortamdaki uzaklaşması esasına göre ölçüm yapılır.  $H_2O_2$ 'nin spektrofotometrik olarak 240 nm' deki absorbansı kaydedilir.

#### Reaktifler

- **Fosfat tamponu** (pH 7, 50 mM)
- **$H_2O_2$  çözeltisi:** Absorbansı 0.500 nm'ye tampon ile ayarlanmış olan  $H_2O_2$ 'li fosfat tamponu olup; yaklaşık 300 mL pH 7, 50 mM olan fosfat tamponu renkli kaba (plastik, cam olabilir) aktarıldı. Spektrofotometre fosfat tamponuna göre sıfırlanıp renkli kabdaki tampona 10-20  $\mu$ L hacimlerle  $H_2O_2$  ilâve edildi. Optik Dansite 0.500 nm oluncaya kadar devam edildi.

#### Deneyin yapılışı

Fosfat tamponuna göre 240 nm dalga boyunda fosfat tamponuna göre sıfırlanan köre karşı  $H_2O_2$  çözeltisinin absorbansı 0.500'e ayarlandı.

Reaktifler	Kör (mL)	Numune (mL)
Fosfat Tamponu	2.99	-
$H_2O_2$ çözeltisi	0.01	2.99
Hemolizat	-	0.01

Numune ilâvesi ile quartz küvetin ağzı bekletilmeden kapatılıp hemen küvet alt-üst edilip absorbans okundu. Absorbans azalması her 10 sn'de bir defa olmak üzere 2 dakika süre ile kaydedildi. Hesaplama 1 dakikalık lineer absorbans azalmasının en yüksek ( $OD_1$ ) ve en düşük ( $OD_2$ ) değerleri esas alınır.



## Hesaplama

$$K = [2.3 \times \log (OD_1/ OD_2)] / \Delta t \text{ (sn)}$$

$$K/\text{mg Hb} = k / [(\text{mg/dl Hb}) \times 1000]$$

### 3.5.7. Glutasyon Peroksidaz Ölçümü

#### Deney Prensipli

GSH-Px aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı (318). Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) varlığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutasyon (GSSG)'a yükseltgenmesini katalizler. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir. GSH-Px aktivitesi NADPH'ın  $NADP^{+}$ 'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de okunmasıyla hesaplanır.

\*\*\* **Enzim Ünitesi:** Birim zamanda okside olan NADPH'ın mikromol miktarıdır.

#### Reaktifler

- GSH-Px Tamponu (pH 7, 50 mM Fosfat Tamponu + 5 mM EDTA)
- Amonyum Sülfat (3.2M  $(NH_4)_2SO_4$ )
- Redükte Glutasyon (150 mM)
- 1M  $NaN_3$  (Sodyum Azid)
- GSH-Redüktaz
- 2 mM Hidrojen Peroksit

#### Deneyin yapılışı

Reaktifler	Numune (mL)
Fosfat tamponu (pH 7, 50 mM) + EDTA	2.650
150 mM Redükte GSH	0.100
8 mM NADPH	0.100
GSH-Redüktaz	0.010
1 M $NaN_3$	0.010
Numune	0.020

\*\*\* 30 dakika oda ısısında inkübasyon yapıldıktan sonra her tüpe 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den 0,100 ml pipetlendi. Dalga boyu 340 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede numunelerin absorbanans değerleri 5 dakika boyunca kaydedildi. Lineer aktivite azalışının olduğu absorbanans aralığının 1 dakikalık süresi esas alınarak hesap yapıldı.

### Hesaplama

$$\text{IU/L} = [(\Delta A/t) / 6.22 \times 10^{-6}] \times (1 / 0.02)$$

$$\text{IU/mg Hb} = (\text{IU/L}) / (1000 \times W)$$

$$\text{Spesifik aktivite IU/mg Hb} = (\text{IU/L}) / (1000 \times W)$$

$\Delta A$  = OD değişimi, t= zaman (dk), W= Enzim çözeltisinin protein miktarı (mg/mL)  
NADPH =  $6.22 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} = 6.22 \text{ mM}^{-1}$

### 3.5.8. Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz Ölçümü

#### Deney Prensipli

Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G-6-PDH, Glukoz-6-fosfat oksidoredüktaz, EC 1.1.1.49), pentoz fosfat yolunda 6-Fosfoglukonatı Glukoz-6-Fosfata okside ederek ve NADP'yi NADPH'a indirgeyerek birinci basamağı katalizler. Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP), G-6-P varlığında G-6-PDH tarafından indirgenir. 340 nm'de ölçülmesi oluşan NADPH miktarının ölçülmesi ile onunla doğru orantılı olarak G-6-PD aktivitesi de tespit edilir. Trinity Biotech markasına ait olan bu kit protokolü Kornberg&Horecker (319) ile Lohr&Waller (320) çalışma yöntemlerinin spektrofotometrik bir modifikasyonudur.

#### Reaktifler

- **G-6-PDH Assay Reaktifi (5,5 ml):** NADP (1,5 mmol/L) ve maleimide (12 mmol/L)
- **G-6-PDH Substrat Solüsyonu:** Glukoz-6-fosfat (1,05 mmol/L), tampon, magnezyum tuzu ve sodyum azid (0,1%)

### **Deneyin yapılışı**

Test tüplerine 1 ml G-6-PDH assay reaktifi ve 0,01 ml kan örneği ekledikten sonra eritrositler uzaklaştırıldı. 25°C'de 10 dakika beklendi. 2.0 ml G-6-PDH Substrat Solüsyonu eklendi ve alt üst edilerek nazikçe karıştırıldı. Tüpler sabit sıcaklığın olduğu Benmari su banyosunda 5 dakika termal dengede bekletildi. Sonrasında 340 nm'de distile suya karşı absorbans kaydedildi (Kayıt A). Numuneler tekrar su banyosunda 5 dakika tutuldu ve ikinci okuma gerçekleştirildi (Final A).

### **Hesaplama**

$$\mathbf{G-6-PD (U/g Hb) = \Delta A (dk) \times (100 \times 3.01) / (0.01 \times 6.22 \times Hb (g/dl)) \times TCF}$$

*100*: Aktiviteyi 100ml çevirme faktörü

*3.01*: Toplam reaksiyon hacmi

*0.01*: Numune hacmi

*6.22*: Millimolar absorbance NADPH (340 nm)

*Hb (g/dl)*: Hemoglobin konsantrasyonu

*TCF*: Sıcaklık doğrulama faktörü (30°C için 1 kabul edilir)

### **3.5.9. Süperoksit Dismutaz Ölçümü**

#### **Deneyin Prensibi**

Süperoksit dismutaz aktivitesi; Sun ve arkadaşlarının metoduna (321) ve Durak ve arkadaşlarının (322) tariflediği modifikasyona göre tayin metodu: ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitro blue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına dayanır. Oluşan süperoksit radikalleri (O<sub>2</sub><sup>·</sup>) ortamdaki NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamda bu indirgeme meydana gelip mavi-mor renk oluşmaktadır. Ortamda SOD olduğunda ise NBT indirgenmesi olmayıp mavi-mor renk meydana gelmemekte ve enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır. Enzim bulunmayan (Kör) değeri ile enzim bulunan numune absorbans değerleri hesaba katılır.

### Reaktifler

- 0.3 mmol/L Xanthine
- 0,6 mmol / L EDTA (2 Na tuzu)
- 150 µmol / L NBT
- 400 mmol / L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- 1g / L bovine serum albumin ( BSA)
- 0.8 mmol/L CuCl<sub>2</sub>
- M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Amonyum sülfat)
- 167 U/L Xanthine Oxidase (XO)

\*\*\* İlk 5 kimyasal hacimleri koyu renk cam şişeye köpürtülmeden birleştirilir (ASSAY reaktifi). Toplam hacim 490 mL oldu; her numune için 2.85 mL kullanılacağından 170 numune çalışılabilir. Miadı yaklaşık 2-8°C'de 2 aydır.

### Deneyin yapılışı

Reaktifler	Kör (mL)	Numune (mL)
ASSAY reaktifi	2.85	2.85
Ekstrakt (Etanol fazı)	-	0.10
Bidistile su	0.10	-
167 U/L XO	0.05	0.05

Kör tüpüne enzim ilâvesi ile tüp altüst edilir ve inkübasyon süresi başlatıldı. 25 °C'de 20 dakika inkübasyon sonu hemen; kör ve numune tüplerine 0.08 mM/L CuCl<sub>2</sub> pipetlendi ve reaksiyon durduruldu. Distile suya karşı körden başlanarak numuneler 560 nm.'de okundu.

### Hesaplama

$$\% \text{ İnhibisyon} = [\text{Absorbans kör (AK)} - \text{Absorbans numune(AN)}] / (\text{AK}) \times 100$$

% 50'lik inhibisyona 1 Ü denildiği için;

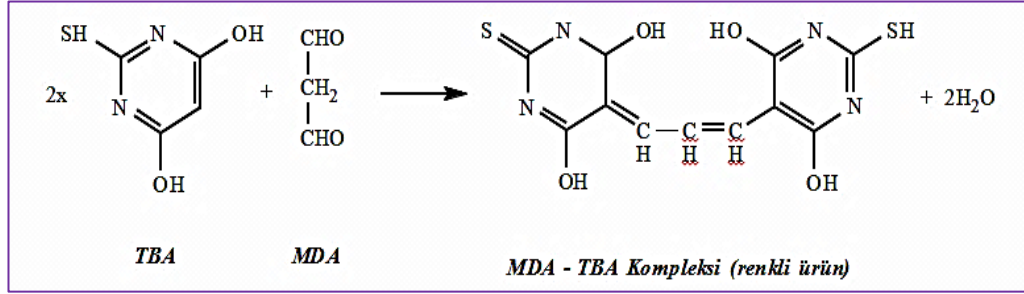
$$\% 50 \text{ inhibisyon} = (\text{AK} - \text{AN}) / \text{AK} \times 20 = \text{Spesifik aktivite (SA)}$$

\*\* Eritrosit için: SA x 5 (sulandırma faktörü) / Hb (gr/mL) = Ü/gr hemoglobin

### 3.5.10. Malondialdehid Ölçümü

#### Prensip

Lipit peroksidasyonundaki bu yöntem çift kaynatma esasına dayanır. Birinci ısıtmada bağlı olan MDA proteinlerden serbestleştirilerek proteinler çöktürülür, ikinci ısıtmada ise total MDA, TBA ile sıcak ve asidik ortamda renkli kompleks oluşturacak şekilde reaksiyona girer. Hammode ve ark. yönteminde, TBA-MDA'nın oluşturduğu (Şekil 11) renkli kompleksin 532 nm'de verdiği absorbansıyla doğru orantılı olarak MDA'nın konsantrasyonu hesaplanmış olur (323).



Şekil 11: MDA'nın TBA ile reaksiyonu ve oluşan renkli TBA-MDA kompleksinin yapısı

#### Reaktifler

- % 10'luk triklorasetik asit (TCA)
- % 0.675'lik tiobarbitürik asit (TBA)

#### Deneyin yapılışı

Kontrol ve numune tüplerine 2,5 mL TCA (%10) kondu. Numune tüpüne 0,5 mL serum, kontrol tüpüne ise 0,5 mL distile su eklendi. Tüplerin ağızları sıkıca kapatılarak önceden 90°C'ye kadar ısıtılmış su banyosu içinde 15 dakika bekletildi. Bekleme süresi sonunda tüpler su banyosundan çıkarılarak akan musluk suyu altında soğutuldu. 3.000 rpm de 10 dakika çevrildi.

10 mL'lik vidalı-kap cam tüp	Kör tüpü (mL)	Numune tüpü (mL)
% 10'luk TCA (mL)	2.5	2.5
Numune (mL)	-	0.5
Distile su (mL)	0.5	-

Üstteki süpernatanttan 2'şer mL başka boş tüplere aktarıldı. Bu tüplerin üzerine 1 mL TBA çözeltisi (% 0.675) eklendi ve aynı şekilde ağızları sıkıca kapatılarak 90°C'lik su banyosunda 15 dakika bekletildi.

10 mL'lik vidalı-kap cam tüp	Kör tüpü	Numune tüpü
Süpernatant (mL)	2	2
% 0.675'lik TBA (mL)	1	1

Süre sonunda su banyosundan çıkarılan tüpler akan musluk suyunda soğutuldu. Spektrofotometrede 532 nm'de köre karşı numunenin absorbansı ölçüldü.

### Hesaplama

Körün absorbansı numunenin absorbansından çıkartılarak net absorbanslar bulundu. TBA-MDA kompleksinin 532 nm'deki molar ekstinksiyon katsayısı olan  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 'den faydalanılarak ve dilüsyon faktörü de dikkate alınarak nmol/mL cinsinden MDA konsantrasyonları hesaplandı.

### 3.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 13.0 programı kullanılmıştır. Her parametreye ait ölçümler için verilerin normallik kontrolü Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildikten sonra tanımlayıcı istatistiksel incelemelerde Pearson korelasyon, tek yönlü yaryans analizi (ANOVA) ve multiple regresyon analizi kullanıldı. Anlamlılık seviyesinin değerlendirilmesinde Posthoc analiz için Scheffe testi kullanıldı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık  $p < 0,05$  düzeyinde, %99'lik güven aralığında ileri derecede anlamlılık  $p < 0,01$  düzeyinde değerlendirilmiştir.

#### 4. BULGULAR

Orak Hücre Anemisi' de Fetuin-A, inflamasyon ve oksidatif stresin değerlendirilmesini amaçlayan bu çalışmada, hasta grubu örnekleri Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalı'nda yapılan muayene ve tetkiklerle tanısı konulmuş olan yetişkin yaş grubu Orak Hücre Anemisi hastalarından toplanmıştır. Kontrol grubu örnekleri ise herhangi bir hemoglobinopatisi veya sistematik rahatsızlığı bulunmadığı kesinleştirilmiş yetişkin yaş grubu sağlıklı bireylerden toplanmıştır. Çalışma kanları biyokimya tüpü ve EDTA'lı hemogram tüplerine alınmıştır. Gruplara ait hematolojik veriler numunelerden çalışıldıktan sonra porsiyonlanarak -80°C de saklandı.

OHA grubu, yaşları 18-33 arası değişen 21 erkek ve 14 bayan hastadan oluşmaktadır. Kan örnekleri, oraklaşma krizine bağlı tedavi gören ve tedavisi tamamlanmış hastalardan alınmıştır. Kontrol grubu ise yaşları 18-36 arasında değişen 19 erkek ve 15 bayan sağlıklı bireyden oluşmaktadır. Kontrol ve hasta grubuna ait demografik veriler Tablo 4'de; bu verilerin dağılımı Şekil 12'de verilmiştir.

**Tablo 4:** Hasta ve kontrol grubun demografik verilerine ait ortalamalar

(Ort.±S.S)	HASTA	KONTROL	p
<b>Yaş</b>	26,1±7,2	24,9±7,2	>0,05
<b>Kilo (kg)</b>	66,7±11,8	76±14,7	>0,05
<b>Boy (cm)</b>	163,7±8,5	163,1±8,4	>0,05
<b>Sigara (paket)</b>	0,25±0,7	0,32±0,59	>0,05

**Tablo 5:** Hasta ve kontrol grubun hematolojik verilerine ait ortalamalar

<b>(Ort.±S.S)</b>	<b>HASTA</b>	<b>KONTROL</b>	<b>p</b>
<b>RBC</b> ( $10^6/\mu\text{L}$ )	2,5±0,6	4,4±0,4	<0,001
<b>HB</b> (g/dL)	6,8±1,4	12,5±0,9	<0,001
<b>HCT</b> (%)	20,6±4	37,2±2,9	<0,001
<b>WBC</b> ( $10^3/\mu\text{L}$ )	8,8±3,1	7,1±1,9	<0,05
<b>MCV</b> (fL)	83±9,1	84±2,2	>0,05
<b>MCH</b> (pg)	27,4±5,3	28,1±2,1	>0,05
<b>MCHC</b> (g/dl)	33,4±1,7	33,5±0,7	>0,05
<b>HbS</b> (%)	77,9±6,2	0	<0,001

Kontrol ve OHA hasta grubunun hematolojik verilerine ait ortalama değerler istatistiksel olarak kıyaslandığında RBC, Hemoglobın ve Hematokrit değerleri Orak hücre anemili hastalarda kontrol grubuna kıyasla beklenildiği üzere oldukça düşük tespit edildi ( $p<0,001$ ). OHA ve kontrol grubuna ait Fetuin-A, inflamatuvar belirteçler ve oksidatif stres parametrelerine ait ortalama, standart sapma ve istatistiksel analiz verileri Tablo 7’de verildi.

**Tablo 6:** Fetuin-A seviyeleri ile TNF, IL-6, NO, MPO, G6PD, MDA, SOD, CAT, GSH-Px, CRP, HbS, Yaş, Cinsiyet arasındaki ilişkinin gösterilmesinde Pearson korelasyon testi. \* Korelasyon %5 düzeyinde anlamlı \*\* Korelasyon %1 düzeyinde anlamlı (iki yönlü).

<b>Fetuin-A Seviyeleri</b>	<b>r</b>	<b>p değeri</b>
<b>TNF</b>	-0,078	0,522
<b>IL-6</b>	0,211	0,097
<b>NO</b>	-0,310**	0,009
<b>MPO</b>	0,016	0,894
<b>G6PD</b>	0,435**	0,001
<b>MDA</b>	0,547**	0,001
<b>SOD</b>	0,024	0,847
<b>CAT</b>	-0,035	0,776
<b>GSH-Px</b>	0,053	0,669
<b>CRP</b>	0,077	0,525
<b>HbS</b>	-0,017	0,925
<b>Yaş</b>	0,078	0,526
<b>Cinsiyet</b>	-0,132	0,278



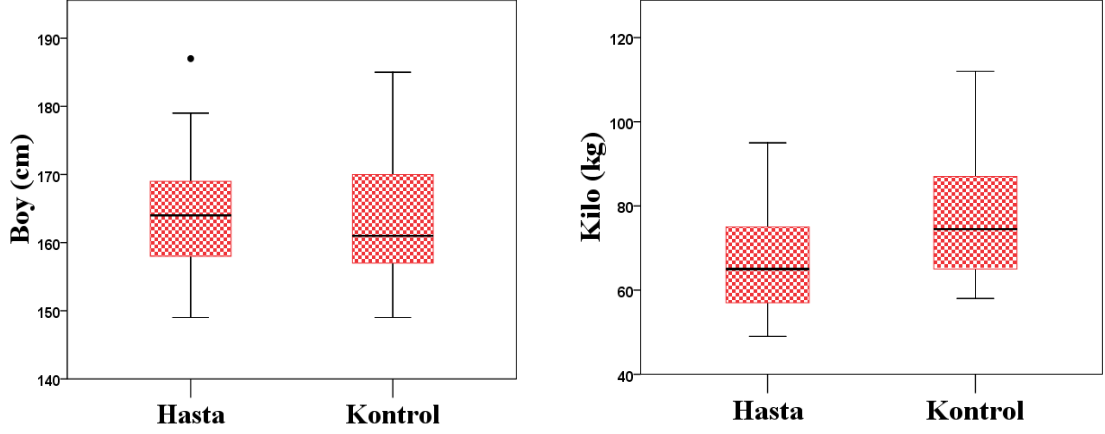
**Tablo 7:** Hasta ve kontrol grubunun inflamasyon ve oksidatif stres belirteçleri

GRUPLAR		N	Ort. ± S.S.	p
<b>FETUIN-A</b> (ng/mL)	<i>Hasta</i>	35	8,2 ± 10,8	< <b>0.001</b> <sup>(n.p)</sup>
	<i>Kontrol</i>	35	0,91 ± 0,09	
<b>TNF</b> (ng/mL)	<i>Hasta</i>	35	0,032 ± 0,028	< <b>0.05</b> <sup>(n.p)</sup>
	<i>Kontrol</i>	35	0,021 ± 0,015	
<b>IL6</b> (ng/mL)	<i>Hasta</i>	35	0,089 ± 0,043	<b>a.b.</b>
	<i>Kontrol</i>	35	0,084 ± 0,024	
<b>NO</b> (ng/mL)	<i>Hasta</i>	35	25,3 ± 4,8	< <b>0.001</b>
	<i>Kontrol</i>	35	41,4 ± 7,4	
<b>MPO</b> (ng/mL)	<i>Hasta</i>	35	6,42 ± 4,54	< <b>0,05</b> <sup>(n.p)</sup>
	<i>Kontrol</i>	35	4,34 ± 1,58	
<b>G6PD</b> (U/gr Hb)	<i>Hasta</i>	35	7,13 ± 2,62	< <b>0.001</b>
	<i>Kontrol</i>	35	5,05 ± 1,3	
<b>MDA</b> (µmol/gr Hb)	<i>Hasta</i>	34	0,081 ± 0,023	< <b>0.001</b>
	<i>Kontrol</i>	34	0,046 ± 0,011	
<b>SOD</b> (U/gr Hb)	<i>Hasta</i>	33	901,1 ± 121,4	< <b>0.01</b>
	<i>Kontrol</i>	34	733,7 ± 95,9	
<b>CAT</b> (k/gr Hb)	<i>Hasta</i>	33	1004,3 ± 335,7	<b>a.b.</b>
	<i>Kontrol</i>	34	1112,4 ± 310	
<b>GSH-Px</b> (U/gr Hb)	<i>Hasta</i>	34	18,1 ± 12,2	< <b>0,05</b> <sup>(n.p)</sup>
	<i>Kontrol</i>	34	12,6 ± 11,3	
<b>CRP</b> (mg/L)	<i>Hasta</i>	35	18,1 ± 12,2	< <b>0,01</b> <sup>(n.p)</sup>
	<i>Kontrol</i>	35	12,6 ± 11,3	

**(a.b)** %95'lik güven aralığında istatistiksel anlamlılık bulunmadı (p>0,05).

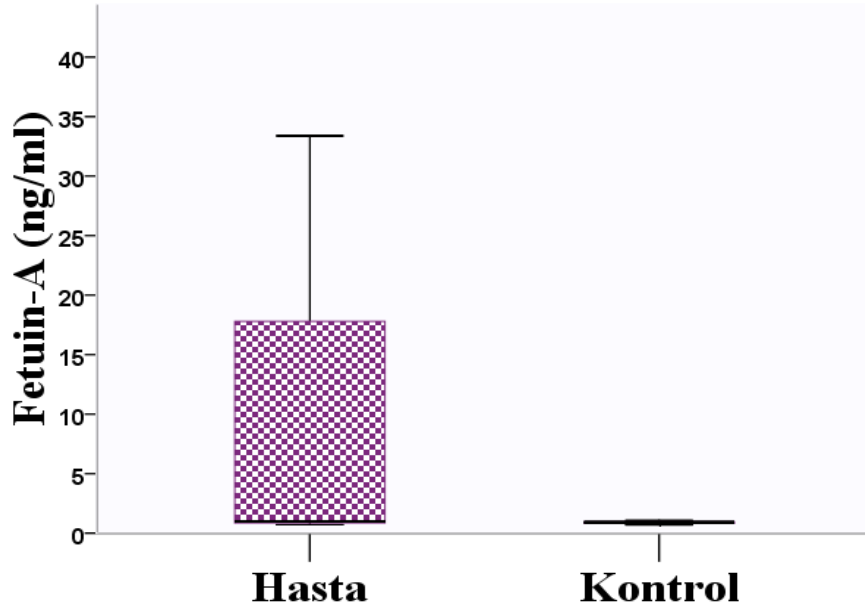
**(n.p)** parametrik olmayan Mann-Whitney U Testi uygulandı.

