

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ORAK HÜCRE ANEMİLİ HASTALARDA, OKSİDATİF STRES
BELİRTECİ OLARAK 8-HİDROKSİ DEOKSİ GUANOZİN,
MALONİL DİALDEHİT VE PROTEİN KARBONİL
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hasret ECEVİT

Danışman

Doç. Dr. Oktay Hasan ÖZTÜRK

HATAY – 2013

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ORAK HÜCRE ANEMİLİ HASTALARDA, OKSİDATİF STRES
BELİRTECİ OLARAK 8-HİDROKSİ DEOKSİ GUANOZİN,
MALONİL DİALDEHİT VE PROTEİN KARBONİL
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Hasret ECEVİT

Danışman
Doç. Dr. Oktay Hasan ÖZTÜRK

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
1207 Y 0113 nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY – 2013

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ORAK HÜCRE ANEMİLİ HASTALARDA, OKSİDATİF STRES
BELİRTECİ OLARAK 8-HİDROKSİ DEOKSİ GUANOZİN,
MALONİL DİALDEHİT VE PROTEİN KARBONİL
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi
Hasret ECEVİT

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 26/06/2013 günü sözlü olarak yapılan
tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri başkanı: Doç. Dr. Oktay Hasan ÖZTÜRK

Üye: Doç. Dr. Zafer YÖNDEN

Üye: Yrd. Doç. Dr. Müzeyyen İZMİRLİ

Bu tez, Enstitümüz Tıp Biyokimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım saygıdeğer bölüm hocalarım sayın Prof. Dr. Ali ÖZCAN, Doç. Dr. O.Hasan ÖZTÜRK, Doç. Dr. Zafer YÖNDEN ve Yrd. Doç. Dr. Sedat MOTOR'a teşekkür ederim.

Öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, hoşgörü ve sabırla her konuda beni destekleyen tez danışmanım sayın Doç.Dr.O.Hasan ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Akademik bilgi ve tecrübeleriyle, yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen, yetişmemde büyük emeği olan saygıdeğer hocam sayın Doç.Dr.Zafer YÖNDEN'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli asistan arkadaşlarıma yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Tezimin yazım ve çalışma aşamasında yardımını esirgemeyen Dr.A.Burak GÜRPINAR ve Dr.Yeşim CAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamı, 1207 Y 0113 nolu proje olarak destekleyen Mustafa Kemal Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Her konuda olduğu gibi yüksek lisans eğitimim boyunca da desteğini esirgemeyen canım ailem Havvas-Nura ECEVİT ve kardeşim Kısmet'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Kabul ve Onay.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
ÖZET.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Hemoglobinin Yapısı.....	5
2.1.1. Hemin Yapısı.....	6
2.1.2. Normal Hemoglobinler.....	9
2.1.3. Hemoglobin Sentezi.....	10
2.1.4. Hemoglobinopatiler.....	12
2.1.5. Anormal Hemoglobinler.....	13
2.2. Orak Hücre Anemisi.....	14
2.2.1. Tarihçe.....	14
2.2.2. Coğrafik Yayılım.....	15
2.2.3. Genetik.....	16
2.2.4. Patofizyoloji.....	18
2.3. Oksidatif Stres.....	22

2.3.1. Reaktif oksijen türleri.....	25
2.3.2. Süperoksit Radikali (O ₂ ^{·-}).....	27
2.3.3. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂).....	28
2.3.4. Hidroksil radikali (·OH)	28
2.3.5. Singlet Oksijen (1O ₂).....	30
2.3.6. Nitrik Oksit (NO [·]).....	30
2.3.7. Serbest Radikallerin Etkileri.....	31
2.3.8. DNA ve Nükleik Asitlere Etkileri.....	31
2.3.9. Proteinlere Etkileri.....	32
2.3.10. Karbonhidratlara Etkileri.....	34
2.3.11. Lipitlere Etkileri.....	34
2.4. Antioksidan Sistemler.....	37
2.4.1. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	39
2.4.2. Enzimatik Antioksidanlar	42
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	48
3.1. Çalışma Şekli.....	48
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	48
3.3. Kimyasal Maddeler.....	49
3.4. Hematolojik Analizler.....	49
3.4.1. Total Protein Miktar Tayini.....	49
3.4.2. Manuel Spektrofotometrik Yöntem ile Protein Karbonil Tayini.....	49
3.4.3. ELISA Yöntemi ile Protein Karbonil Tayini.....	51
3.4.4. Manüel Spektrofotometrik Yöntem ile MDA Tayin.....	54
3.4.5. ELISA Yöntemi ile MDA Tayini.....	56
3.4.6. 8-OHdG Ölçümü.....	58
3.5. İstatistiksel Analiz	60
4. BULGULAR.....	61
4.1. ELISA Yöntemi ile MDA Tayini İstatistik Verileri.....	63
4.2. Manüel Spektrofotometrik Yöntem ile MDA Tayini İstatistik Verileri	64
4.3. 8-OHdG Ölçümü İstatistik Verileri.....	65
4.4. ELISA Yöntemi ile Protein Karbonil Tayini İstatistik Verileri.....	66
4.5. Manuel Spektrofotometrik Yöntem ile Protein Karbonil	

Tayini İstatistik Verileri.....	67
5. TARTIŞMA.....	68
6. SONUÇ.....	74
7. KAYNAKLAR.....	75
ÖZGEÇMİŞ.....	86

Şekiller Dizini

	Sayfa No
Şekil 2.1. Hemoglobinin yapısı.....	6
Şekil 2.2. Hem'in ferruz demir oluşturduğu tetrapiral yapı.....	7
Şekil 2.3. Hemoglobinin üç boyutlu yapısında meydana gelen değişiklik.....	8
Şekil 2.4. Globin zincir sentezinin evreleri.....	11
Şekil 2.5. Talasemi,orak hücre anemisi ve diğer yaygın hemoglobin hastalıklarının dünya üzerindeki yayılımı.....	13
Şekil 2.6. HbS allelinin Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından kabul gören dağılım haritası.....	16
Şekil 2.7. Orak hücre hastalığının fizyopatolojisi.....	20
Şekil 2.8. OHA hastasına ait periferik yayma örneği	21
Şekil 2.9. Oksijen molekülünün orbital yapısı	24
Şekil 2.10. PUFA'ların genel yapıları	35
Şekil 2.11. Lipit peroksidasyonu ve parçalanma ürünleri	36
Şekil 2.12. MDA' nın biyolojik moleküllerle çapraz bağ yapmasıyla oluşan Schiff bazı.....	37
Şekil 2.13. MDA ile Tiyobarbitürik asitin reaksiyonu	37
Şekil 2.14. Radikallerin yol açtığı hücre hasarı	38
Şekil 2.15. Glutatyon redoks döngüsü	45
Şekil 3.1. MDA'nın TBA ile reaksiyonu ve oluşan renkli TBA-MDA kompleksinin yapısı	54
Şekil 4.1. MDA seviyelerinin OHA ve kontrol gruplarına göre dağılımı	63
Şekil 4.2. MDA seviyelerinin OHA ve kontrol gruplarına göre dağılımı	64
Şekil 4.3 MDA seviyelerinin OHA ve kontrol gruplarına göre dağılımı	64
Şekil 4.4. 8-OHdG seviyelerinin OHA ve kontrol gruplarına göre dağılımı.....	65
Şekil 4.5. Protein karbonil seviyelerinin OHA ve kontrol gruplarına göre dağılımı.....	66
Şekil 4.6. Protein karbonil seviyelerinin OHA ve kontrol gruplarına göre dağılımı.....	67

Çizelgeler Dizini

	Sayfa No
Çizelge 2.1. Hemoglobin tipleri	12
Çizelge 2.2. Radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri	23
Çizelge 2.3. Oksidatif stres ile ilişkili bazı hastalıklar	25
Çizelge 2.4. Oksijenin indirgenmesi	26
Çizelge 3.1. MDA çalışma tablosu 1.	55
Çizelge 3.2. MDA çalışma tablosu 2.	55
Çizelge 4.1. Kontrol ve hasta grubun demografik özellikleri	62
Çizelge 4.2. Hasta ve kontrol grubunun MDA, protein karbonil ve 8-OHdG oksidatif stres parametrelerine ait ortalama, standart sapma ve istatistiksel analiz verileri.....	62