WBC ise Orak hücre anemili hastalarda anlamlı olarak yüksek tespit edildi ( $p<0.05$ ). MCV, MCH ve MCHC açısından bir farklılık tespit edilmedi. Kontrol ve hasta grubuna ait hematolojik veriler Tablo 5’de; bu verilerin dağılımı Şekil 14’de verilmiştir.

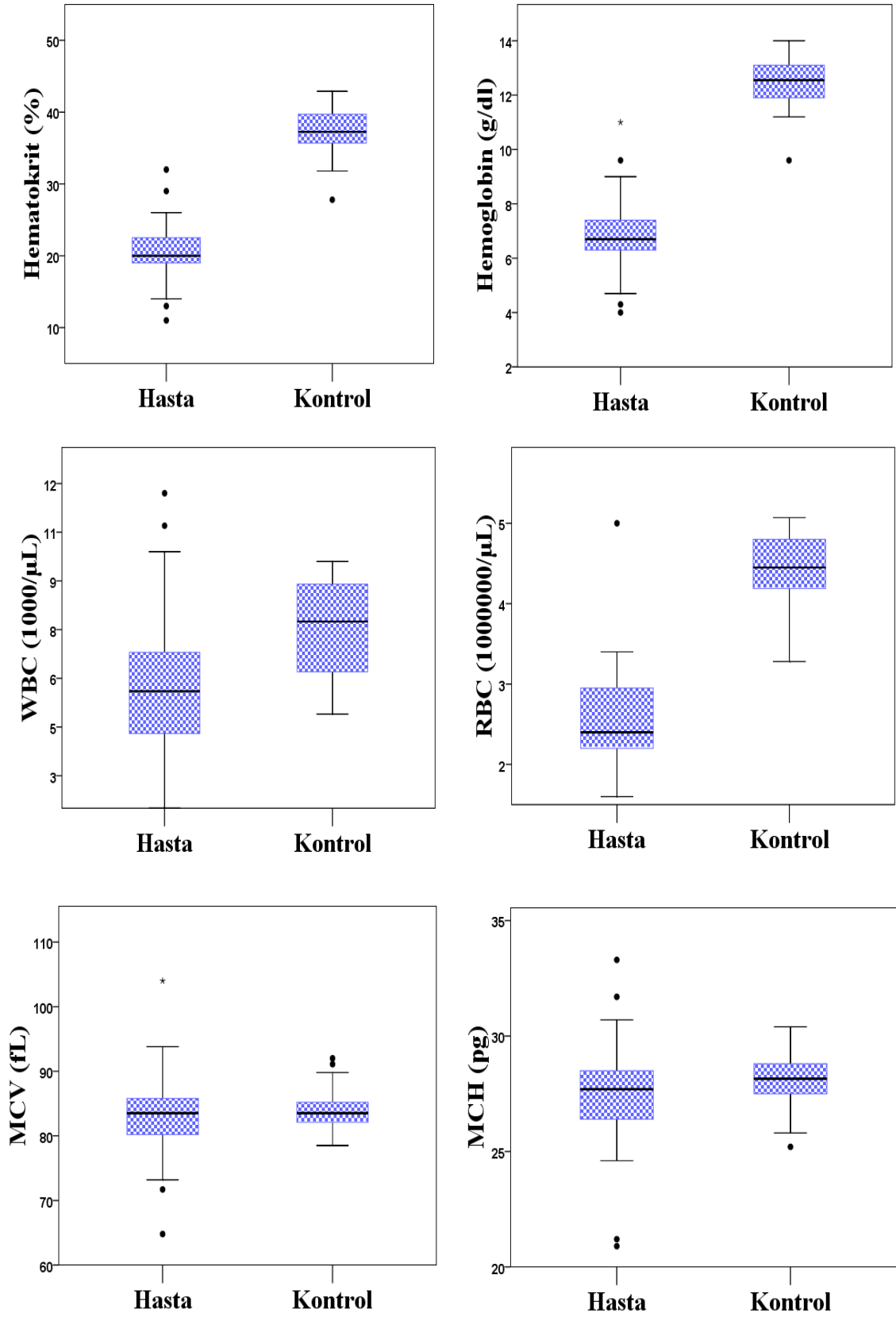


Şekil 12: Hasta ve kontrol grubun demografik verilerin dağılımı

Fetuin-A verileri açısından kıyaslandığında OHA grubunda Fetuin-A seviyeleri kontrol grubuna göre oldukça yüksek tespit edildi ( $p<0,001$ ). Fetuin-A'nın gruplara göre verilerinin dağılımı Şekil 13'te verilmiştir.

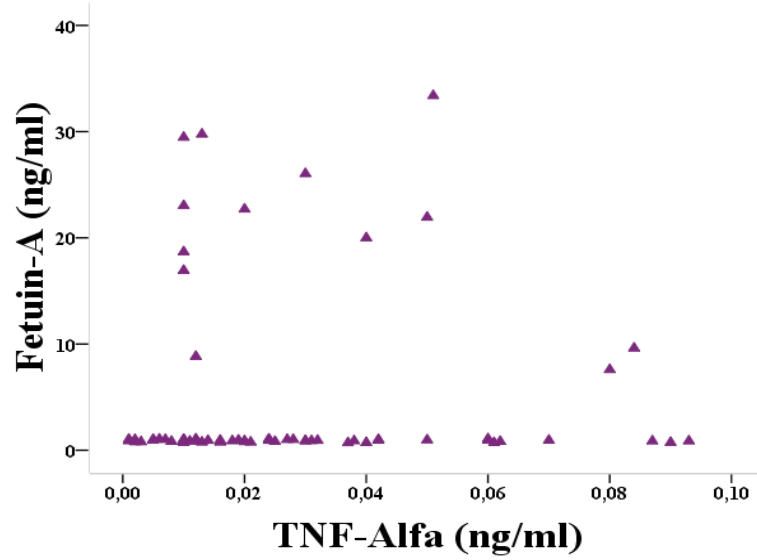


Şekil 13: Fetuin-A verilerinin gruplara göre dağılımı

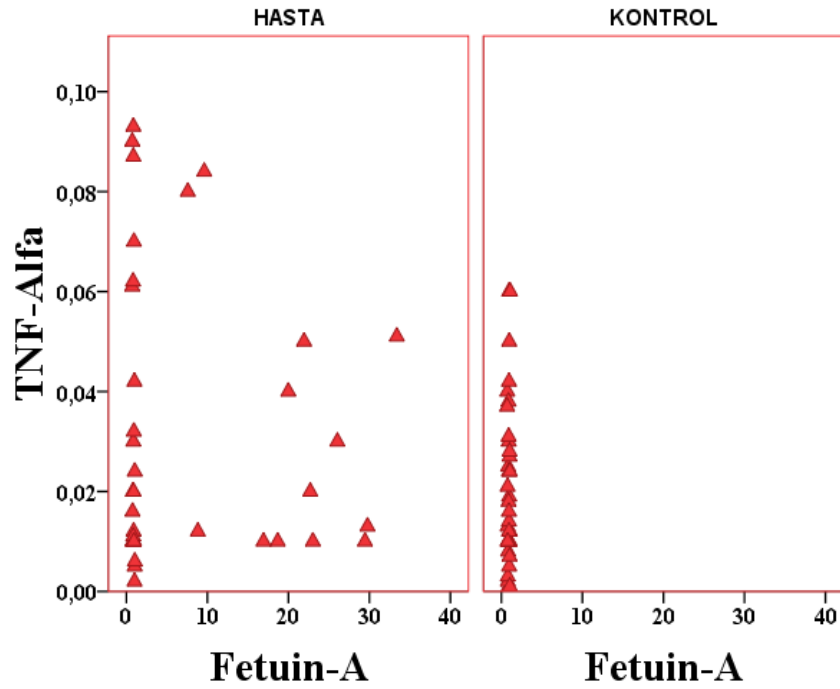


Şekil 14: Hasta ve kontrol grubun hematolojik verilerin dağılımı (Boxplot grafik)

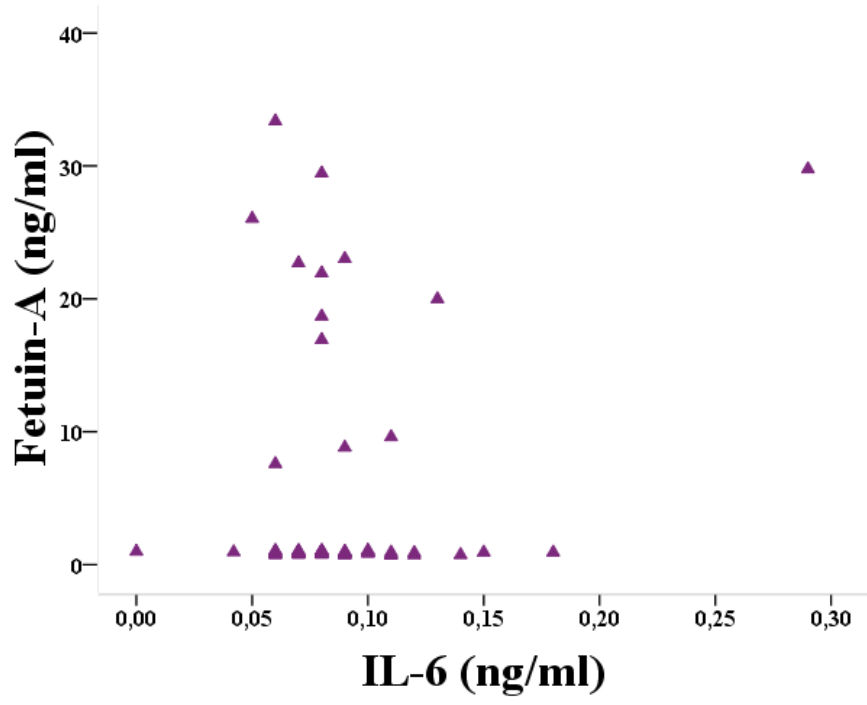
Fetuin-A'nın değerleri ile inflamatuvar belirteçlerden TNF-alfa ve IL-6 değerleri arasında yapılan Pearson korelasyon analizine göre TNF-alfa, IL-6 ve Fetuin-A arasında herhangi bir korelasyon tespit edilmedi (Tablo 6). Fetuin-A'ya göre verilerin inflamatuvar belirteçlerle olan dağılımı Şekil 15 ve Şekil 16' da gösterilmiştir.



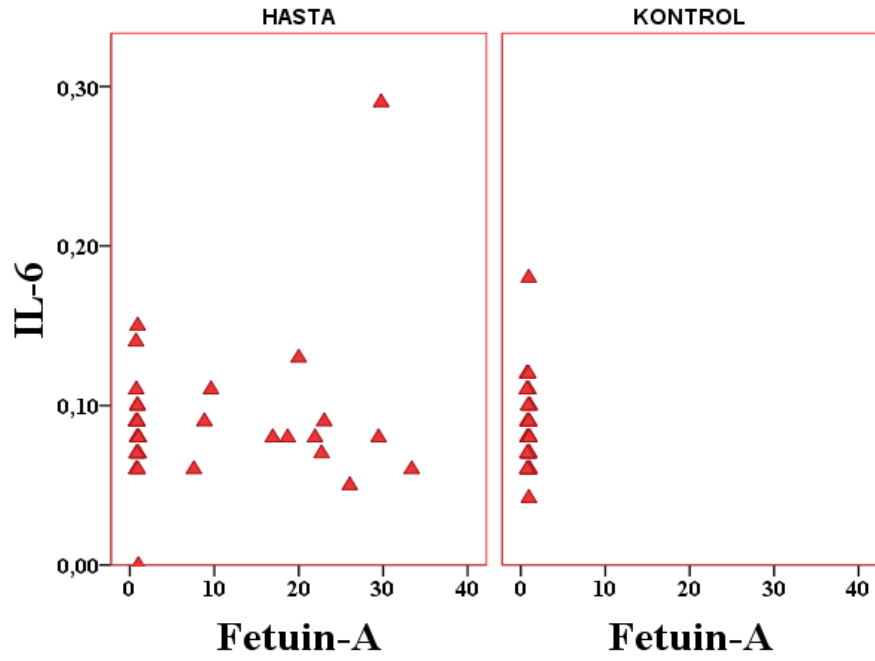
Şekil 15: Fetuin-A verilerinin TNF-Alfa'ya göre dağılımı



Şekil 16: Fetuin-A ve TNF-Alfa'nın OHA ve Kontrol gruplarına göre dağılımı

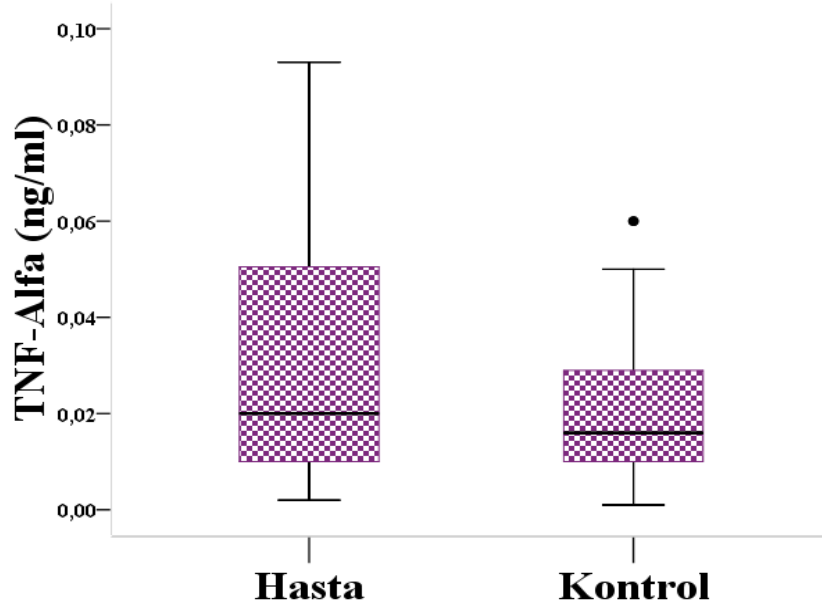


Şekil 17: Fetuin-A verilerinin IL-6'ya göre dağılımı

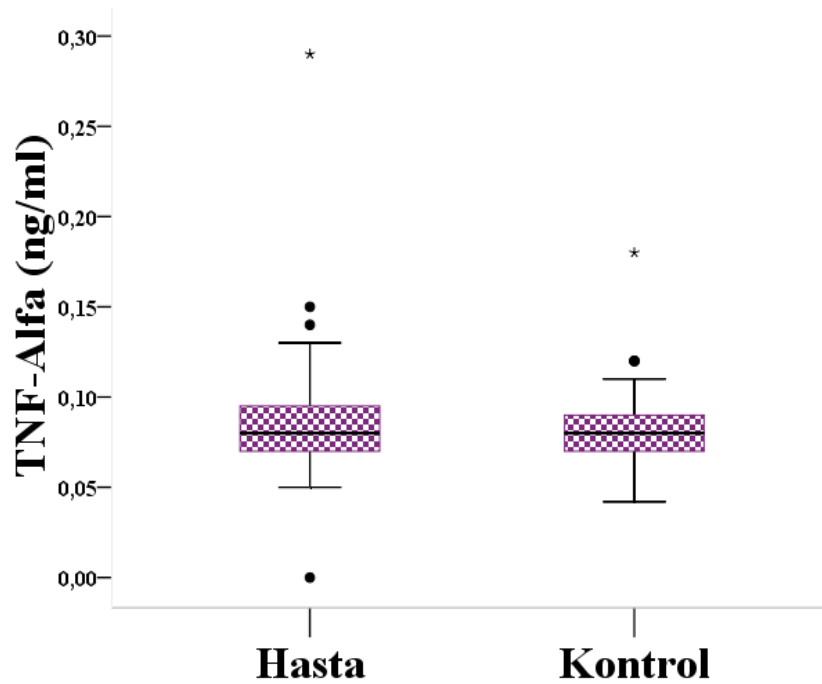


Şekil 18: Fetuin-A ve IL-6 verilerinin OHA ve Kontrol gruplarına göre dağılımı

TNF-Alfa verileri açısından kıyaslandığında OHA grubunda TNF-Alfa seviyeleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek tespit edildi ( $p<0,05$ ). IL-6 seviyelerinde ise gruplar arası anlamlı farklılık tespit edilmedi. TNF-Alfa ve IL-6'nın gruplara göre verilerinin grafiksel dağılımı Şekil 19 ve Şekil 20'de verilmiştir.

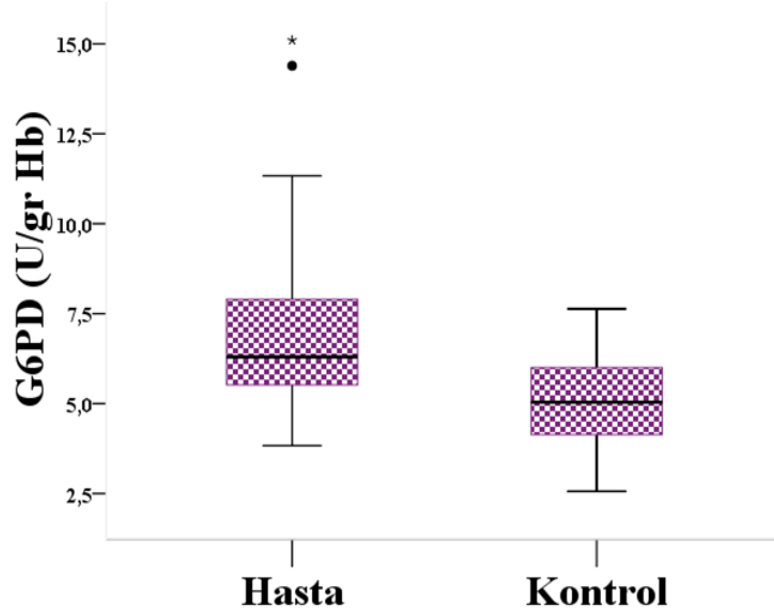


Şekil 19: TNF-Alfa verilerinin gruplara göre dağılımı ( $p<0,05$ )



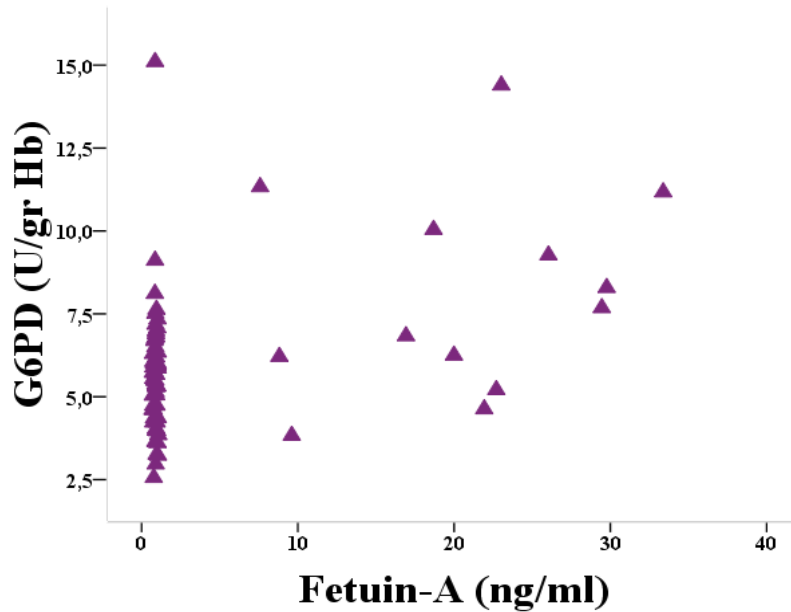
Şekil 20: IL-6 verilerinin gruplara göre dağılımı ( $p>0,05$ )

Gruplar, G6PD enzim aktivitesi açısından kıyaslandığında OHA grubunda G6PD aktivitesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak çok yüksek tespit edildi ( $p<0,001$ ).

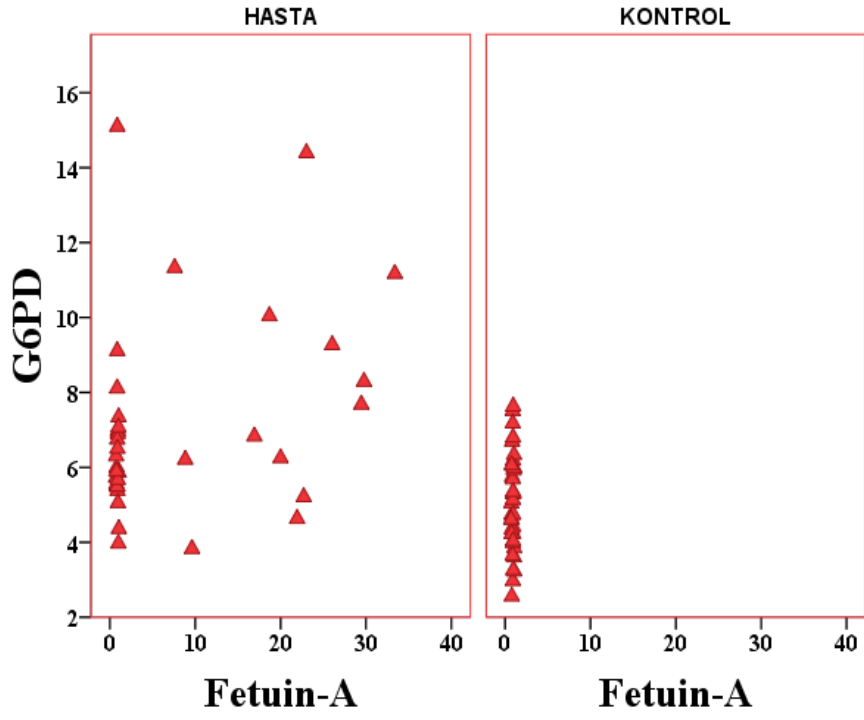


Şekil 21: G6PD enzim aktivitesinin gruplara göre dağılımı ( $p<0,001$ )

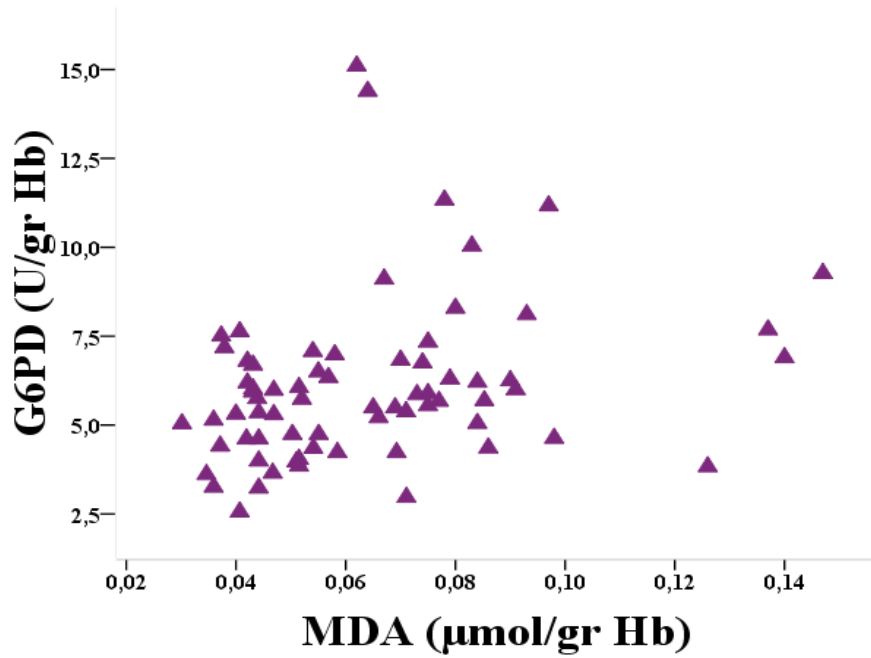
G6PD, Fetuin-A ve MDA arasında yapılan Pearson bivariate bağlantı analizinde; hem Fetuin-A ( $r:0,435$ ;  $p<0,001$ ) hem de MDA'da ( $r:0,547$ ;  $p<0,01$ ), G6PD ile pozitif yönlü korelasyon varlığı tespit edildi.



Şekil 22: G6PD ile Fetuin-A arasında noktasal ortak veri dağılım grafiği

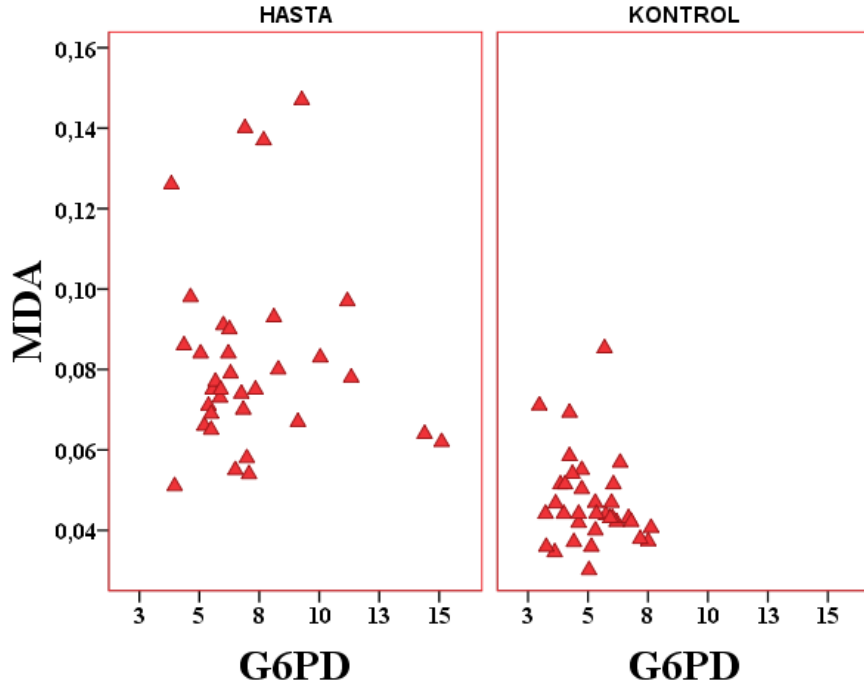


Şekil 23: Fetuin-A ve G6PD verilerinin OHA ve Kontrol gruplarına göre dağılımı



Şekil 24: G6PD ile Fetuin-A arasında noktasal ortak veri dağılım grafiği





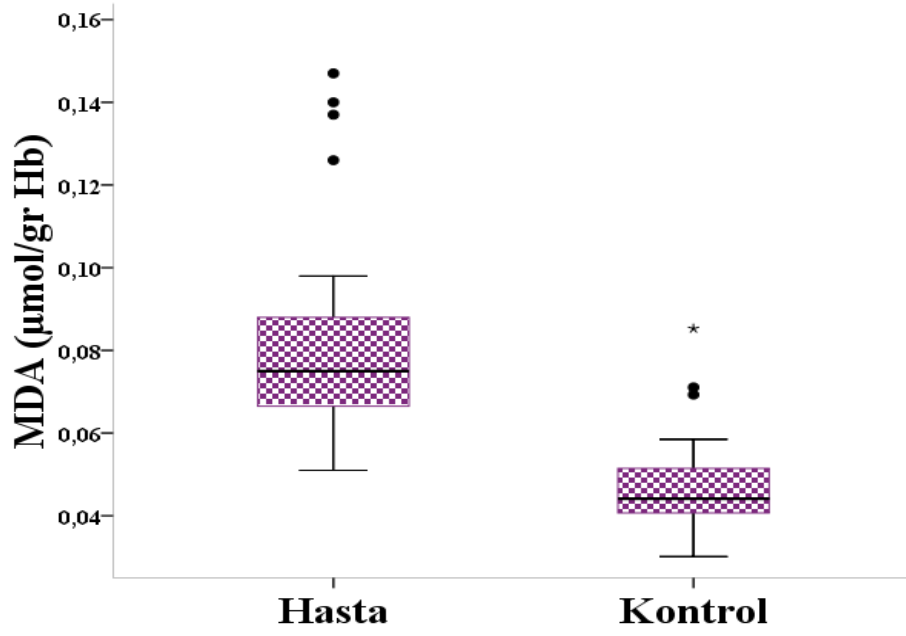
Şekil 25: MDA ve G6PD verilerinin OHA ve Kontrol gruplarına göre dağılımı

Fetuin-A, TNF-Alfa, IL-6, G6PD ve MDA sonuçlarının Kontrol ve OHA gruplarına göre verilerin istatistiksel dağılımını gösteren grafikler Şekil 16, 18, 23, 25 ve 26’ da verilmiştir.

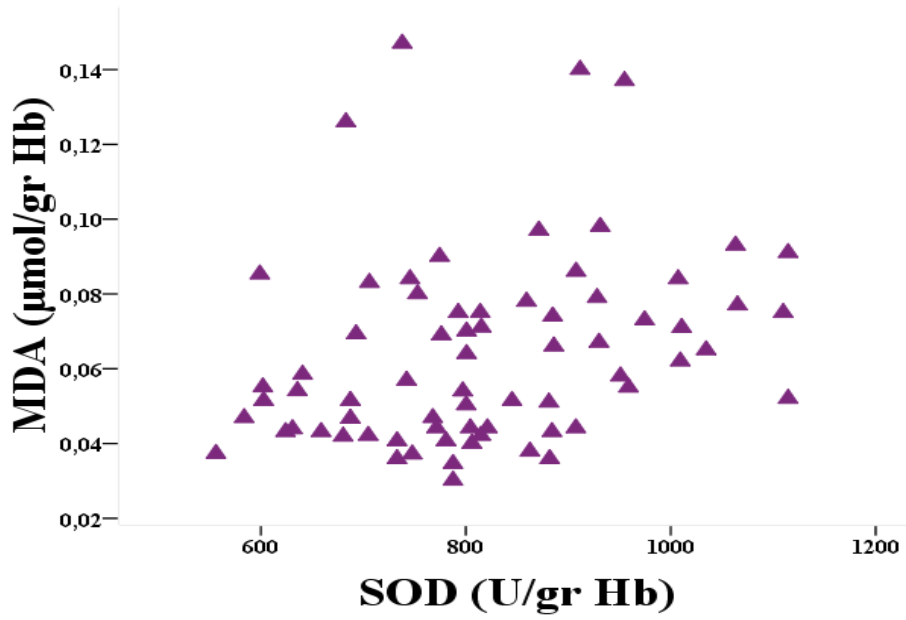
G6PD enzim aktivitesinin gruplara göre dağılımı Şekil 21’de; bu parametrenin MDA ve Fetuin-A ile olan noktasal ortak veri dağılım grafiği Şekil 22 ve Şekil 24’de verilmiştir.

OHA ve Kontrol grupları, MDA seviyeleri açısından kıyaslandığında OHA grubunda MDA seviyeleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak çok yüksek tespit edildi ( $p<0,001$ ).

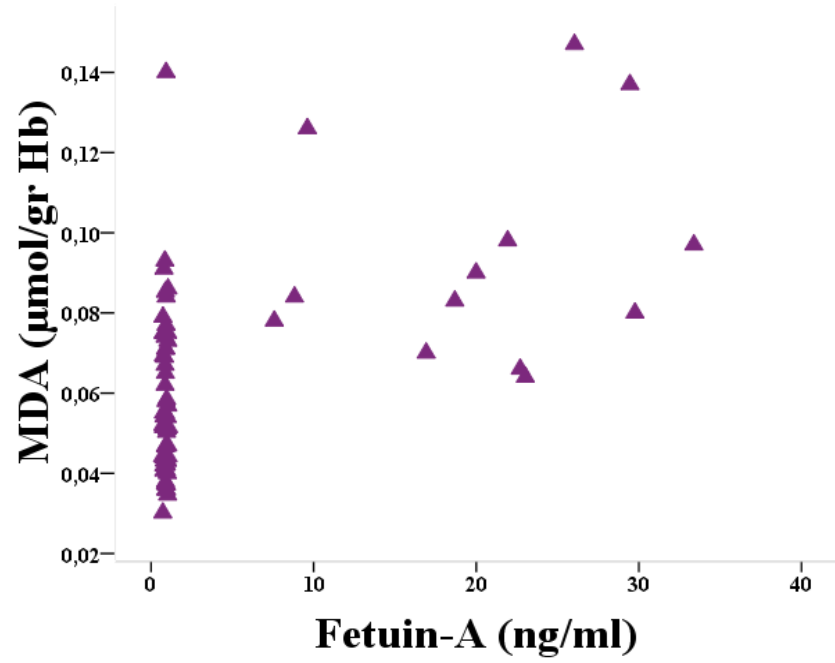
MDA, diğer parametrelerle arasında yapılan Pearson bivariate bağıntı analizinde; Fetuin-A ( $p<0,001$ ), G6PD ( $p<0,05$ ) ve SOD ( $p<0,05$ ) ile pozitif yönlü korelasyon varlığı tespit edildi. MDA seviyelerinin gruplara göre dağılımı Şekil 26’de; bu parametrenin SOD ve Fetuin-A ile olan noktasal (*scatter-plot*) ortak veri dağılım grafiği sırasıyla Şekil 27, 28 ve 29’da verilmiştir.



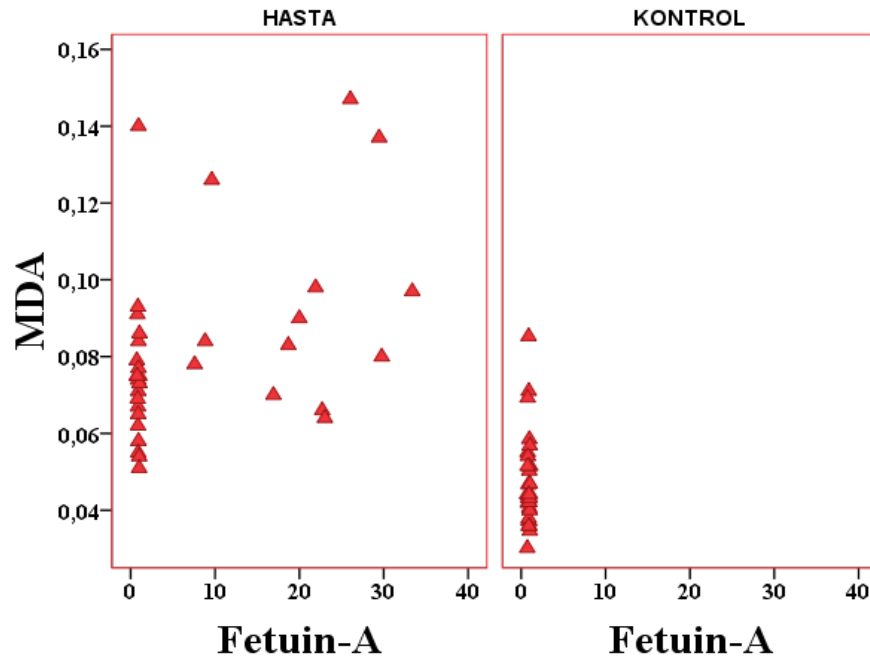
Şekil 26: MDA seviyelerinin gruplara göre dağılımı (p<0,001)



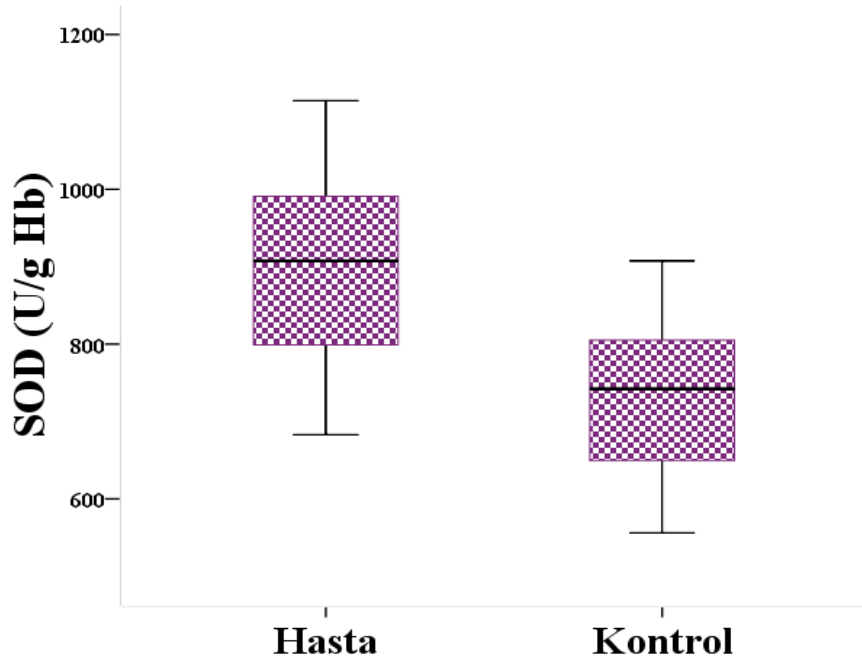
Şekil 27: MDA ile SOD noktasal ortak veri dağılım grafiği



Şekil 28: MDA ile Fetuin-A arasında noktasal ortak veri dağılım grafiği

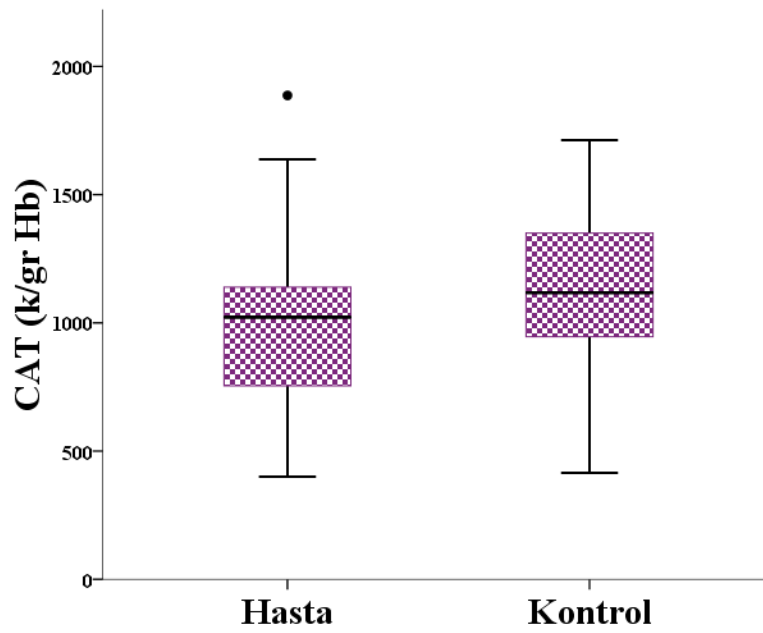


Şekil 29: MDA ve Fetuin-A'nın OHA ve Kontrol gruplarına göre dağılımı



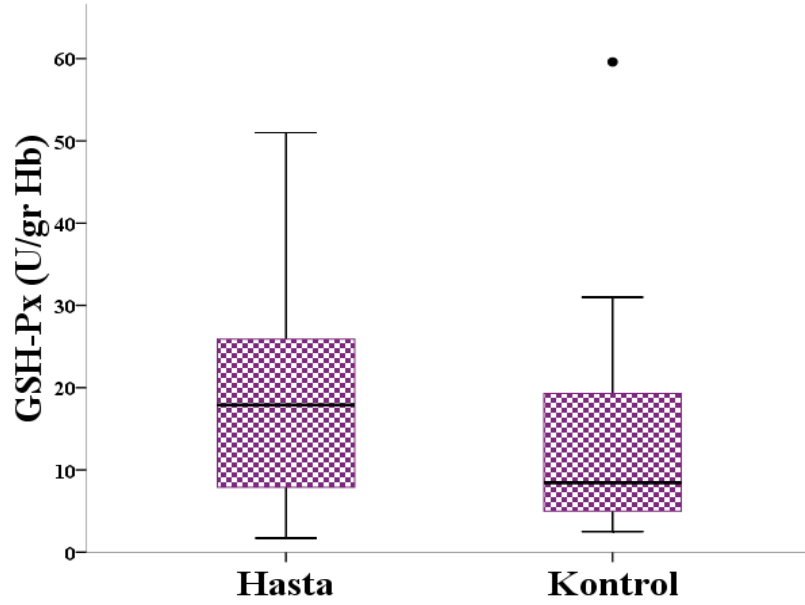
**Şekil 30:** SOD enzim aktivitesinin gruplara göre dağılımı ( $p < 0,01$ )

SOD enzim aktivitesi, OHA grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak oldukça yüksek tespit edildi ( $p < 0,001$ ). SOD'un daha önce belirtildiği üzere sadece MDA ile pozitif korelasyonu bulundu ( $p < 0,05$ ). SOD'un gruplara göre veri dağılım grafiği Şekil 30'da verilmiştir.