Simge ve Kısaltmalar Dizini

α	: Alfa
A	: Adenin
AOPP	: Advanced oxidation protein products
β	: Beta
C	: Sitozin
Ca	: Kalsiyum
CAT	: Katalaz
Cp	: Seruloplazmin
Cu	: Bakır
δ	: Delta
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DNPH	: Dinitrofenilhidrazin
ϵ	: Epsilon
EC-SOD	: Ekstrasellüler süperoksit dismutaz
ELISA	: Enzim Linked Immunosorbent Assay
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
Fe	: Demir
G	: Guanin
γ	: Gamma
Glu	: Glutamik asit
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Redükte glutasyon
GSH-Rd	: Glutasyon redüktaz
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSSG	: Okside glutasyon
G6PD	: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
GST	: Glutasyon S transferaz

Hb	: Hemoglobin
HCl	: Hidroklorik asit
His	: Histidin
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HOCl	: Hipoklorit
Hp	: Haptoglobin
HPFH	: Hereditary persistence of fetal hemoglobin
ISC	: Irreversible sickle cell (Geri dönüşsüz orak hücreler)
IV	: İspirasyon volümü
KH	: Karbonhidrat
L [·]	: Radikal yağ asidi zinciri
Leu	: Lösin
LOO [·]	: Lipit peroksit radikali
LOOH	: Lipit hidroperoksit
LPO	: Lipit peroksidasyonu
Lys	: Lizin
MDA	: Malondialdehit
Mn	: Mangan/Manganez
NADH	: Redükte nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	: Redükte nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NaOH	: Sodyum hidroksit
NO	: Nitrik Oksit
3-NT	: 3-Nitrotirozin
O ₂ [·]	: Süperoksit radikali
[·] OH	: Hidroksil radikali
OHA	: Orak Hücre Anemisi
8-OHdG	: 8-Hidroksi-deoksiguanozin
ONOO-	: Peroksinitrit
ONOOH	: Peroksinitröz
PC	: Protein karbonil
PCC	: Protein karbonil bileşikleri
Pro	: Prolin

PUFA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
R form	: Relaxed form
RBC	: Eritrosit (Kırmızı Kan Hücresi)
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROOH	: Organik peroksit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SCA	: Sickle Cell Anemia
Se	: Selenyum
-SH	: Sülfidril grubu
SOD	: Süperoksit dismutaz
T	: Timin
T form	: Tight form
TBA	: Tiobarbitürik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
Thr	: Treonin
Trx	: Oksidoredüktaz enzim aktivitesi gösteren tiyoredoksin
TrxR	: Tiyoredoksin redüktaz
Val	: Valin
WHO	: World Health Organization
ζ	: Zeta
Zn	: Çinko

ÖZET

Orak Hücreli Anemili Hastalarda, Oksidatif Stres Belirteci Olarak 8-OHdG (8-Hidroksi Deoksi Guanozin), MDA(Malonil Dialdehit) ve PC (Protein Karbonil) Düzeylerinin Araştırılması

Orak hücre anemisi, Çukurova bölgesinde yaygın görülen, vasküler seviyede kronik inflamasyona sebebiyet veren mikrovasküler hipoksik ve reperfüzyon süreci ile karakterize olan konjenital bir hemoglobinopatidir. Bu çalışmada, oksidatif stres belirteci olarak serum 8-hidroksi deoksi guanozin (8-OHdG), malonildialdehit (MDA) ve protein karbonil (PC) düzeylerinin belirlenmesi amaçlandı.

Çalışmaya OHA hastası olan 18 yaş altı hastalar (n=45) ve sağlıklı bireyler (n=38) dahil edildi. Serum örneklerinden 8-OHdG ELISA yöntemiyle, MDA ve PC düzeyleri hem ELISA hem spektrofotometrik yöntemle çalışıldı.