**Şekil 31:** CAT enzim aktivitesinin gruplara göre dağılımı ( $p > 0,05$ )

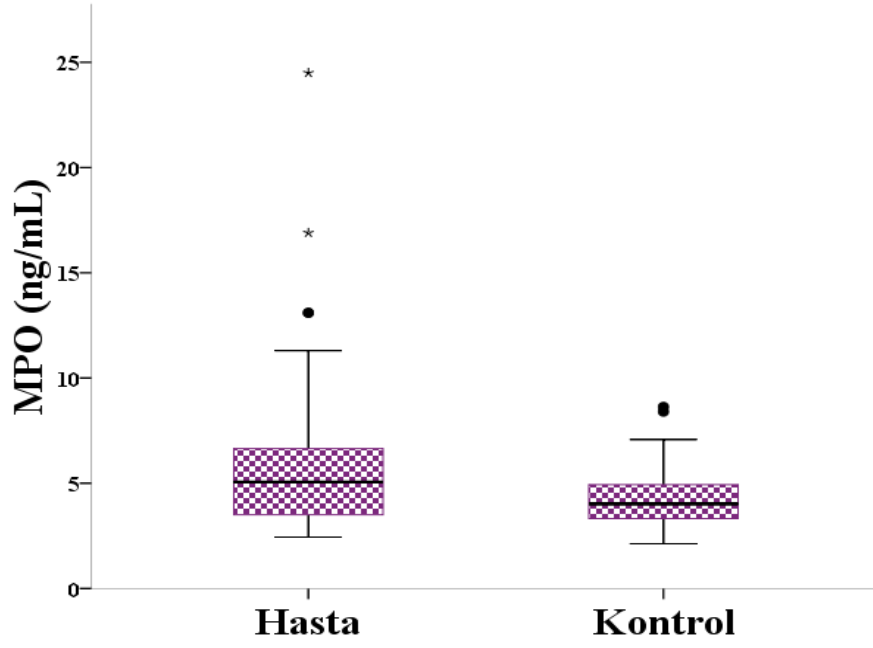
CAT aktivitesi gruplar açısından değerlendirildiğinde OHA ve Kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmezken GSH-Px enzim aktivitesinde OHA grubunda anlamlı yükseklik tespit edildi ( $p<0,05$ ). CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinin gruplara göre veri dağılım grafiği Şekil 31 ve Şekil 32’de verilmiştir.



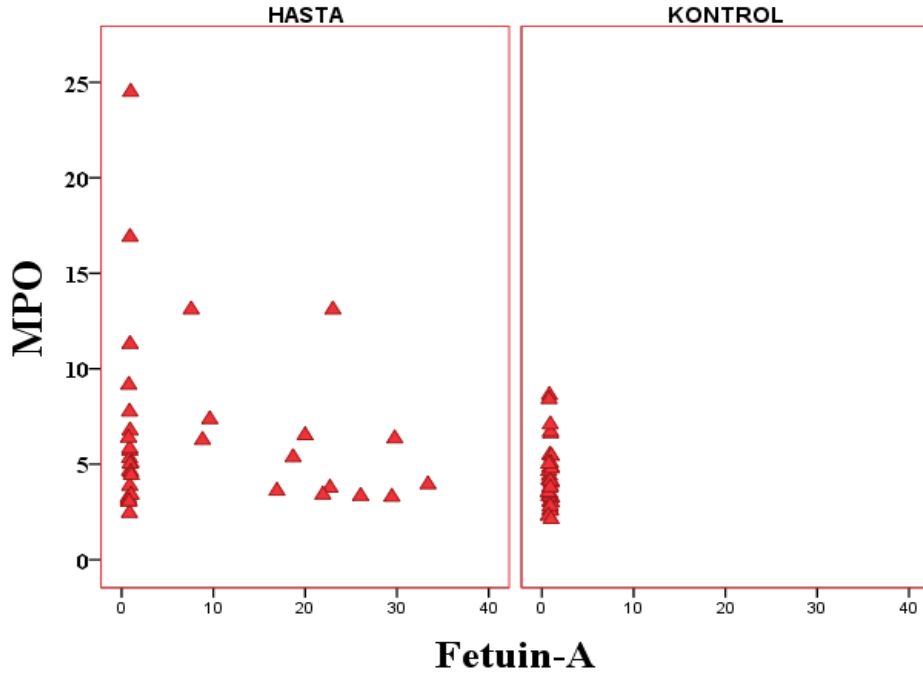
Şekil 32: GSH-Px enzim aktivitesinin gruplara göre dağılımı ( $p<0,05$ )

MPO seviyeleri, OHA grubunda kontrol grubuna anlamlı yükseklik tespit edildi ( $p<0,05$ ). MPO seviyelerine ait gruplara göre veri dağılım grafiği Şekil 33’de verilmiştir. MPO ile Fetuin-A arasında yapılan Pearson bivariante bağıntı analizinde korelasyon bulunmadı (Şekil 34).

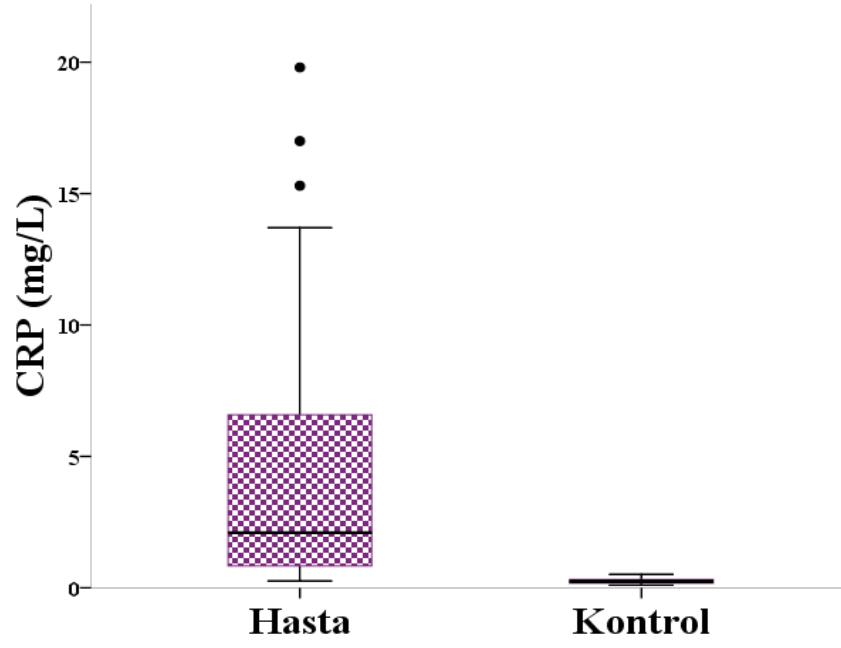
CRP seviyeleri değerlendirildiğine, OHA hasta grubunda CRP seviyeleri kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek tespit edildi. CRP ile Fetuin-A arasında yapılan Pearson bivariante bağıntı analizinde ise herhangi bir korelasyon tespit edilmedi (Şekil 35, 36).



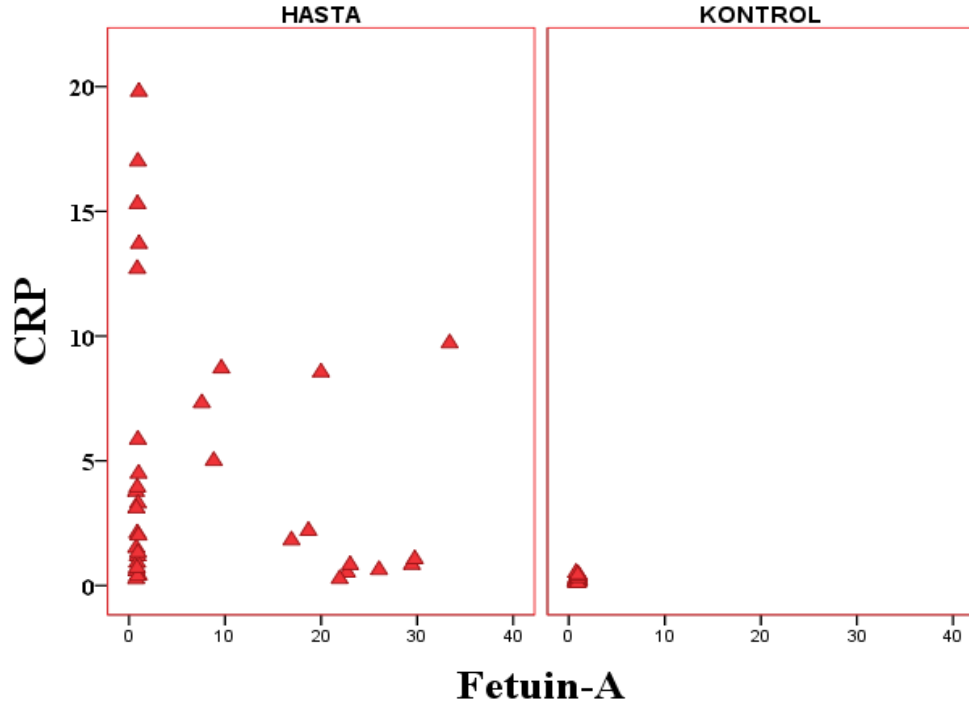
Şekil 33: MPO seviyelerinin gruplara göre dağılımı ( $p < 0,05$ )



Şekil 34: MPO ve Fetuin-A verilerinin OHA ve Kontrol gruplarına göre dağılımı



Şekil 35: CRP seviyelerinin gruplara göre dağılımı ( $p < 0,01$ )



Şekil 36: CRP ve Fetuin-A verilerinin OHA ve Kontrol gruplarına göre dağılımı

## 5. TARTIŞMA

Orak hücre anemisi, Çukurova bölgesinde yaygın görülen eritrositlerde aşırı reaktif oksijen radikali üretimi, vasküler seviyede kronik inflamasyona sebebiyet veren mikrovasküler hipoksik ve reperfüzyon süreci ile karakterize olan konjenital bir hemoglobinopatidir (324, 325). Sağlıklı bireylerin eritrositlerindeki antioksidan koruma sistemleri, meydana gelebilecek bazal ROS değişimlerinden olumsuz yönde etkilenmemektedir (313). Ancak, OHA hastalarında görülen aşırı ROS üretimi (114, 326), HbS'in oto-oksidasyonu (123), hem demirinin salınması (327), artmış asimetrik dimetilarjinin (328, 329) ve azalmış NO seviyeleri sebebiyle bu durum değişmektedir (330). OHA'daki ROS savunma sistemlerinin etkilenmesi sonucu meydana gelen kronik oksidatif stres durumu, vasküler endotelial disfonksiyon, inflamasyon ve çoklu organ hasarı için kritik öneme sahiptir (331, 332).

Hebbel ve arkadaşları (122, 123), yaptıkları iki çalışmada Orak hücre anemili hastalarda oksijen varlığında Hemoglobins'in normal Hemoglobine (HbA) kıyasla artmış oto-oksidasyon hızına sahip olduğunu gösterdi. OHA hastalarının eritrositlerinde süperoksit ve hidroksil radikallerini yüksek tespit ettiler. Aslan ve arkadaşları (78, 115, 121, 333), Orak hücre anemili hastaların eritrositlerinde artmış lipid peroksidasyonunu gösterdiler. Amer ve arkadaşları (334, 335) tarafından yapılan benzer iki çalışmada da bizim sonuçlarımızda olduğu gibi oksidatif hasarın göstergelerinden olan MDA seviyeleri, OHA hastaların eritrositlerinde kontrol grubuna göre yüksek tespit edildi.



Literatürde birçok çalışmada, Orak hücre anemisinde oksidatif hasarı gösteren biyomarkerların artmış olduğu gösterildi (47, 78, 158, 159, 336). Repka ve Hebbel (122, 337), Orak hücre hemoglobininin (HbS) eritrosit membranına tutunduğu ve bir Fenton reaktifi gibi davranarak süperoksit ve hidroksil radikali gibi oksidant ajanların üretimini arttırdığı tespit etti. Bunun yanı sıra Hemoglobin S'in aşırı oto-oksidasyonu ve denaturasyonu sonucu hücre membranında demir komplekslerinin birikimi meydana geldiği gösterildi (338).

Walter ve arkadaşları (58), demir komplekslerinin inflamasyonda artışa ve lipidleri içeren membranda oksidatif hasara sebebiyet verdiğini gösterdi. Benzer çalışmalarda, lipid peroksidasyonunun ve oksidatif stresin göstergesi olan Malondialdehyde (MDA) seviyeleri, Orak hücre anemisi hastalarının serum ve eritrositlerinde sağlık bireylere göre yüksek tespit edildi (339-341). Ayrıca, Jain ve arkadaşlarının yaptığı çalışma (284), MDA'nın eritrosit membranında kümelenmesi sonucu membrandaki fosfolipidlerin organizasyonunu bozduğunu ve oksidatif hasarın şiddetini arttırdığını gösterdi. Çalışmamızda, eritrositlerde MDA seviyelerinin literatürle örtüşen şekilde anlamlı olarak yüksek çıkması OHA'da oksidatif stresin meydana getirdiği peroksidasyon hasarının açık bir göstergesidir.

Orak hücre anemisinde meydana gelen bazal ROS miktarındaki artışa ek olarak eritrosit içi anti-oksidan mekanizmalarda gerileme meydana gelir. ROS'a karşı dengeleyici role sahip SOD, CAT ve GSH-Px gibi anti oksidan enzimler olumsuz etkilenirler (342). Bazı çalışmalarda CAT ve GSH-Px aktiviteleri azalırken (332), SOD aktivitesinde artış gösterilmiştir (340, 343). Das ve Nair tarafından yapılan bir çalışmada (343), SOD'daki bu artışın oksidatif stres ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyelerindeki artışa cevap olarak meydana geldiği sonucuna varıldı. Schacter ve arkadaşları farklı bir çalışmada (332), sağlıklı bireylerde SOD aktivesinin OHA'lı bireylere göre yüksek olduğunu ve hastalığın şiddeti ile ters orantılı olarak düşüş gösterdiğini tespit etti. Bu azalmayı oksijen radikallerinin ortadan kaldırmak için SOD'un tüketilmesi şeklinde yorumladı (54). Bizim çalışmamızda, Das ve Nair tarafından yapılan çalışmaya benzer olarak SOD seviyeleri OHA hasta grubunda sağlıklı bireylere kıyasla yüksek tespit edildi. SOD aktivitesindeki bu artışın OHA hastalarındaki ROS artışını kompanse etmek için meydana geldiği düşünmekteyiz.

Normal koşullarda, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH-Px ve CAT enzimleri ile iki farklı yolla ortadan kaldırılır. Bu iki enzimin seviyelerinde azalma olması durumunda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ortamdaki yeteri kadar temizlenemez (78, 121). Morris ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (344), eritrositlerde GSH ve GSH-Px miktarlarını düşük bulmalarını aşırı tüketime bağlı olduğunu yorumladılar. Bizim çalışmamızda ise bu çalışmadan farklı olarak OHA grubunda eritrosit GSH-Px aktivesi anlamlı olarak yüksek tespit edildi. Bu yüksekliği SOD yüksekliğine benzer şekilde ortamdaki oksidanların artışı kopmanse etmek için meydana geldiğini düşünmekteyiz.

Orak hücre anemisinde oksidatif stresle ilgili olarak lipit peroksidasyon ürünü olan MDA'nın artışına dair literatürde benzer çalışmalar olmasına rağmen antioksidan enzimler olan SOD, CAT ve GSH-Px için birbirinden farklı sonuçlara rastlanmaktadır. Dasgupta ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada CAT aktivitesini OHA grubunda düşük bulurken Das and Nair yüksek tespit etmişlerdir (343). Dasgupta, Katalazdaki bu artışı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin temizlenmesi için enzim aktivitesinin arttığı şeklinde yorumlarken, Das ve Nair azalmayı oksidatif stresin aşırı artmasına bağlı enzimin tükenmesi şeklinde yorumlanmıştır. Bizim çalışmamızda, CAT aktivitesinde hasta grubunda kontrolle arasında fark olmaması, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin temizlenmesinde GSH-Px'in daha etkin rol oynadığını desteklemektedir.

Glutasyon Peroksidaz, hidrojen peroksiti yıkarken ortamdaki GSH'yı okside disülfid formuna (GSSG) dönüştürür (345, 346). Bu form, NADPH varlığında glutasyon redüktaz tarafından tekrar redükte formuna indirgenir (347). Redükte glutasyon (GSH), GSH-Px'in çalışması için gerekli substrattır. Çalışmamızda, G6PD'nin OHA hastalarda kontrol grubuna göre yüksek olması, NADPH miktarının OHA grubunda arttırıldığını ve dolaylı olarak glutasyon redüktaz aktivitesini arttırarak GSH miktarındaki artışa katkıda bulunmuş olabilir. Artan GSH da GSH-Px'in aktivitesinin artmasına neden olabileceğini düşünmekteyiz. Biz, çalışmamızda hem GH-Px hem de G6PD aktivitesinin artmış olarak tespit ettik.

Yine dolaylı olarak gl G6PD'nin hidrojen peroksitin parçalanmasında GSH-Px'e NADPH kaynağı sağlamak için arttığını göstermektedir. G6PD'nin NADPH'nin kaynağı olarak işlev görmesi aslında oksidanlara karşı hücrenin verdiği cevapta OHA hastalarında da ne denli önemli bir enzim olduğu görüşünü

desteklemektedir.

Orak hücre aneminin vasküler sistemine özgü oksidanların bir kısmı, nitrik oksit kaynaklı oksidan ajanlar (348), endotelial NADPH oksidaz (131) ve ksantin oksidazdan oluşmaktadır (114, 115, 349). Reiter ve arkadaşları (350), hemoliz sonucu artmış olan oksidanlar ve intravasküler hemoglobin, Orak hücre anemisindeki nitrik oksidin tüketimine katkıda bulunduğunu gösterdi. Aslan ve arkadaşları (114, 115, 333), bu durumun azalan nitrik oksit hemodinamik stabilitenin bozulması ile sonuçlandığını ve antioksidan kapasitede ciddi bir azalmaya sebebiyet verdiğini gösterdi.

Oraklaşma süreci, vasküler oklüzyon, doku hipoksisi ve buna bağlı reperfüzyon hasarına yol açarak inflamasyona ve endotel hasarını indüklemektedir (124, 351). Bu durum, Nitrik Oksit (NO) sentez inhibisyonuna sebep olmaktadır (311, 352). NO, adhezyon moleküllerinin endotelial ekspresyonunu azaltarak, platelet aktivasyonunu düşürerek, fibroblastları ve endotelial hücre proliferasyonunu inhibe ederek vasküler hemoostazı sağlamada çok önemli bir ajandır (353, 354). NO, vasküler yapıda gevşemeyi sağlayacak önemli bir faktördür ve yokluğu büyük arterlerde esneklik kaybına sebep olacaktır (333). Yapılan çalışmalarda OHA'da NO seviyeleri kriz döneminde serbest Hem'in artışı ve L-arjininin tüketilmesi ile azaldığı gösterilmiştir (114, 355-359). Çalışmamızda, Orak hücre anemili hastaların serumlarındaki Nitrik oksit seviyeleri düşük bulunmuştur.

Eiserich ve ark. (360), nötrofilden köken alan ve Hem içeren MPO'nun, katalitik olarak direk bir şekilde Nitrik oksiti tüketerek ve orta seviyede radikal üreterek Nitrik oksitin biyoaktivitesini düzenlediğini; böylece vazomotor fonksiyonu olumsuz yönde etkilediğini gösterdiler. Baldus ve arkadaşları (361), Orak hücre anemili hastaların akciğer dokusu üzerinde yaptıkları çalışmada, MPO'nun alveolar epitel boyunca artmış seviyelerinin bu hastalarda görülen pulmoner hipertansiyon ve akut göğüs sendromunun oluşmasına katkıda bulunduğunu gösterdiler. Çalışmamızda, bu çalışmalara benzer şekilde Orak hücre anemili hastaların kanında tespit edilen yüksek MPO seviyeleri literatürdeki çalışmaların sonuçlarını desteklemektedir.

Dolaşımdaki lökositlerin kan akımın merkezinden damar endoteline doğru olan migrasyonu (362), doku makrofajlarından salgılanan IL-1, IL-6 ve tümör nekroz faktör-alpha (TNF- $\alpha$ ) gibi proinflamatuvar mediatörler tarafından indüklenmektedir (363). Orak hücre anemili hastaların endotel hücreleri, endotel hücre aktivasyona ait bu belirteçleri yüksek seviyelerde eksprese etmektedir (364). Orak hücre anemili hastalarda yapılan insan ve hayvan çalışmalarında, TNF-alfa, IL-6 ve L-10 gibi inflamatuvar markerlar dolaşımda normal seviyelerinin üzerinde bulunduğu görüldü (118, 365-368). Orak hücre anemili hastalarda makrofajlarının yanı sıra, monositler de TNF-a ve IL-6'nın artmış serum seviyelerine katkıda bulunmaktadır (77, 366, 369, 370). TNF-alfa ve IL-6, inflamatuvar bir patofizyolojiye sahip Orak hücre anemisi için çok önemli bir risk faktörüdür (371). Belcher ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (118), Orak hücre anemili hastaların dolaşımında bulunan uyarılmamış monositler sağlıklı bireylere göre daha fazla TNF-a ürettiği gösterilmiştir. Lanaro ve ark. (75), genel durumu durağan olan Orak hücre anemisi hastalarının dolaşımdaki TNF-alfa seviyelerini ve TNF-alfa'ya ait mRNA ekspresyonunu artmış olarak tespit ettiler. Pathare ve ark. (71, 372), da kriz durumundaki Orak hücre anemili hastalarda TNF-alfa konsantrasyonunu yüksek buldular. Çalışmamızda, TNF-alfa seviyeleri literatürler uyumlu olarak Orak hücre anemili hastalardaki inflamasyonun varlığına bağlı olarak kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek tespit edildi. Ancak, IL-6 seviyeleri iki grup arasında anlamlı farklılık göstermedi. TNF-alfa'daki yükseklik yapılan benzer çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olmasına karşın IL-6 sonuçlarımız Akohoue ve arkadaşlarının (77) yaptığı çalışmayla benzer özellikler göstermektedir. Ancak, Hilbert ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (373), yüksek CRP ve IL-6 seviyelerine karşın düşük IL-10, leptin ve monosit kemoreaktan protein-1 gibi farklı inflamatuvar profil tespit edildi. Bu durumu, OHA hastalarındaki kronik inflamasyona karşı oluşturulan farklı kompensasyon mekanizmalarının bir sonucu olduğu şeklinde yorumladılar.

Büyük kısmı makrofajlar ve T-hücrelerinde üretilen TNF-alfa (374), endotel aktivasyonu, inflamasyonun uyarılması, koagülasyon kaskadının indüksiyonu, ateş, akut faz reaktanlarının sentezi, nötrofillerin aktivasyonu ve endotel adhezyonu (375) gibi geniş bir proinflamatuvar etkinliğe sahip oldukça potent bir sitokindir (369). Hedo ve arkadaşları (376) ile Makis ve arkadaşları (79), TNF- $\alpha$  ve IL-6'nın karaciğer

hücrelerini de aktivite ederek alpha-1-antitripsin, seruloplazmin, alfa-2-makro globulin ve C-reaktif protein gibi serum akut faz reaktanlarının Orak hücre anemili hastalarda anlamlı olarak arttırdığını tespit ettiler. CRP, inflamasyonun bir belirteci olarak bazı kronik hastalıklarda prognoz ve relapsın tahmininde kullanılmaktadır (377). Çalışmamızda, OHA hastalarında CRP seviyeleri, Makis ve arkadaşlarının bulduğuna benzer şekilde kontrol grubuna göre yüksek tespit edildi.

Akut göğüs sendromu ve oraklaşma krizinde inflamatuvar bir sürecin varlığı daha önce gösterilmesine karşın (378), stabil durumdaki OHA hastalarında inflamasyon ve oksidatif stres ilişkisini ortaya koyan bir çalışma mevcut değildir. Akahoue ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, akut kriz hali olmaksızın stabil haldeki yetişkin Orak hücre anemili hastalarda düşük dereceli inflamasyonu ve artmış oksidatif stresi gösterdiler (77). Orak hücre anemili hastalarda oksidatif stresin indirekt göstergesi olan 2,3-dinor-5,6-dihydro-15-F2t-isoprostane (F2-IsoPM) seviyelerini ve proinflamatuvar sitokinleri yüksek tespit ettiler. Yüksek tespit edilen CRP seviyeleri ile Orak hücre anemisinde kriz hali olmadan gizli bir inflamatuvar sürecin varlığını işaret etmekte olduğunu öne sürdüler. Orak hücre anemisinin anormal seviyede yüksek lökosit sayısına bağlı olarak ortaya çıkan inflamatuvar bir durumla karakterize olduğunu gösterdiler (77). Ancak antioksidanları da beraber değerlendirmedikleri için F2-IsoPM'deki artışın gerçekten artmış oksidatif stresten mi yoksa azalmış antioksidan cevaptan mı olup olmadığını ispat edemediler. Hibbert ve arkadaşları ise farklı bir çalışmada Orak hücre anemili çocuk yaş grubu hastalarda inflamasyonu ve bunun hipermetabolizma ile olan ilişkisinin varlığını gösterdiler (373). Çalışmamızda, Akohoue ve Hilbert'in çalışmalarıyla uyumlu olarak OHA'da oksidatif stresin direk göstergesi olan MDA ve akut inflamatuvar belirteç olan TNF yüksek bulundu.

Fetuin-A, karaciğerden sentezlenen bir protein olup insulin direncinin önemli bir mediatörü ve vasküler kalsifikasyona karşı koruyucu etkiye sahip bir molekül olduğu yakın zamanda yapılan çalışmalarla kanıtlandı (379). Bugün birçok vasküler paterni bulunan hastalıkta etyopatogenezdaki rolü araştırılan Fetuin-A aterosklerozun oluşum ve kronikleşme mekanizması üzerinde durulmaktadır (380-384).

Fetuin-A molekülünün yüksek seviyelerinin diabetli hastalarda meydana gelen aterosklerozda vaskülopatide iyi prognozun bir işareti olabileceği üzerinde durulmaktadır (381, 382). OHA hastalarında da benzer şekilde ileri evrede vasküler seviyede ateroskleroz meydana geldiği daha önce birçok çalışmada gösterildi (385-389). Fetuin-A ile vaskülopati arasındaki ilişki düşünüldüğünde, OHA hastalarında ileri dönemde meydana gelebilecek bir vaskülopatinin değerlendirilmesinde Fetuin-A çok değerli bir parametre olabilir.

Renal yetmezlikli hastalarda, hastalığın ileri evrelerinde vasküler kalsifikasyonun meydana gelmesi ve prognozunda inflamatuvar sürecin önemini gösteren çalışmalar yanında, Fetuin-A'nın bu sürece olan etkisinin yapıldığı yeni çalışmalar mevcuttur (390-393). Bu hasta grubundaki farklı çalışmalarda, Fetuin-A'nın yüksek seviyelerinin vasküler kalsifikasyona karşı koruyucu etkiye sahip olduğu ve inflamatuvar süreçle ters yönde işlev yaptığı gösterildi (103, 394-397). Bu çalışmalarda, organizmanın hastalığın periferik vasküler sistemde yapacağı negatif etkiye yüksek Fetuin-A seviyeleri ile cevap verdiğini göstrenen kanıtlar bulundu.

Patogenezine, vasküler seviyede kronik inflamasyon ve oksidatif stresin eşlik ettiği OHA'da, Fetuin-A vasküler seviyedeki inflamasyonun ve hasarın prognozunda etkin bir rol oynuyor olabilir. Yaptığımız çalışmada, Fetuin-A'nın Orak hücreli anemli hastalarda sağlıklı hastalara göre yüksek tespit edilmesi OHA'lı hastalardaki vasküler inflamasyonun meydana getirdiği hasara cevap olarak yükseldiğini düşündürmektedir.

Hastaların bir kısmında Fetuin-A'nın aşırı yüksek, bir kısmında ise kontrol grubuyla yakın seviyelerde tespit ettik. Fetuin-A'nın hasta grubu içindeki farklı değerleri, OHA hastalarında vaskülopatinin her hastada farklı seviyede olabileceğini ve remisyon döneminde bu değişken vaskülopatiyeye cevaben bazı hastalarda yüksek Fetuin-A düzeyleri vaskülopatiyeye karşı oluşan kompensasyon mekanizmasını düşündürmektedir. Fetuin-A ile MDA ve TNF-a arasında korelasyon varlığı da bu ilişkiyi ve hastalığın patogenezinde Fetuin-A'nın prognoz için ne kadar önemli bir parametre olduğunu göstermektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Orak hücre anemisinde daha önce bakılmamış bir parametre olan Fetuin-A ile oksidatif stres ve inflamatuvar belirteçlerin ilişkisi değerlendirilmiştir. Çalışmamız, Fetuin-A'nın inflamasyon ve oksidatif stres ile ilişkisini gösteren orak hücre anemisinin vasküler patogeneze ışık tutacak orijinal bir çalışmadır. Fetuin-a'nın inflamasyonla yakın ilişkisini, orak hücre anemili hastalarda kronik inflamatuvar sürecin varlığını ve çalışmamızın sonuçlarını değerlendirdiğimizde, Fetuin-A, vasküler patolojideki prognozun seyrine yön verici etkisinin OHA hastalarında da söz konusu olduğu sonucuna vardık. OHA'da meydana oksidatif stres ve inflamatuvar yolların aydınlatılmasında, yeni bir parametre olan Fetuin-A ile ilgili daha fazla çalışma yapılmasının faydalı olacağını düşünüyoruz.

## 7. KAYNAKLAR

1. Aygun B, Odame I. A global perspective on sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;59(2):386-90.
2. Ballas SK. Sickle cell disease: clinical management. *Baillieres Clin Haematol*. 1998;11(1):185-214.
3. Kocak R, Alparslan ZN, Agridag G, Baslamisli F, Aksungur PD, Koltas S. The frequency of anaemia, iron deficiency, hemoglobin S and beta thalassemia in the south of Turkey. *Eur J Epidemiol*. 1995;11(2):181-4.
4. Topley JM, Rogers DW, Stevens MC, Serjeant GR. Acute splenic sequestration and hypersplenism in the first five years in homozygous sickle cell disease. *Arch Dis Child*. 1981;56(10):765-9.
5. Buchanan GR, DeBaun MR, Quinn CT, Steinberg MH. Sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004:35-47.
6. Voskaridou E, Christoulas D, Terpos E. Sickle-cell disease and the heart: review of the current literature. *Br J Haematol*. 2012;157(6):664-73.
7. El-Hazmi MA, Al-Hazmi AM, Warsy AS. Sickle cell disease in Middle East Arab countries. *Indian J Med Res*. 2011;134(5):597-610.
8. Richard RE. The management of sickle cell pain. *Curr Pain Headache Rep*. 2009;13(4):295-7.
9. Safaya S, Steinberg MH, Klings ES. Monocytes from sickle cell disease patients induce differential pulmonary endothelial gene expression via activation of NF-kappaB signaling pathway. *Mol Immunol*. 2012;50(1-2):117-23.



10. Tharaux PL. Endothelin in renal injury due to sickle cell disease. *Contrib Nephrol.* 2011;172:185-99.
11. Wood KC, Hsu LL, Gladwin MT. Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(8):1506-28.
12. Doukky R, Lee WY, Ravilla M, Lateef OB, Pelaez V, French A, et al. A novel expression of exercise induced pulmonary hypertension in human immunodeficiency virus patients: a pilot study. *Open Cardiovasc Med J.* 2012;6:44-9.
13. Mehari A, Gladwin MT, Tian X, Machado RF, Kato GJ. Mortality in adults with sickle cell disease and pulmonary hypertension. *JAMA.* 2012;307(12):1254-6.
14. Kato GJ, Hebbel RP, Steinberg MH, Gladwin MT. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. *Am J Hematol.* 2009;84(9):618-25.
15. Taylor JGt, Nolan VG, Mendelsohn L, Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: association of vascular complications and mortality with less frequent vasoocclusive pain. *PLoS One.* 2008;3(5):e2095.
16. Wood KC, Hebbel RP, Granger DN. Endothelial cell P-selectin mediates a proinflammatory and prothrombotic phenotype in cerebral venules of sickle cell transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286(5):H1608-14.
17. Savale L, Maitre B, Bachir D, Galacteros F, Simonneau G, Parent F. [Pulmonary arterial hypertension and sickle cell disease.]. *Presse Med.* 2012.
18. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper Biyokimya.* 25. Baskı, İstanbul; Nobel Matbaacılık, 2004.
19. Higgs DR, Thein SL, Wood WG. Human Haemoglobin. Eds; Gibbons R, Higgs DR, Old JM, Oliveri NF, Thein SL, Wood WG. In. *The Thalassemia Syndromes*, 4th Oxford Ed, Blackwell Science Ltd, 2001; 65-120.
20. Sjolín L. 3D-structural elucidation of biologically important macromolecules. *Drug Des Discov.* 1993;9(3-4):261-76.
21. Hartwell SK, Srisawang B, Kongtawelert P, Christian D, Grudpan K. Review on screening and analysis techniques for hemoglobin variants and thalassemia. *Talanta,* 2005; 65: 1149-1161.

22. Shimizu T. Binding of cysteine thiolate to the Fe(III) heme complex is critical for the function of heme sensor proteins. *J Inorg Biochem.* 2012;108:171-7.
23. Balla J, Balla G, Lakatos B, Jeney V, Szentmihalyi K. [Heme-iron in the human body]. *Orv Hetil.* 2007;148(36):1699-706.
24. Gutteridge JM, Smith A. Antioxidant protection by haemopexin of haem-stimulated lipid peroxidation. *Biochem J.* 1988;256(3):861-5.
25. Arndt MH, de Oliveira CL, Regis WC, Torriani IL, Santoro MM. Small angle x-ray scattering of the hemoglobin from *Biomphalaria glabrata*. *Biopolymers.* 2003;69(4):470-9.
26. Bettati S, Viappiani C, Mozzarelli A. Hemoglobin, an "evergreen" red protein. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1794(9):1317-24.
27. Hartwell SK, Srisawang B, Kongtawelert P, Christian GD, Grudpan K. Review on screening and analysis techniques for hemoglobin variants and thalassemia. *Talanta.* 2005;65(5):1149-61.
28. Kosmachevskaia OV, Topunov AF. [Hemoglobins: diversity of structures and functions]. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 2009;45(6):627-53.
29. Beuzard Y, Vainchenker W, Testa U, Dubart A, Monplaisir N, Breton-Gorius J, et al. Fetal to adult hemoglobin switch in cultures of early erythroid precursors from human fetuses and neonates. *Am J Hematol.* 1979;7(3):207-18.
30. Murayama M. Structure of sickle cell hemoglobin and molecular mechanism of the sickling phenomenon. *Clin Chem.* 1967;13(7):578-88.
31. Ruckpaul K. [Structure-function relations of abnormal hemoglobins. II]. *Dtsch Gesundheitsw.* 1969;24(4):148-56.
32. Kwiatkowska J. [The structure of haemoglobin and its correlation with function]. *Postepy Biochem.* 1968;14(1):27-47.
33. Perutz MF. Structure and function of hemoglobin. *Harvey Lect.* 1969;63:213-61.
34. Bunn HF, Forget BG, Ranney HM. Hemoglobinopathies. *Major Probl Intern Med.* 1977;12:1-291.

35. Edelstein SJ. Structure of the fibers of hemoglobin S. *Tex Rep Biol Med.* 1980;40:221-32.
36. Rachmilewitz EA. Denaturation of the normal and abnormal hemoglobin molecule. *Semin Hematol.* 1974;11(4):441-62.
37. Rosa J. [The genes of human hemoglobins and their expression (author's transl)]. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1981;23(2):79-88.
38. Kuliev AM, Modell B. Problems in the control of genetic disorders. *Biomed Sci.* 1990;1(1):3-17.
39. Kho AN, Hui S, Kesterson JG, McDonald CJ. Which observations from the complete blood cell count predict mortality for hospitalized patients? *J Hosp Med.* 2007;2(1):5-12.
40. Honig GR. Hemoglobinopathies and thalassemias. Abnormalities of hemoglobin structure, function, and synthesis. *Postgrad Med.* 1974;55(5):77-83.
41. Khattab AD, Rawlings B, Ali IS. Care of patients with haemoglobin abnormalities: history and biology. *Br J Nurs.* 2006;15(18):994-8.
42. Alkindi S, Al Zadjali S, Al Madhani A, Daar S, Al Haddabi H, Al Abri Q, et al. Forecasting hemoglobinopathy burden through neonatal screening in Omani neonates. *Hemoglobin.* 2010;34(2):135-44.
43. Charache S. Structure - function relationships: clinical aspects. *Tex Rep Biol Med.* 1980;40:199-206.
44. Berchel C, Diara JP, Loret H, Foucan L, Le Turdu C, Samuel Y. [Natural history of sickle cell anemia]. *Rev Prat.* 1992;42(15):1885-91.
45. Gaston MH. Sickle cell disease: an overview. *Semin Roentgenol.* 1987;22(3):150-9.
46. Pearson HA. Neonatal testing for sickle cell diseases--a historical and personal review. *Pediatrics.* 1989;83(5 Pt 2):815-8.
47. Aslan M, Canatan D. Modulation of redox pathways in neutrophils from sickle cell disease patients. *Exp Hematol.* 2008;36(11):1535-44.

48. Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation*. 2004;11(2):129-51.
49. Serjeant GR. One hundred years of sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2010;151(5):425-9.
50. Kaul DK, Hebbel RP. Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *J Clin Invest*. 2000;106(3):411-20.
51. Kaul DK, Liu XD, Zhang X, Ma L, Hsia CJ, Nagel RL. Inhibition of sickle red cell adhesion and vasoocclusion in the microcirculation by antioxidants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(1):H167-75.
52. Nur E, Biemond BJ, Otten HM, Brandjes DP, Schnog JJ. Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management. *Am J Hematol*. 2011;86(6):484-9.
53. Ashley-Koch AE, Elliott L, Kail ME, De Castro LM, Jonassaint J, Jackson TL, et al. Identification of genetic polymorphisms associated with risk for pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood*. 2008;111(12):5721-6.
54. Chang Milbauer L, Wei P, Enenstein J, Jiang A, Hillery CA, Scott JP, et al. Genetic endothelial systems biology of sickle stroke risk. *Blood*. 2008;111(7):3872-9.
55. Nath KA, Grande JP, Haggard JJ, Croatt AJ, Katusic ZS, Solovey A, et al. Oxidative stress and induction of heme oxygenase-1 in the kidney in sickle cell disease. *Am J Pathol*. 2001;158(3):893-903.
56. Reiter CD, Gladwin MT. An emerging role for nitric oxide in sickle cell disease vascular homeostasis and therapy. *Curr Opin Hematol*. 2003;10(2):99-107.
57. Sebastiani P, Ramoni MF, Nolan V, Baldwin CT, Steinberg MH. Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. *Nat Genet*. 2005;37(4):435-40.
58. Walter PB, Fung EB, Killilea DW, Jiang Q, Hudes M, Madden J, et al. Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with beta-thalassaemia or sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2006;135(2):254-63.
59. Weatherall DJ. Hemoglobinopathies worldwide: present and future. *Curr Mol Med*. 2008;8(7):592-9.

60. Guvenc B, Yildiz SM, Tekinturhan F, Dincer S, Akyuzluer I, Okten S, et al. Molecular characterization of alpha-Thalassemia in Adana, Turkey: A single center study. *Acta Haematol.* 2010;123(4):197-200.
61. Yuregir GT, Donma O, Dikmen N, Isbir T, Cinar M. Population studies of hemoglobin S and other variants in Cukurova, the southern part of Turkey. *Nihon Ketsueki Gakkai Zasshi.* 1987;50(4):757-65.
62. Sankaran VG. Hemoglobin disorders in the developing world: a perspective from Sri Lanka. *Am J Hematol.* 2010;85(9):732.
63. Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ.* 2008;86(6):480-7.
64. Modell B, Darlison M, Birgens H, Cario H, Faustino P, Giordano PC, et al. Epidemiology of haemoglobin disorders in Europe: an overview. *Scand J Clin Lab Invest.* 2007;67(1):39-69.
65. McCavit TL. Sickle cell disease. *Pediatr Rev.* 2012;33(5):195-204; quiz 5-6.
66. Steinberg MH. In the clinic. Sickle cell disease. *Ann Intern Med.* 2011;155(5):ITC31-15; quiz ITC316.
67. Gurkan E, Ergun Y, Zorludemir S, Baslamisli F, Kocak R. Liver involvement in sickle cell disease. *Turk J Gastroenterol.* 2005;16(4):194-8.
68. Tiftik N, Altintas E, Kiykim A, Ucbilek E, Sezgin O. Long-term red blood cell exchange can be used to successfully treat sickle cell intrahepatic cholestasis: a case report. *J Clin Apher.* 2004;19(1):17-9.
69. Unal S, Toros F, Kutuk MO, Uyaniker MG. Evaluation of the psychological problems in children with sickle cell anemia and their families. *Pediatr Hematol Oncol.* 2011;28(4):321-8.
70. Yalcin H, Melek I, Okuyucu E, Reyhan M, Akgul F, Serarslan G, et al. Sickle cell disease with regional silent cerebral infarction detected by SPECT. *Clin Nucl Med.* 2007;32(11):842-3.
71. Pathare A, Kindi SA, Daar S, Dennison D. Cytokines in sickle cell disease. *Hematology.* 2003;8(5):329-37.