OHA grubu ve kontrol grubu karşılaştırıldığında, OHA grubunda ELISA yöntemiyle ölçülen 8-OHdG ($p=0,0243$) düzeyleri istatistiksel olarak yüksek tespit edildi. PC ve MDA düzeyleri manuel spektrofotometrik yöntem ile çalışıldığında OHA grubunda istatistiksel olarak yüksek tespit edildi ($p<0,0001$). PC ve MDA düzeyleri ELISA yöntemiyle çalışıldığında ise OHA ve kontrol grubu arasında istatistiksel fark gözlenmedi ($p>0,05$).

Orak hücreli anemili hastalarda, DNA'nın yapısındaki guaninin oksidatif modifikasyonu sonucu oluşan 8-OHdG, lipid peroksidasyon ürünü olan MDA ve protein oksidasyonu sonucu oluşan PC düzeylerinin yüksek olması, bu parametrelerin artmış oksidatif stres ile ilişkisine dayanarak OHA'nın patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Orak Hücreli Anemi, Oksidatif Stres, 8-hidroksi-deoksiguanozin, Malondialdehit, Protein karbonil.

ABSTRACT

The Research of 8-OHdG (8-Hydroxy-deoxyguanosine), MDA (Malondialdehyde) and PC (Protein Carbonyl) Levels in the Patients with Sickle Cell Anemia as a Indicator of Oxidative Stress

Sickle cell anemia (SCA), common disease in Çukurova region, is a congenital hemoglobinopathy and microvascular hypoxia-reperfusion process giving rise to chronic inflammation along vascular structure. In the study, as a indicator of oxidative stres 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG), malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl (PC) levels were aimed to determine from serum samples.

Patients, who suffer from SCD (n=45), and healthy controls (n=38) under the age of 18 were included the study. 8-OHdG levels were measured by ELISA method, MDA and PC levels were measured by both ELISA and spectrophotometric method from serum samples.

8-OHdG ($p=0,0243$) levels that studied by ELISA method were higher, in SCA group when compared with the control group. When PC and MDA levels studied by manual spectrophotometric method, levels were higher in SCA group ($p<0,0001$). When PC and MDA levels studied by ELISA method, there was no statistical significance between SCA and kontrol group ($p>0,05$).

Elevated 8-OHdG (forms as aresult of oxidative modification of guanine in DNA structure), MDA (the product of lipid peroxidation) and PC (occurs as aresult of protein oxidation) levels in patients with SCA demonstrated that these parameters had an important role for pathophysiology of SCA in terms of relationship with oxidative stress.

Keywords: Sickle Cell Anemia, Oxidative Stress, 8-hydroxy-deoxyguanosine, Malondialdehyde, Protein carbonyl.

1.GİRİŞ

Eritrositlerde oraklaşma, ilk defa 1910 yılında anemik zencilerin kanında J.B.Herrick tarafından saptanmış, 20 yaşında bir hemolitik anemili hastanın periferik yaymasında orak hücrelerin görülmesi ile tanımlanmıştır (Herrick 1910; Harmening 1997). 1923 yılında bu bozukluğun otozomal resesif yolla geçtiği tespit edilmiştir (Platt ve Dover 1993). 1927 yılında Hahn ve Gillepsie orak hücre anemisinin (OHA) patolojik temelini ve hemoglobin (Hb) molekülü ile ilgisini tanımladı (Herrick 1940; Hahn ve Gillepsie 1927). 1949 yılında Pauling ve arkadaşları orak hücre anemili hastaların hemoglobin elektroforezinin anormal olduğunu tespit ederek, elektroforetik olarak HbA'dan daha yavaş hareket eden bu anormal proteine HbS veya 'sickle hemoglobin' adını vermişlerdir. Ingram,1957 yılında hemoglobinin β zincirinin altıncı pozisyonundaki glutamik asit yerine valinin geçmesi sonucu bu hastalığın oluştuğunu ispat etmiştir. (Platt ve Dover 1993; Lukens 1993).