72. Archer DR, Stiles JK, Newman GW, Quarshie A, Hsu LL, Sayavongsa P, et al. C-reactive protein and interleukin-6 are decreased in transgenic sickle cell mice fed a high protein diet. *J Nutr.* 2008;138(6):1148-52.
73. Salhany JM. The oxidative denitrosylation mechanism and nitric oxide release from human fetal and adult hemoglobin, an experimentally based model simulation study. *Blood Cells Mol Dis.* 2012.
74. Brittain JE, Parise LV. Cytokines and plasma factors in sickle cell disease. *Curr Opin Hematol.* 2007;14(5):438-43.
75. Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad ST, Conran N, Costa FF. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol.* 2009;85(2):235-42.
76. Guzik TJ, Korb R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol.* 2003;54(4):469-87.
77. Akohoue SA, Shankar S, Milne GL, Morrow J, Chen KY, Ajayi WU, et al. Energy expenditure, inflammation, and oxidative stress in steady-state adolescents with sickle cell anemia. *Pediatr Res.* 2007;61(2):233-8.
78. Aslan M, Freeman BA. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(11):1469-83.
79. Makis AC, Hatzimichael EC, Mavridis A, Bourantas KL. Alpha-2-macroglobulin and interleukin-6 levels in steady-state sickle cell disease patients. *Acta Haematol.* 2000;104(4):164-8.
80. Taylor SC, Shacks SJ, Mitchell RA, Banks A. Serum interleukin-6 levels in the steady state of sickle cell disease. *J Interferon Cytokine Res.* 1995;15(12):1061-4.
81. Wun T, Cordoba M, Rangaswami A, Cheung AW, Paglieroni T. Activated monocytes and platelet-monocyte aggregates in patients with sickle cell disease. *Clin Lab Haematol.* 2002;24(2):81-8.
82. Wun T. The Role of Inflammation and Leukocytes in the Pathogenesis of Sickle Cell Disease; Haemoglobinopathy. *Hematology.* 2001;5(5):403-12.
83. Driss A, Wilson NO, Mason K, Hyacinth HI, Hibbert JM, Serjeant GR, et al. Elevated IL-1alpha and CXCL10 serum levels occur in patients with homozygous

sickle cell disease and a history of acute splenic sequestration. *Dis Markers*. 2012;32(5):295-300.

84. Wagener FA, Feldman E, de Witte T, Abraham NG. Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E selectin in vascular endothelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1997;216(3):456-63.

85. Ombrellino M, Wang H, Yang H, Zhang M, Vishnubhakat J, Frazier A, et al. Fetuin, a negative acute phase protein, attenuates TNF synthesis and the innate inflammatory response to carrageenan. *Shock*. 2001;15(3):181-5.

86. Afsar CU, Uzun H, Yurdakul S, Muderrisoglu C, Erguney M, Demir B, et al. Association of serum fetuin-A levels with heart valve calcification and other biomarkers of inflammation among persons with acute coronary syndrome. *Clin Invest Med*. 2012;35(4):E206.

87. Wang H, Zhang M, Bianchi M, Sherry B, Sama A, Tracey KJ. Fetuin (alpha2-HS-glycoprotein) opsonizes cationic macrophage-deactivating molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(24):14429-34.

88. Roos M, Heinemann FM, Lindemann M, Horn PA, Lutz J, Stock K, et al. Fetuin-A pretransplant serum levels, kidney allograft function and rejection episodes: a 3-year posttransplantation follow-up. *Kidney Blood Press Res*. 2011;34(5):328-33.

89. Metry G, Stenvinkel P, Qureshi AR, Carrero JJ, Yilmaz MI, Barany P, et al. Low serum fetuin-A concentration predicts poor outcome only in the presence of inflammation in prevalent haemodialysis patients. *Eur J Clin Invest*. 2008;38(11):804-11.

90. Lebreton JP, Joisel F, Raoult JP, Lannuzel B, Rogez JP, Humbert G. Serum concentration of human alpha 2 HS glycoprotein during the inflammatory process: evidence that alpha 2 HS glycoprotein is a negative acute-phase reactant. *J Clin Invest*. 1979;64(4):1118-29.

91. Wang H, Zhang M, Soda K, Sama A, Tracey KJ. Fetuin protects the fetus from TNF. *Lancet*. 1997;350(9081):861-2.

92. Dziegielewska KM, Andersen NA, Saunders NR. Modification of macrophage response to lipopolysaccharide by fetuin. *Immunol Lett*. 1998;60(1):31-5.

93. Cozzolino M, Galassi A, Biondi ML, Turri O, Papagni S, Mongelli N, et al. Serum Fetuin-A Levels Link Inflammation and Cardiovascular Calcification in Hemodialysis Patients. *American Journal of Nephrology*. 2006;26(5):423-9.

94. Wang AYM, Woo J, Lam CWK, Wang M, Chan IHS, Gao P, et al. Associations of serum fetuin-A with malnutrition, inflammation, atherosclerosis and valvular calcification syndrome and outcome in peritoneal dialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2005;20(8):1676-85.
95. Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, Wildberger JE, Mahnken AH, Bohm R, et al. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet*. 2003;361(9360):827-33.
96. Kusnierz-Cabala B, Gurda-Duda A, Panek J, Fedak D, Dumnicka P, Solnica B, et al. Serum fetuin A concentrations in patients with acute pancreatitis. *Clin Lab*. 2010;56(5-6):191-5.
97. Sato H, Kazama JJ, Wada Y, Kuroda T, Narita I, Gejyo F, et al. Decreased levels of circulating alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/Fetuin-A (AHSG) in patients with rheumatoid arthritis. *Intern Med*. 2007;46(20):1685-91.
98. Demetriou M, Binkert C, Sukhu B, Tenenbaum HC, Dennis JW. Fetuin/alpha2-HS glycoprotein is a transforming growth factor-beta type II receptor mimic and cytokine antagonist. *J Biol Chem*. 1996;271(22):12755-61.
99. Mathews ST, Srinivas PR, Leon MA, Grunberger G. Bovine fetuin is an inhibitor of insulin receptor tyrosine kinase. *Life Sci*. 1997;61(16):1583-92.
100. Goustin AS, Abou-Samra AB. The "thrifty" gene encoding Ahsg/Fetuin-A meets the insulin receptor: Insights into the mechanism of insulin resistance. *Cell Signal*. 2011;23(6):980-90.
101. Ix JH, Wassel CL, Kanaya AM, Vittinghoff E, Johnson KC, Koster A, et al. Fetuin-A and incident diabetes mellitus in older persons. *JAMA*. 2008;300(2):182-8.
102. Jahnen-Dechent W, Schafer C, Heiss A, Grotzinger J. Systemic inhibition of spontaneous calcification by the serum protein alpha 2-HS glycoprotein/fetuin. *Z Kardiol*. 2001;90 Suppl 3:47-56.
103. Schafer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M, Floege J, et al. The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest*. 2003;112(3):357-66.
104. Szweras M, Liu D, Partridge EA, Pawling J, Sukhu B, Clokie C, et al. alpha 2-HS glycoprotein/fetuin, a transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein antagonist, regulates postnatal bone growth and remodeling. *J Biol Chem*. 2002;277(22):19991-7.



105. Heiss A, DuChesne A, Denecke B, Grotzinger J, Yamamoto K, Renne T, et al. Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A. Formation of colloidal calciprotein particles. *J Biol Chem.* 2003;278(15):13333-41.
106. Rochette CN, Rosenfeldt S, Heiss A, Narayanan T, Ballauff M, Jahnen-Dechent W. A shielding topology stabilizes the early stage protein-mineral complexes of fetuin-A and calcium phosphate: a time-resolved small-angle X-ray study. *Chembiochem.* 2009;10(4):735-40.
107. Wu CY, Martel J, Young D, Young JD. Fetuin-A/albumin-mineral complexes resembling serum calcium granules and putative nanobacteria: demonstration of a dual inhibition-seeding concept. *PLoS One.* 2009;4(11):8058-61.
108. El-Shehaby AM, Zakaria A, El-Khatib M, Mostafa N. Association of fetuin-A and cardiac calcification and inflammation levels in hemodialysis patients. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation.* 2010;70(8):575-82.
109. Merx MW, Schafer C, Westenfeld R, Brandenburg V, Hidajat S, Weber C, et al. Myocardial stiffness, cardiac remodeling, and diastolic dysfunction in calcification-prone fetuin-A-deficient mice. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(11):3357-64.
110. Assis A, Conran N, Canalli AA, Lorand-Metze I, Saad ST, Costa FF. Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. *Acta Haematol.* 2005;113(2):130-6.
111. Yuce M, Davutoglu V, Cakici M. Fetuin-A, osteoporosis and inflammation--proposal of possible mechanisms for vascular and valvular calcification in chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2010;25(8):2801-9.
112. Wang H, Sama AE. Anti-inflammatory role of fetuin-A in injury and infection. *Curr Mol Med.* 2012;12(5):625-33.
113. Conran N, Costa FF. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. *Clinical Biochemistry.* 2009;42(18):1824-38.
114. Aslan M, Ryan TM, Adler B, Townes TM, Parks DA, Thompson JA, et al. Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(26):15215-20.
115. Aslan M, Ryan TM, Townes TM, Coward L, Kirk MC, Barnes S, et al. Nitric oxide-dependent generation of reactive species in sickle cell disease. Actin tyrosine induces defective cytoskeletal polymerization. *J Biol Chem.* 2003;278(6):4194-204.

- 116.Kupesiz A, Celmeli G, Dogan S, Antmen B, Aslan M. The effect of hemolysis on plasma oxidation and nitration in patients with sickle cell disease. *Free Radic Res.* 2012;46(7):883-90.
- 117.Asare K, Gee BE, Stiles JK, Wilson NO, Driss A, Quarshie A, et al. Plasma interleukin-1beta concentration is associated with stroke in sickle cell disease. *Cytokine.* 2010;49(1):39-44.
- 118.Belcher JD, Marker PH, Weber JP, Hebbel RP, Vercellotti GM. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. *Blood.* 2000;96(7):2451-9.
- 119.Gonsalves C, Kalra VK. Endothelin-1-induced macrophage inflammatory protein-1beta expression in monocytic cells involves hypoxia-inducible factor-1alpha and AP-1 and is negatively regulated by microRNA-195. *J Immunol.* 2010;185(10):6253-64.
- 120.Gurkan E, Tanriverdi K, Baslamisli F. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor levels in sickle cell disease. *Ann Hematol.* 2005;84(2):71-5.
- 121.Aslan M, Thornley-Brown D, Freeman BA. Reactive species in sickle cell disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899:375-91.
- 122.Hebbel RP, Morgan WT, Eaton JW, Hedlund BE. Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85(1):237-41.
- 123.Hebbel RP, Eaton JW, Balasingam M, Steinberg MH. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *J Clin Invest.* 1982;70(6):1253-9.
- 124.Osarogiagbon UR, Choong S, Belcher JD, Vercellotti GM, Paller MS, Hebbel RP. Reperfusion injury pathophysiology in sickle transgenic mice. *Blood.* 2000;96(1):314-20.
- 125.Pritchard KA, Jr., Ou J, Ou Z, Shi Y, Franciosi JP, Signorino P, et al. Hypoxia-induced acute lung injury in murine models of sickle cell disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;286(4):L705-14.
- 126.Mahaseth H, Vercellotti GM, Welch TE, Bowlin PR, Sonbol KM, Hsia CJ, et al. Polynitroxyl albumin inhibits inflammation and vasoocclusion in transgenic sickle mice. *J Lab Clin Med.* 2005;145(4):204-11.

- 127.Sultana C, Shen Y, Rattan V, Johnson C, Kalra VK. Interaction of sickle erythrocytes with endothelial cells in the presence of endothelial cell conditioned medium induces oxidant stress leading to transendothelial migration of monocytes. *Blood*. 1998;92(10):3924-35.
- 128.Agil A, Sadrzadeh SM. Hydroxy-urea protects erythrocytes against oxidative damage. *Redox Rep*. 2000;5(1):29-34.
- 129.Benkerrou M, Delarche C, Brahim L, Fay M, Vilmer E, Elion J, et al. Hydroxyurea corrects the dysregulated L-selectin expression and increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production of polymorphonuclear neutrophils from patients with sickle cell anemia. *Blood*. 2002;99(7):2297-303.
- 130.Jison ML, Munson PJ, Barb JJ, Suffredini AF, Talwar S, Logun C, et al. Blood mononuclear cell gene expression profiles characterize the oxidant, hemolytic, and inflammatory stress of sickle cell disease. *Blood*. 2004;104(1):270-80.
- 131.Wood KC, Hebbel RP, Granger DN. Endothelial cell NADPH oxidase mediates the cerebral microvascular dysfunction in sickle cell transgenic mice. *FASEB J*. 2005;19(8):989-91.
- 132.Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. 2006;113(13):1708-14.
- 133.McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med*. 1985;312(3):159-63.
- 134.Nath KA, Shah V, Haggard JJ, Croatt AJ, Smith LA, Hebbel RP, et al. Mechanisms of vascular instability in a transgenic mouse model of sickle cell disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000;279(6):R1949-55.
- 135.Vaya J. Exogenous markers for the characterization of human diseases associated with oxidative stress. *Biochimie*. 2012.
- 136.Winczura A, Zdzalik D, Tudek B. Damage of DNA and proteins by major lipid peroxidation products in genome stability. *Free Radic Res*. 2012;46(4):442-59.
- 137.Jacob RA, Burri BJ. Oxidative damage and defense. *Am J Clin Nutr*. 1996;63(6):985-90.
- 138.Caviness JN, Lue L, Adler CH, Walker DG. Parkinson's disease dementia and potential therapeutic strategies. *CNS Neurosci Ther*. 2011;17(1):32-44.

- 139.Coppo R, Camilla R, Amore A, Peruzzi L. Oxidative stress in IgA nephropathy. *Nephron Clin Pract.* 2010;116(3):c196-8, discussion c9.
- 140.Kaur C, Ling EA. Antioxidants and neuroprotection in the adult and developing central nervous system. *Curr Med Chem.* 2008;15(29):3068-80.
- 141.Loukides S, Bakakos P, Kostikas K. Oxidative stress in patients with COPD. *Curr Drug Targets.* 2011;12(4):469-77.
- 142.Miller E, Mrowicka M, Zolynski K, Kedziora J. [Oxidative stress in multiple sclerosis]. *Pol Merkur Lekarski.* 2009;27(162):499-502.
- 143.Otani H. Oxidative stress as pathogenesis of cardiovascular risk associated with metabolic syndrome. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(7):1911-26.
- 144.Palm F, Nordquist L. Renal oxidative stress, oxygenation, and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011;301(5):R1229-41.
- 145.Pellegrino MA, Desaphy JF, Brocca L, Pierno S, Camerino DC, Bottinelli R. Redox homeostasis, oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J Physiol.* 2011;589(Pt 9):2147-60.
- 146.Plafker SM. Oxidative stress and the ubiquitin proteolytic system in age-related macular degeneration. *Adv Exp Med Biol.* 2010;664:447-56.
- 147.Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med.* 2011;50(5):567-75.
- 148.Roberts RA, Smith RA, Safe S, Szabo C, Tjalkens RB, Robertson FM. Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. *Toxicology.* 2010;276(2):85-94.
- 149.Victor VM, Rocha M, Herance R, Hernandez-Mijares A. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes. *Curr Pharm Des.* 2011;17(36):3947-58.
- 150.von Bernhardt R, Eugenin J. Alzheimer's disease: redox dysregulation as a common denominator for diverse pathogenic mechanisms. *Antioxid Redox Signal.* 2012;16(9):974-1031.
- 151.Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working? *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1995;35(1-2):21-39.

152. Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Ruggiero FM. Oxidative stress, mitochondrial bioenergetics, and cardiolipin in aging. *Free Radic Biol Med*. 2010;48(10):1286-95.
153. Aruoma OI, Kaur H, Halliwell B. Oxygen free radicals and human diseases. *J R Soc Health*. 1991;111(5):172-7.
154. Qi X, Guy J, Nick H, Valentine J, Rao N. Increase of manganese superoxide dismutase, but not of Cu/Zn-SOD, in experimental optic neuritis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38(6):1203-12.
155. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
156. Bolzan AD, Bianchi MS, Bianchi NO. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in human blood: influence of sex, age and cigarette smoking. *Clin Biochem*. 1997;30(6):449-54.
157. Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C, Chapelle JP. [Oxidative stress]. *Rev Med Liege*. 2007;62(10):628-38.
158. Ozmen D, Boydak B, Mutaf I, Zoghi M, Kumanlioglu K, Guner I, et al. The state of lipid peroxidation and antioxidants following thrombolytic therapy with rt-PA and streptokinase in acute myocardial infarction. *Jpn Heart J*. 1999;40(3):267-73.
159. Vladimirov Iu A. [Free radical lipid oxidation and physical properties of lipid layer of biological membranes]. *Biofizika*. 1987;32(5):830-44.
160. Bhatt P, Swarup D, Patra RC, Pattanaik AK, Ranjan R. Enhanced erythrocytic lipid peroxides level in rabbits after repeated parental administration of iron. *Indian J Exp Biol*. 2005;43(10):854-8.
161. Grinshtein Iu I, Andrianova GP. [Status of the antioxidant system and free radical lipid peroxidation in patients with chronic renal failure]. *Ter Arkh*. 1988;60(6):54-6.
162. Yilmaz HR, Uz E, Yucel N, Altuntas I, Ozcelik N. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. *J Biochem Mol Toxicol*. 2004;18(4):234-8.
163. Nazifi S, Razavi SM, Kianiamin P, Rakhshandehroo E. Evaluation of erythrocyte antioxidant mechanisms: antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and

serum trace elements associated with progressive anemia in ovine malignant theileriosis. *Parasitol Res.* 2011;109(2):275-81.

164. Borrelli E, Giomarelli P, Chiara O, Casini A, Betti S, Sabatini L, et al. Lipid peroxidation and lung ultrastructural changes in an experimental model of leukocyte-mediated pulmonary injury. *Lung.* 1990;168(1):35-42.

165. Bose B, Agarwal S, Chatterjee SN. Membrane lipid peroxidation by UV-A: mechanism and implications. *Biotechnol Appl Biochem.* 1990;12(5):557-61.

166. Demling RH, LaLonde C. Early postburn lipid peroxidation: effect of ibuprofen and allopurinol. *Surgery.* 1990;107(1):85-93.

167. Dawczynski C, Schubert R, Hein G, Muller A, Eidner T, Vogelsang H, et al. Long-term moderate intervention with n-3 long-chain PUFA-supplemented dairy products: effects on pathophysiological biomarkers in patients with rheumatoid arthritis. *Br J Nutr.* 2009;101(10):1517-26.

168. Quiles JL, Pamplona R, Ramirez-Tortosa MC, Naudi A, Portero-Otin M, Araujo-Nepomuceno E, et al. Coenzyme Q addition to an n-6 PUFA-rich diet resembles benefits on age-related mitochondrial DNA deletion and oxidative stress of a MUFA-rich diet in rat heart. *Mech Ageing Dev.* 2010;131(1):38-47.

169. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res.* 2008;52(8):885-97.

170. Jurgens G, Lang J, Esterbauer H. Modification of human low-density lipoprotein by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Biochim Biophys Acta.* 1986;875(1):103-14.

171. Yamazoe K, Inaba T, Bonkobara M, Matsuki N, Ono K, Kudo T. Changes of hepatic tissue phospholipid peroxidation, malondialdehydes, and antioxidative enzyme activities in dogs with halothane inhalation. *J Vet Med Sci.* 1998;60(1):15-21.

172. Dean RT. Free radicals, membrane damage and cell-mediated cytolysis. *Br J Cancer Suppl.* 1987;8:39-45.

173. Thomas CE, Aust SD. Free radicals and environmental toxins. *Ann Emerg Med.* 1986;15(9):1075-83.

174. Blazovics A. [From free radicals to science of nutrition]. *Orv Hetil.* 2009;150(2):53-63.

- 175.Ceriello A. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism*. 2000;49(2 Suppl 1):27-9.
- 176.Nishinaka Y, Yokota M. [Free radical]. *Nihon Rinsho*. 1994;52 Suppl(Pt 1):196-200.
- 177.Stadtman ER. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem*. 1993;62:797-821.
- 178.Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev*. 1994;52(8 Pt 1):253-65.
- 179.Hagen U. Current aspects on the radiation induced base damage in DNA. *Radiat Environ Biophys*. 1986;25(4):261-71.
- 180.Sonntag DM, de Boer J, Medvedovic M, Baxter CS, LeMasters G, Talaska G. Mutational biases associated with potential iron-binding DNA motifs in rodent lacI and human p53 mutational databases. *Mutat Res*. 2004;550(1-2):73-88.
- 181.Cwikel JG, Gidron Y, Quastel M. Low-dose environmental radiation, DNA damage, and cancer: the possible contribution of psychological factors. *Psychol Health Med*. 2010;15(1):1-16.
- 182.Li DQ, Kumar R. Mi-2/NuRD complex making inroads into DNA-damage response pathway. *Cell Cycle*. 2010;9(11):2071-9.
- 183.Masuda Y, Kamiya K. Molecular nature of radiation injury and DNA repair disorders associated with radiosensitivity. *Int J Hematol*. 2012;95(3):239-45.
- 184.Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S, et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2012;27(10):2908-17.
- 185.Ravanat JL, Cadet J, Douki T. Oxidatively generated DNA lesions as potential biomarkers of in vivo oxidative stress. *Curr Mol Med*. 2012;12(6):655-71.
- 186.Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS*. 2007;115(2):81-103.
- 187.Forstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008;5(6):338-49.

188. Dranka BP, Benavides GA, Diers AR, Giordano S, Zelickson BR, Reily C, et al. Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(9):1621-35.
189. Guevara R, Gianotti M, Oliver J, Roca P. Age and sex-related changes in rat brain mitochondrial oxidative status. *Exp Gerontol*. 2011;46(11):923-8.
190. Hirche TO, Gaut JP, Heinecke JW, Belaouaj A. Myeloperoxidase plays critical roles in killing *Klebsiella pneumoniae* and inactivating neutrophil elastase: effects on host defense. *J Immunol*. 2005;174(3):1557-65.
191. Lafuse WP, Alvarez GR, Zwillig BS. Regulation of Nramp1 mRNA stability by oxidants and protein kinase C in RAW264.7 macrophages expressing Nramp1(Gly169). *Biochem J*. 2000;351 Pt 3:687-96.
192. Kim JH, Patra CR, Arkalgud JR, Boghossian AA, Zhang J, Han JH, et al. Single-molecule detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediating angiogenic redox signaling on fluorescent single-walled carbon nanotube array. *ACS Nano*. 2011;5(10):7848-57.
193. Darmon N, Fernandez Y, Periquet A, Mitjavila S. Superoxide anion scavenging capacity measured by a polarographic method. Comparison with a colourimetric method. *Free Radic Res Commun*. 1992;17(2):97-107.
194. Herdener M, Heigold S, Saran M, Bauer G. Target cell-derived superoxide anions cause efficiency and selectivity of intercellular induction of apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2000;29(12):1260-71.
195. Hoffstein ST, Gennaro DE, Manzi RM. Neutrophils may directly synthesize both H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> since surface stimuli induce their release in stimulus-specific ratios. *Inflammation*. 1985;9(4):425-37.
196. Oosthuizen MM, Greyling D. Hydroxyl radical generation: the effect of bicarbonate, dioxygen and buffer concentration on pH-dependent chemiluminescence. *Redox Rep*. 2001;6(2):105-16.
197. Takac I, Schroder K, Zhang L, Lardy B, Anilkumar N, Lambeth JD, et al. The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4. *J Biol Chem*. 2011;286(15):13304-13.
198. Zhang ZH, Yu SZ, Wang ZT, Zhao BL, Hou JW, Yang FJ, et al. Scavenging effects of tetramethylpyrazine on active oxygen free radicals. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1994;15(3):229-31.



- 199.Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.* 1987;1(5):358-64.
- 200.Hemnani T, Parihar MS. Reactive oxygen species and oxidative DNA damage. *Indian J Physiol Pharmacol.* 1998;42(4):440-52.
- 201.Rusyn I, Rose ML, Bojes HK, Thurman RG. Novel role of oxidants in the molecular mechanism of action of peroxisome proliferators. *Antioxid Redox Signal.* 2000;2(3):607-21.
- 202.Ward PA. Role of toxic oxygen products from phagocytic cells in tissue injury. *Adv Shock Res.* 1983;10:27-34.
- 203.Jiang Y, Zhu W, Li H, Yin S, Liu H, Xie Q. Oxidative desulfurization of fuels catalyzed by Fenton-like ionic liquids at room temperature. *ChemSusChem.* 2011;4(3):399-403.
- 204.Kim D, Chen JK, Yen TF. Naval derusting wastewater containing high concentration of iron, treated in UV photo-Fenton-like oxidation. *J Environ Sci (China).* 2010;22(7):991-7.
- 205.Pang SY, Jiang J, Ma J. Oxidation of sulfoxides and arsenic(III) in corrosion of nanoscale zero valent iron by oxygen: evidence against ferryl ions (Fe(IV)) as active intermediates in Fenton reaction. *Environ Sci Technol.* 2011;45(1):307-12.
- 206.Catala A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids.* 2009;157(1):1-11.
- 207.Halliwell B, Gutteridge JM. Role of iron in oxygen radical reactions. *Methods Enzymol.* 1984;105:47-56.
- 208.Winterbourn CC. Hydroxyl radical production in body fluids. Roles of metal ions, ascorbate and superoxide. *Biochem J.* 1981;198(1):125-31.
- 209.Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med.* 1995;18(6):1033-77.
- 210.Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res.* 2003;531(1-2):5-23.
- 211.Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res.* 2012;46(4):382-419.

212. Floyd RA, Carney JM. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann Neurol*. 1992;32 Suppl:22-7.
213. Halliwell B, Dizdaroglu M. The measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques. *Free Radic Res Commun*. 1992;16(2):75-87.
214. Karam LR, Bergtold DS, Simic MG. Biomarkers of OH radical damage in vivo. *Free Radic Res Commun*. 1991;12-13 Pt 1:11-6.
215. Kawanishi S, Inoue S, Yamamoto K. Hydroxyl radical and singlet oxygen production and DNA damage induced by carcinogenic metal compounds and hydrogen peroxide. *Biol Trace Elem Res*. 1989;21:367-72.
216. Lett JT. Double strand breakage in DNA and cellular radiation sensitivity: linear energy transfer and the oxygen effect. *Basic Life Sci*. 1988;49:419-28.
217. Simic MG. DNA markers of oxidative processes in vivo: relevance to carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Cancer Res*. 1994;54(7 Suppl):1918-23.
218. Kulbacka J, Saczko J, Chwilkowska A. [Oxidative stress in cells damage processes]. *Pol Merkur Lekarski*. 2009;27(157):44-7.
219. Afanas'ev IB, Suslova TB, Cheremisina ZP, Abramova NE, Korkina LG. Study of antioxidant properties of metal aspartates. *Analyst*. 1995;120(3):859-62.
220. Kappus H. Oxidative stress in chemical toxicity. *Arch Toxicol*. 1987;60(1-3):144-9.
221. Karbownik M, Reiter RJ. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000;225(1):9-22.
222. Augustin AJ, Boker T, Blumenroder SH, Lutz J, Spitznas M. Free radical scavenging and antioxidant activity of allopurinol and oxypurinol in experimental lens-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35(11):3897-904.
223. Augustin AJ, Spitznas M, Sekundo W, Koch F, Lutz J, Meller D, et al. Effects of allopurinol and steroids on inflammation and oxidative tissue damage in experimental lens induced uveitis: a biochemical and morphological study. *Br J Ophthalmol*. 1996;80(5):451-7.

224. Bauerova K, Bezek A. Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Gen Physiol Biophys*. 1999;18 Spec No:15-20.
225. Metodiewa D, Koska C. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species: relevance to cyto(neuro)toxic events and neurologic disorders. An overview. *Neurotox Res*. 2000;1(3):197-233.
226. Powers SK, Talbert EE, Adhietty PJ. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *J Physiol*. 2011;589(Pt 9):2129-38.
227. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res*. 2007;42(1):28-42.
228. Manna P, Das J, Ghosh J, Sil PC. Contribution of type 1 diabetes to rat liver dysfunction and cellular damage via activation of NOS, PARP, IkappaBalpha/NF-kappaB, MAPKs, and mitochondria-dependent pathways: Prophylactic role of arjunolic acid. *Free Radic Biol Med*. 2010;48(11):1465-84.
229. Monti M, Donnini S, Giachetti A, Mochly-Rosen D, Ziche M. deltaPKC inhibition or varepsilonPKC activation repairs endothelial vascular dysfunction by regulating eNOS post-translational modification. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48(4):746-56.
230. Blokhina O, Fagerstedt KV. Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. *Plant Physiol Biochem*. 2010;48(5):359-73.
231. Gopalakrishnan B, Nash KM, Velayutham M, Villamena FA. Detection of Nitric Oxide and Superoxide Radical Anion by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy from Cells using Spin Traps. *J Vis Exp*. 2012(66).
232. Queisser N, Schupp N, Stopper H, Schinzel R, Oteiza PI. Aldosterone increases kidney tubule cell oxidants through calcium-mediated activation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(11):1996-2006.
233. Reiter TA. NO\* chemistry: a diversity of targets in the cell. *Redox Rep*. 2006;11(5):194-206.
234. Domenech RJ, Macho P. [Endothelium and coronary circulation]. *Rev Med Chil*. 1991;119(2):189-96.

235. Gallego MJ, Garcia Villalon AL, Lopez Farre AJ, Garcia JL, Garron MP, Casado S, et al. Mechanisms of the endothelial toxicity of cyclosporin A. Role of nitric oxide, cGMP, and Ca<sup>2+</sup>. *Circ Res*. 1994;74(3):477-84.
236. Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;939:200-15.
237. Akyol O, Yanik M, Elyas H, Namli M, Canatan H, Akin H, et al. Association between Ala-9Val polymorphism of Mn-SOD gene and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005;29(1):123-31.
238. Anderson EJ, Neuffer PD. Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;290(3):C844-51.
239. Baud O, Haynes RF, Wang H, Folkerth RD, Li J, Volpe JJ, et al. Developmental up-regulation of MnSOD in rat oligodendrocytes confers protection against oxidative injury. *Eur J Neurosci*. 2004;20(1):29-40.
240. Wang S, Wang F, Shi X, Dai J, Peng Y, Guo X, et al. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) Val-9Ala polymorphism and cancer risk - A meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2009;45(16):2874-81.
241. Buko VU, Sadovnichy VV. Cytochrome P-450 and free radical generation in rat liver microsomes under the influence of prostaglandin E<sub>1</sub>. *Biochem Mol Biol Int*. 1996;39(6):1177-84.
242. Goeptar AR, Te Koppele JM, Lamme EK, Pique JM, Vermeulen NP. Cytochrome P450 2B1-mediated one-electron reduction of adriamycin: a study with rat liver microsomes and purified enzymes. *Mol Pharmacol*. 1993;44(6):1267-77.
243. McCay PB, Reinke LA, Rau JM. Hydroxyl radicals are generated by hepatic microsomes during NADPH oxidation: relationship to ethanol metabolism. *Free Radic Res Commun*. 1992;15(6):335-46.
244. Stoyanovsky DA, Cederbaum AI. Thiol oxidation and cytochrome P450-dependent metabolism of CCl<sub>4</sub> triggers Ca<sup>2+</sup> release from liver microsomes. *Biochemistry*. 1996;35(49):15839-45.
245. Lavoie JC, Laborie S, Rouleau T, Spalinger M, Chessex P. Peroxide-like oxidant response in lungs of newborn guinea pigs following the parenteral infusion of a multivitamin preparation. *Biochem Pharmacol*. 2000;60(9):1297-303.

246. Tardif JC, Gregoire J, L'Allier PL. Prevention of restenosis with antioxidants: mechanisms and implications. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2002;2(5):323-34.
247. Hermida-Ameijeiras A, Mendez-Alvarez E, Sanchez-Iglesias S, Sanmartin-Suarez C, Soto-Otero R. Autoxidation and MAO-mediated metabolism of dopamine as a potential cause of oxidative stress: role of ferrous and ferric ions. *Neurochem Int*. 2004;45(1):103-16.
248. Park JW, Youn YC, Kwon OS, Jang YY, Han ES, Lee CS. Protective effect of serotonin on 6-hydroxydopamine- and dopamine-induced oxidative damage of brain mitochondria and synaptosomes and PC12 cells. *Neurochem Int*. 2002;40(3):223-33.
249. Popp JL, Kirk TK. Oxidation of methoxybenzenes by manganese peroxidase and by Mn<sup>3+</sup>. *Arch Biochem Biophys*. 1991;288(1):145-8.
250. Howsawkung J, Teel AL, Hess TF, Crawford RL, Watts RJ. Simultaneous abiotic reduction-biotic oxidation in a microbial-MnO<sub>2</sub>-catalyzed Fenton-like system. *Sci Total Environ*. 2010;409(2):439-45.
251. Meng Z, Liu Y. Cell morphological ultrastructural changes in various organs from mice exposed by inhalation to sulfur dioxide. *Inhal Toxicol*. 2007;19(6-7):543-51.
252. Pryme IF. Compartmentation of the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biochem*. 1986;71(1):3-18.
253. Goel SK, Lalwani ND, Reddy JK. Peroxisome proliferation and lipid peroxidation in rat liver. *Cancer Res*. 1986;46(3):1324-30.
254. Qu B, Li QT, Wong KP, Tan TM, Halliwell B. Mechanism of clofibrate hepatotoxicity: mitochondrial damage and oxidative stress in hepatocytes. *Free Radic Biol Med*. 2001;31(5):659-69.
255. Reddy JK, Rao MS. Oxidative DNA damage caused by persistent peroxisome proliferation: its role in hepatocarcinogenesis. *Mutat Res*. 1989;214(1):63-8.
256. Fernandes MA, Marques RJ, Vicente JA, Santos MS, Monteiro P, Moreno AJ, et al. Sildenafil citrate concentrations not affecting oxidative phosphorylation depress H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation by rat heart mitochondria. *Mol Cell Biochem*. 2008;309(1-2):77-85.
257. Oliveira PJ, Rolo AP, Monteiro P, Goncalves L, Palmeira CM, Moreno AJ. Impact of carvedilol on the mitochondrial damage induced by hypoxanthine and

xantine oxidase--what role in myocardial ischemia and reperfusion? *Rev Port Cardiol.* 2002;21(12):1447-55.

258. Fujita T, Fujimoto Y. [Formation and removal of active oxygen species and lipid peroxides in biological systems]. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 1992;99(6):381-9.

259. Kong S, Davison AJ. The role of interactions between O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, .OH, e<sup>-</sup> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> in free radical damage to biological systems. *Arch Biochem Biophys.* 1980;204(1):18-29.

260. Kong S, Davison AJ. The relative effectiveness of .OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, and reducing free radicals in causing damage to biomembranes. A study of radiation damage to erythrocyte ghosts using selective free radical scavengers. *Biochim Biophys Acta.* 1981;640(1):313-25.

261. Camacho M, Martinez-Gonzalez J, Rodriguez C, Siguero L, Seriola C, Romero JM, et al. Imidazolineoxyl N-oxide induces COX-2 in endothelial cells: role of free radicals. *Front Biosci (Elite Ed).* 2012;4:2654-69.

262. Xiao Y, Gu Y, Purwaha P, Ni K, Law B, Mallik S, et al. Characterization of free radicals formed from COX-catalyzed DGLA peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 2011;50(9):1163-70.

263. Yu Q, Purwaha P, Ni K, Sun C, Mallik S, Qian SY. Characterization of novel radicals from COX-catalyzed arachidonic acid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(5):568-76.

264. Mobert J, Becker BF. Cyclooxygenase inhibition aggravates ischemia-reperfusion injury in the perfused guinea pig heart: involvement of isoprostanes. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31(7):1687-94.

265. Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Cyclooxygenase-dependent formation of the isoprostane, 8-epi prostaglandin F<sub>2</sub> alpha. *J Biol Chem.* 1995;270(17):9800-8.

266. Sun Pan B, Kuo YY, Chen TY, Liu YC. Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of two different species of a Chinese herb I-Tiao-Gung. *Life Sci.* 2005;77(22):2830-9.

267. Tyurina YY, Kapralov AA, Jiang J, Borisenko GG, Potapovich AI, Sorokin A, et al. Oxidation and cytotoxicity of 6-OHDA are mediated by reactive intermediates of COX-2 overexpressed in PC12 cells. *Brain Res.* 2006;1093(1):71-82.

- 268.Salem TA, El-Refaei MF, Badra GA. Study of antioxidant enzymes level and phagocytic activity in chronic liver disease patients. *Egypt J Immunol.* 2003;10(1):37-45.
- 269.Curi TC, De Melo MP, Palanch AC, Miyasaka CK, Curi R. Percentage of phagocytosis, production of O<sub>2</sub>·<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO, and antioxidant enzyme activities of rat neutrophils in culture. *Cell Biochem Funct.* 1998;16(1):43-9.
- 270.elSisi AE, Earnest DL, Sipes IG. Vitamin A potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity: role of liver macrophages and active oxygen species. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1993;119(2):295-301.
- 271.Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. *J Pineal Res.* 1993;14(4):151-68.
- 272.Tesoriere L, D'Arpa D, Conti S, Giaccone V, Pintaudi AM, Livrea MA. Melatonin protects human red blood cells from oxidative hemolysis: new insights into the radical-scavenging activity. *J Pineal Res.* 1999;27(2):95-105.
- 273.Yoshida M, Fukuda A, Hara M, Terada A, Kitanaka Y, Owada S. Melatonin prevents the increase in hydroxyl radical-spin trap adduct formation caused by the addition of cisplatin in vitro. *Life Sci.* 2003;72(15):1773-80.
- 274.Lakshmi VM, Zenser TV, Davis BB. Mechanism of 3-(glutathion-S-yl)-benzidine formation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1994;125(2):256-63.
- 275.Dragsted LO. Biomarkers of exposure to vitamins A, C, and E and their relation to lipid and protein oxidation markers. *Eur J Nutr.* 2008;47 Suppl 2:3-18.
- 276.Pazdro R, Burgess JR. The role of vitamin E and oxidative stress in diabetes complications. *Mech Ageing Dev.* 2010;131(4):276-86.
- 277.Buyukhatipoglu H, Sezen Y, Yildiz A, Guntekin U, Bas M, Polat M, et al. Effects of statin use on total oxidant and antioxidant capacity and ceruloplasmin activity. *Clin Invest Med.* 2010;33(5):E313-20.
- 278.Ames BN, Atamna H, Killilea DW. Mineral and vitamin deficiencies can accelerate the mitochondrial decay of aging. *Mol Aspects Med.* 2005;26(4-5):363-78.

279. Calabrese V, Butterfield DA, Stella AM. Nutritional antioxidants and the heme oxygenase pathway of stress tolerance: novel targets for neuroprotection in Alzheimer's disease. *Ital J Biochem.* 2003;52(4):177-81.
280. Drobek-Slowik M, Karczewicz D, Safranow K. [The potential role of oxidative stress in the pathogenesis of the age-related macular degeneration (AMD)]. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2007;61:28-37.
281. Habdous M, Herbeth B, Vincent-Viry M, Lamont JV, Fitzgerald PS, Visvikis S, et al. Serum total antioxidant status, erythrocyte superoxide dismutase and whole-blood glutathione peroxidase activities in the Stanislas cohort: influencing factors and reference intervals. *Clin Chem Lab Med.* 2003;41(2):209-15.
282. Montagna O, Grosso R, Santoro A, Mautone A. [Plasma levels of the serum antioxidants (uric acid, ceruloplasmin, transferrin) in term and preterm neonates in the first week of life]. *Minerva Pediatr.* 1994;46(6):255-60.
283. Senol E, Ersoy A, Erdinc S, Sarandol E, Yurtkuran M. Oxidative stress and ferritin levels in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(2):665-72.
284. Jain SK. The accumulation of malonyldialdehyde, a product of fatty acid peroxidation, can disturb aminophospholipid organization in the membrane bilayer of human erythrocytes. *J Biol Chem.* 1984;259(6):3391-4.
285. Schallreuter KU, Moore J, Wood JM, Beazley WD, Gaze DC, Tobin DJ, et al. In vivo and in vitro evidence for hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) accumulation in the epidermis of patients with vitiligo and its successful removal by a UVB-activated pseudocatalase. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 1999;4(1):91-6.
286. Schellhorn HE. Regulation of hydroperoxidase (catalase) expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 1995;131(2):113-9.
287. del Rio LA, Sandalio LM, Palma JM, Bueno P, Corpas FJ. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radic Biol Med.* 1992;13(5):557-80.
288. Naziroglu M. Molecular role of catalase on oxidative stress-induced Ca<sup>2+</sup> signaling and TRP cation channel activation in nervous system. *J Recept Signal Transduct Res.* 2012;32(3):134-41.
289. Nishikawa M, Hashida M, Takakura Y. Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(4):319-26.



- 290.Csiszar J, Szabo M, Erdei L, Marton L, Horvath F, Tari I. Auxin autotrophic tobacco callus tissues resist oxidative stress: the importance of glutathione S-transferase and glutathione peroxidase activities in auxin heterotrophic and autotrophic calli. *J Plant Physiol.* 2004;161(6):691-9.
- 291.Llesuy SF, Tomaro ML. Heme oxygenase and oxidative stress. Evidence of involvement of bilirubin as physiological protector against oxidative damage. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1223(1):9-14.
- 292.Lopez-Torres M, Gil P, Barja de Quiroga G. Effect of hyperoxia acclimation on catalase and glutathione peroxidase activities and in vivo peroxidation products in various tissues of the frog *Rana ridibunda perezii*. *J Exp Zool.* 1988;248(1):7-18.
- 293.Spector A, Yang Y, Ho YS, Magnenat JL, Wang RR, Ma W, et al. Variation in cellular glutathione peroxidase activity in lens epithelial cells, transgenics and knockouts does not significantly change the response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. *Exp Eye Res.* 1996;62(5):521-40.
- 294.Ishigami M. [Superoxide dismutase (SOD)]. *Nihon Rinsho.* 2002;60 Suppl 8:475-85.
- 295.Peskin AV. Cu,Zn-superoxide dismutase gene dosage and cell resistance to oxidative stress: a review. *Biosci Rep.* 1997;17(1):85-9.
- 296.Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(6):1583-606.
- 297.Hileman EA, Achanta G, Huang P. Superoxide dismutase: an emerging target for cancer therapeutics. *Expert Opin Ther Targets.* 2001;5(6):697-710.
- 298.Skrzycki M, Czeczot H. [Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD)--structure, properties and functions]. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2004;58:301-11.
- 299.Mansouri A, Tarhuni A, Larosche I, Reyl-Desmars F, Demeilliers C, Degoul F, et al. MnSOD overexpression prevents liver mitochondrial DNA depletion after an alcohol binge but worsens this effect after prolonged alcohol consumption in mice. *Dig Dis.* 2010;28(6):756-75.
- 300.Ozden O, Park SH, Kim HS, Jiang H, Coleman MC, Spitz DR, et al. Acetylation of MnSOD directs enzymatic activity responding to cellular nutrient status or oxidative stress. *Aging (Albany NY).* 2011;3(2):102-7.

301. Fujii J, Myint T, Okado A, Kaneto H, Taniguchi N. Oxidative stress caused by glycation of Cu,Zn-superoxide dismutase and its effects on intracellular components. *Nephrol Dial Transplant*. 1996;11 Suppl 5:34-40.
302. Nur E, Brandjes DP, Schnog JJ, Otten HM, Fijnvandraat K, Schalkwijk CG, et al. Plasma levels of advanced glycation end products are associated with haemolysis-related organ complications in sickle cell patients. *Br J Haematol*. 2010;151(1):62-9.
303. Beetsch JW, Park TS, Dugan LL, Shah AR, Gidday JM. Xanthine oxidase-derived superoxide causes reoxygenation injury of ischemic cerebral endothelial cells. *Brain Res*. 1998;786(1-2):89-95.
304. Hamer I, Wattiaux R, Wattiaux-De Coninck S. Deleterious effects of xanthine oxidase on rat liver endothelial cells after ischemia/reperfusion. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1269(2):145-52.
305. Belcher JD, Mahaseth H, Welch TE, Vilback AE, Sonbol KM, Kalambur VS, et al. Critical role of endothelial cell activation in hypoxia-induced vasoocclusion in transgenic sickle mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(6):H2715-25.
306. Solovey A, Gui L, Key NS, Hebbel RP. Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anemia. *J Clin Invest*. 1998;101(9):1899-904.
307. Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. *Curr Opin Hematol*. 2002;9(2):101-6.
308. Bank N, Aynedjian HS, Qiu JH, Osei SY, Ahima RS, Fabry ME, et al. Renal nitric oxide synthases in transgenic sickle cell mice. *Kidney Int*. 1996;50(1):184-9.
309. Diwan BA, Gladwin MT, Noguchi CT, Ward JM, Fitzhugh AL, Buzard GS. Renal pathology in hemizygous sickle cell mice. *Toxicol Pathol*. 2002;30(2):254-62.
310. Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rep*. 2003;5(6):473-80.
311. Wood KC, Hebbel RP, Lefer DJ, Granger DN. Critical role of endothelial cell-derived nitric oxide synthase in sickle cell disease-induced microvascular dysfunction. *Free Radic Biol Med*. 2006;40(8):1443-53.
312. Gladwin MT, Schechter AN, Shelhamer JH, Pannell LK, Conway DA, Hrinchenko BW, et al. Inhaled nitric oxide augments nitric oxide transport on sickle cell hemoglobin without affecting oxygen affinity. *J Clin Invest*. 1999;104(7):937-45.

313. Wood KC, Granger DN. Sick cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007;34(9):926-32.
314. Schindhelm RK, van der Zwan LP, Teerlink T, Scheffer PG. Myeloperoxidase: a useful biomarker for cardiovascular disease risk stratification? *Clin Chem.* 2009;55(8):1462-70.
315. Shao B, Oda MN, Oram JF, Heinecke JW. Myeloperoxidase: an oxidative pathway for generating dysfunctional high-density lipoprotein. *Chem Res Toxicol.* 2010;23(3):447-54.
316. White WL, Erickson MM, Stevens SC. *Chemistry for the clinical laboratory.* CV Mosby Comp. St Louis. 126. 01/03/1976.
317. Aebi H. Catalase In: *Methods of enzymatic analysis.* New York and London Academic Press; pp.673-677, 1974.
318. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab & Clin Med* 1967; 70:158-169.
319. Kornberg, Horecker. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. . In *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York. 1955;1:323.
320. Lohr GW, Arnold H, Blume KG, Engelhardt R, Beutler E. Hereditary deficiency of glucosephosphate isomerase as a cause of nonspherocytic hemolytic anemia. *Blut.* 1973;26(6):393-8.
321. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988;34(3):497-500.
322. Durak I, Yurtarslanl Z, Canbolat O, Akyol O. A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin Chim Acta.* 1993;214(1):103-4.
323. Hammouda Ae-R, Khalil MM, Salem A. Lipid peroxidation products in pleural fluid for separation of transudates and exudates. *Clin Chem.* 1995;41(9):1314-5.
324. Curuk MA, Zeren F, Genc A, Ozavci-Aygun S, Kilinc Y, Aksoy K. Prenatal diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia in southern Turkey. *Hemoglobin.* 2008;32(6):525-30.

- 325.Chaves MA, Leonart MS, do Nascimento AJ. Oxidative process in erythrocytes of individuals with hemoglobin S. *Hematology*. 2008;13(3):187-92.
- 326.Aslan M, Freeman BA. Oxidases and oxygenases in regulation of vascular nitric oxide signaling and inflammatory responses. *Immunol Res*. 2002;26(1-3):107-18.
- 327.Landburg PP, Teerlink T, Biemond BJ, Brandjes DP, Muskiet FA, Duits AJ, et al. Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in sickle cell disease are related to the hemolytic phenotype. *Blood Cells Mol Dis*. 2010;44(4):229-32.
- 328.Xia Y, Berlowitz CO, Zweier JL. PIN inhibits nitric oxide and superoxide production from purified neuronal nitric oxide synthase. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1760(9):1445-9.
- 329.Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(13):6770-4.
- 330.Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V, et al. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA*. 2005;294(1):81-90.
- 331.Amer J, Ghoti H, Rachmilewitz E, Koren A, Levin C, Fibach E. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. *Br J Haematol*. 2006;132(1):108-13.
- 332.Schacter L, Warth JA, Gordon EM, Prasad A, Klein BL. Altered amount and activity of superoxide dismutase in sickle cell anemia. *FASEB J*. 1988;2(3):237-43.
- 333.Aslan M, Freeman BA. Oxidant-mediated impairment of nitric oxide signaling in sickle cell disease--mechanisms and consequences. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2004;50(1):95-105.
- 334.Amer J, Fibach E. Chronic oxidative stress reduces the respiratory burst response of neutrophils from beta-thalassaemia patients. *Br J Haematol*. 2005;129(3):435-41.
- 335.Amer J, Goldfarb A, Fibach E. Flow cytometric measurement of reactive oxygen species production by normal and thalassaemic red blood cells. *Eur J Haematol*. 2003;70(2):84-90.

- 336.Meng XM. [Mechanism of damage to erythrocytes after burn injury in rat--changes in lipid peroxidation, antioxidant function and sulfhydryl groups]. *Zhonghua Zheng Xing Shao Shang Wai Ke Za Zhi*. 1991;7(3):205-7, 40.
- 337.Repka T, Hebbel RP. Hydroxyl radical formation by sickle erythrocyte membranes: role of pathologic iron deposits and cytoplasmic reducing agents. *Blood*. 1991;78(10):2753-8.
- 338.Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA*. 2005;293(13):1653-62.
- 339.Jain SK, Ross JD, Levy GJ, Duett J. The effect of malonyldialdehyde on viscosity of normal and sickle red blood cells. *Biochem Med Metab Biol*. 1990;44(1):37-41.
- 340.Manfredini V, Lazzaretti LL, Griebeler IH, Santin AP, Brandao VD, Wagner S, et al. Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. *J Natl Med Assoc*. 2008;100(8):897-902.
- 341.Oztas YE, Sabuncuoglu S, Unal S, Ozgunes H, Ozgunes N. Hypocholesterolemia is associated negatively with hemolysate lipid peroxidation in sickle cell anemia patients. *Clin Exp Med*. 2011;11(3):195-8.
- 342.Natta CL, Chen LC, Chow CK. Selenium and glutathione peroxidase levels in sickle cell anemia. *Acta Haematol*. 1990;83(3):130-2.
- 343.Das SK, Nair RC. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation of normal and sickled erythrocytes. *Br J Haematol*. 1980;44(1):87-92.
- 344.Morris CR, Suh JH, Hagar W, Larkin S, Bland DA, Steinberg MH, et al. Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood*. 2008;111(1):402-10.
- 345.Burnett AL, Bivalacqua TJ. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: an etiology for idiopathic priapism? *J Sex Med*. 2008;5(1):237-40.
- 346.Francis RO, Jhang J, Hendrickson JE, Zimring JC, Hod EA, Spitalnik SL. Frequency of glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient red blood cell units in a metropolitan transfusion service. *Transfusion*. 2012.

347. Destro Bisol G. Genetic resistance to malaria, oxidative stress and hemoglobin oxidation. *Parassitologia*. 1999;41(1-3):203-4.
348. Gladwin MT, Schechter AN, Ognibene FP, Coles WA, Reiter CD, Schenke WH, et al. Divergent nitric oxide bioavailability in men and women with sickle cell disease. *Circulation*. 2003;107(2):271-8.
349. Aslan A, Karaguzel G, Celik M, Uysal N, Yucel G, Melikoglu M. Pentoxifylline contributes to the hepatic cytoprotective process in rats undergoing hepatic ischemia and reperfusion injury. *Eur Surg Res*. 2001;33(4):285-90.
350. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, 3rd, Schechter AN, et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med*. 2002;8(12):1383-9.
351. Nath KA, Grande JP, Croatt AJ, Frank E, Caplice NM, Hebbel RP, et al. Transgenic sickle mice are markedly sensitive to renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol*. 2005;166(4):963-72.
352. Morris CR, Gladwin MT, Kato GJ. Nitric oxide and arginine dysregulation: a novel pathway to pulmonary hypertension in hemolytic disorders. *Curr Mol Med*. 2008;8(7):620-32.
353. MacLauchlan S, Yu J, Parrish M, Asoulin TA, Schleicher M, Krady MM, et al. Endothelial nitric oxide synthase controls the expression of the angiogenesis inhibitor thrombospondin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(46):E1137-45.
354. Tian J, Hou Y, Lu Q, Wiseman DA, Vasconcelos F, Elms S, et al. A novel role for caveolin-1 in regulating endothelial nitric oxide synthase activation in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and shear stress. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(2):159-70.
355. Blum A, Yeganeh S, Peleg A, Vigder F, Kryuger K, Khatib A, et al. Endothelial function in patients with sickle cell anemia during and after sickle cell crises. *J Thromb Thrombolysis*. 2005;19(2):83-6.
356. Chang WL, Corate LM, Sinclair JM, van der Heyde HC. Continuous inhaled nitric oxide therapy in a case of sickle cell disease with multiorgan involvement. *J Investig Med*. 2008;56(8):1023-7.
357. Morris CR, Vichinsky EP, van Warmerdam J, Machado L, Kepka-Lenhart D, Morris SM, Jr., et al. Hydroxyurea and arginine therapy: impact on nitric oxide production in sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2003;25(8):629-34.

- 358.Pawar SS, Panepinto JA, Brousseau DC. The effect of acute pain crisis on exhaled nitric oxide levels in children with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;50(1):111-3.
- 359.Sullivan KJ, Kissoon N, Sandler E, Gauger C, Froyen M, Duckworth L, et al. Effect of oral arginine supplementation on exhaled nitric oxide concentration in sickle cell anemia and acute chest syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2010;32(7):e249-58.
- 360.Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML, Ma W, Zhang C, Tousson A, et al. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science*. 2002;296(5577):2391-4.
- 361.Baldus S, Eiserich JP, Brennan ML, Jackson RM, Alexander CB, Freeman BA. Spatial mapping of pulmonary and vascular nitrotyrosine reveals the pivotal role of myeloperoxidase as a catalyst for tyrosine nitration in inflammatory diseases. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(7):1010.
- 362.Middleton J, Patterson AM, Gardner L, Schmutz C, Ashton BA. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood*. 2002;100(12):3853-60.
- 363.Tan P, Lusinskas FW, Homer-Vanniasinkam S. Cellular and molecular mechanisms of inflammation and thrombosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1999;17(5):373-89.
- 364.Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Heibel RP. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med*. 1997;337(22):1584-90.
- 365.Liem RI, O'Gorman MR, Brown DL. Effect of red cell exchange transfusion on plasma levels of inflammatory mediators in sickle cell patients with acute chest syndrome. *Am J Hematol*. 2004;76(1):19-25.
- 366.Michaels LA, Ohene-Frempong K, Zhao H, Douglas SD. Serum levels of substance P are elevated in patients with sickle cell disease and increase further during vaso-occlusive crisis. *Blood*. 1998;92(9):3148-51.
- 367.Prasad AS. Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2009;12(6):646-52.
- 368.Qari MH, Dier U, Mousa SA. Biomarkers of inflammation, growth factor, and coagulation activation in patients with sickle cell disease. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2012;18(2):195-200.

369. Francis RB, Jr., Haywood LJ. Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease. *J Natl Med Assoc.* 1992;84(7):611-5.
370. Hoppe C, Klitz W, D'Harlingue K, Cheng S, Grow M, Steiner L, et al. Confirmation of an association between the TNF(-308) promoter polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Stroke.* 2007;38(8):2241-6.
371. Chies JA, Nardi NB. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. *Med Hypotheses.* 2001;57(1):46-50.
372. Pathare A, Al Kindi S, Alnaqdy AA, Daar S, Knox-Macaulay H, Dennison D. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. *Am J Hematol.* 2004;77(4):323-8.
373. Hibbert JM, Hsu LL, Bhathena SJ, Irune I, Sarfo B, Creary MS, et al. Proinflammatory cytokines and the hypermetabolism of children with sickle cell disease. *Exp Biol Med.* 2005;230(1):68-74.
374. Vicari P, Silva GS, Nogutti MA, Neto FM, dos Santos NJ, Massaro AR, et al. Absence of association between TNF-alpha polymorphism and cerebral large-vessel abnormalities in adults with sickle cell anemia. *Acta Haematol.* 2011;125(3):141-4.
375. Hoppe C, Klitz W, Cheng S, Apple R, Steiner L, Robles L, et al. Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Blood.* 2004;103(6):2391-6.
376. Hedo CC, Aken'ova YA, Okpala IE, Durojaiye AO, Salimonu LS. Acute phase reactants and severity of homozygous sickle cell disease. *J Intern Med.* 1993;233(6):467-70.
377. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation.* 2003;107(3):391-7.
378. Klings ES, Farber HW. Role of free radicals in the pathogenesis of acute chest syndrome in sickle cell disease. *Respir Res.* 2001;2(5):280-5.
379. Kirkpantur A, Altun B, Hazirolan T, Akata D, Arici M, Kirazli S, et al. Association among serum fetuin-A level, coronary artery calcification, and bone mineral densitometry in maintenance hemodialysis patients. *Artif Organs.* 2009;33(10):844-54.



380. Dogru T, Genc H, Tapan S, Aslan F, Ercin CN, Ors F, et al. Plasma fetuin-A is associated with endothelial dysfunction and subclinical atherosclerosis in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012.
381. Lorant DP, Grujicic M, Hoebaus C, Brix JM, Hoellerl F, Scherthaner G, et al. Fetuin-A levels are increased in patients with type 2 diabetes and peripheral arterial disease. *Diabetes Care*. 2011;34(1):156-61.
382. Emoto M, Mori K, Lee E, Kawano N, Yamazaki Y, Tsuchikura S, et al. Fetuin-A and atherosclerotic calcified plaque in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2010;59(6):873-8.
383. Szeberin Z, Fehervari M, Krepuska M, Apor A, Rimely E, Sarkadi H, et al. Serum fetuin-A levels inversely correlate with the severity of arterial calcification in patients with chronic lower extremity atherosclerosis without renal disease. *Int Angiol*. 2011;30(5):474-50.
384. Westenfeld R, Schafer C, Kruger T, Haarmann C, Schurgers LJ, Reutelingsperger C, et al. Fetuin-A protects against atherosclerotic calcification in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(6):1264-74.
385. Bereal-Williams C, Machado R, McGowan V, Chi A, Hunter CJ, Kato GJ. Atorvastatin reduces serum cholesterol and triglycerides with limited improvement in vascular function in adults with sickle cell anemia. *Haematologica*. 2012.
386. Elsharawy MA, Moghazy KM, Shawarby MA. Atherosclerosis in sickle cell disease - a review. *Int J Angiol*. 2009;18(2):62-6.
387. Hoppe C, Kuypers F, Larkin S, Hagar W, Vichinsky E, Styles L. A pilot study of the short-term use of simvastatin in sickle cell disease: effects on markers of vascular dysfunction. *Br J Haematol*. 2011;153(5):655-63.
388. Keegan PM, Surapaneni S, Platt MO. Sickle cell disease activates peripheral blood mononuclear cells to induce cathepsins k and v activity in endothelial cells. *Anemia*. 2012;2012:201781.
389. Yuditskaya S, Tumblin A, Hoehn GT, Wang G, Drake SK, Xu X, et al. Proteomic identification of altered apolipoprotein patterns in pulmonary hypertension and vasculopathy of sickle cell disease. *Blood*. 2009;113(5):1122-8.
390. Chen HY, Chiu YL, Chuang YF, Hsu SP, Pai MF, Lai CF, et al. Association of low serum fetuin A levels with poor arteriovenous access patency in patients undergoing maintenance hemodialysis. *Am J Kidney Dis*. 2010;56(4):720-7.

391. Coen G, De Paolis P, Ballanti P, Pierantozzi A, Pisano S, Sardella D, et al. Peripheral artery calcifications evaluated by histology correlate to those detected by CT: relationships with fetuin-A and FGF-23. *J Nephrol.* 2011;24(3):313-21.
392. Oikawa O, Higuchi T, Yamazaki T, Yamamoto C, Fukuda N, Matsumoto K. Evaluation of serum fetuin-A relationships with biochemical parameters in patients on hemodialysis. *Clin Exp Nephrol.* 2007;11(4):304-8.
393. Ziolkowska H, Wojnar J, Panczyk-Tomaszewska M, Roszkowska-Blaim M. [Fetuin A in children with renal diseases]. *Przegl Lek.* 2006;63 Suppl 3:54-6.
394. Coen G, Manni M, Agnoli A, Balducci A, Dessi M, De Angelis S, et al. Cardiac calcifications: Fetuin-A and other risk factors in hemodialysis patients. *ASAIO J.* 2006;52(2):150-6.
395. Odamaki M, Shibata T, Takita T, Kumagai H. Serum fetuin-A and aortic calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2005;68(6):2915; author reply 6.
396. Stenvinkel P, Wang K, Qureshi AR, Axelsson J, Pecoits-Filho R, Gao P, et al. Low fetuin-A levels are associated with cardiovascular death: Impact of variations in the gene encoding fetuin. *Kidney Int.* 2005;67(6):2383-92.
397. Zhang B, Shi W, He CS, Liang XL, Liu SX, Liang YZ. [Low serum fetuin A is a risk factor of coronary artery calcification in patients starting hemodialysis]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2010;30(5):1002-4.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

Aralık 1983’de Hatay’ın İskenderun ilçesinde dünyaya geldi. İlkokulu Mithatpaşa ilköğretim okulunda okudu. Orta ve lise dönemlerini, 1992-2000 yılları arasında İbni Sina Anadolu Lisesi’de tamamladı. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesinde 2000 yılında tıp eğitimine başladı. Tıp fakültesinden Temmuz 2007’de mezun oldu ve Aralık 2007’de Belen sağlık ocağında 14 ay süre ile mecburi hizmet görevini yerine getirdi. Şubat 2009’da Mustafa Kemal Üniversitesi Tıbbi Biyokimya uzmanlığını kazanınca, mecburi hizmetinden ayrılarak uzmanlık eğitimine başladı. Halen biyokimya asistanı olarak görevine devam etmektedir.