Orta Afrika OHA'nin en sık görüldüğü bölgelerden biridir. Bu bölgedeki bazı etnik gruplarda % 40 dolayında taşıyıcılık saptanmıştır (Dover ve Platt 2003; Kılınç ve ark. 1993). Ülkemizde hemoglobinopatiler ile ilgili ilk çalışmalar, M.Aksoy tarafından 1950'li yıllarda Çukurova Bölgesi'nde Eti Türklerinde yapılmıştır (Aksoy ve ark. 1958). Yapılan tarama çalışmalarına göre Çukurova Bölgesi ülkemizde orak hücre anemisinin en sık bulunduğu yöredir (Arpacı ve ark.; Gümrük ve Altay 1995; Kılınç ve ark. 1992). 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 (Edelstein 1980).

Orak hücre hastalığı kalıtsal, otozomal resesif iletilen bir kan hastalığı olup hemoglobin sentez bozuklukları arasında en sık görülenidir. OHA'da görülen nokta mutasyon sonucu oksijensiz HbS polimerize olur ve katı kristal halinde çöker. Eritrositler bikonkav disk şeklinden yarımay benzeri orak şeklini alır. Şekli bozulmuş olan hücreler dalakta erken yıkılır ayrıca kan akışkanlığını azaltarak özellikle küçük damarlarda tıkanıklığa yol açarak organ hasarına ve hastalığın tipik klinik

bulgularının oluşmasına neden olur (Stapeynski ve Martin 2004). Orak hücre geni homozigot mutant ve genotipi HbSS olan kişilerde hastalığın klinik bulguları görülür (Stapeynski ve Martin 2004). Hastalığın temel bulguları kronik hemolitik anemi, tekrarlayan ağrılı ataklar ve etkilenen organda görülen işlev bozukluğudur. Hastalığın gidişatı sırasında oluşan vazo-oklüziv ağrılı krizler bu hastalığa bağlı hastaneye başvuruların en fazla nedenidir (Embury 2000). Orak hücre geni heterozigot ve genotipi HbAS olan orak hücre taşıyıcıları ise nadiren görülen akut ağrı krizi , dalak nekrozu veya serebrovasküler komplikasyonlar dışında normal bir hayata sahiptirler ve genelde belirti vermezler (Stapeynski ve Martin 2004).

Serbest radikaller; radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron azalması veya eklenmesi sonucu elektron çiftinin dengesinin bozulmasıyla oluşan, dış yörüngesinde eşleşmemiş elektron taşıyan, organik ve inorganik moleküller ile reaksiyona girebilme yeteneğine sahip, yüksek oranda reaktif kısa ömürlü bileşiklerdir (Baykal ve ark.2002). Özellikleri, dengesiz ve tek olan elektronu çiftlemek için diğer moleküller ile tepkimeye girmeye yatkın olmalarıdır (Halliwell 1994). Hücrelerde metabolik dengenin bir parçası olarak normal hücre metabolizmasında oksijen içeren birçok biyokimyasal indirgenme reaksiyonlarında (elektron transport zinciri veya oksidaz grubu enzimler gibi) reaktif oksijen radikaller sürekli yapılırlar (Minnet 2006; Akkuş 1995). Aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü nedeniyle hayati öneme sahip oksijen, yer aldığı biyokimyasal tepkimelerle gerçekleşen enzim inhibisyonları ve oluşan oksijen radikalleriyle toksik etki de yapabilmektedir (Minnet 2006; Sifil ve Çamsarı 1997; Jensen 2003).

Aerobik metabolizmada denge, oluşan serbest radikallerin antioksidan sistemler tarafından uzaklaştırılması ile karakterizedir (Borgna-Pignatti ve Galanello 2004). Antioksidan, organizmadaki esansiyel maddelerin oksidasyonuna neden olabilecek moleküllerin etkilerini önleyen veya geciktirebilen maddelerdir. Fizyolojik şartlarda insan vücudunda oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) ile antioksidan cevap bir denge halindedir. Oksidan ve antioksidan arasındaki dengesizlik fazla miktardaki reaktif oksijen türlerinin yapılmasına ve oksidatif hasara sebep olur. Geri dönüşümsüz oksidatif hasarın birikimi ile önce hücre daha sonra

doku ve organ sistemlerinde yapısal ve işlevsel bozukluklar ortaya çıkabilir. Bu durum oksidatif stres olarak adlandırılır (Yeum ve ark. 2004; Kurutaş ve ark. 2004).

Serbest radikaller etkilerini protein, lipit, karbonhidrat ve DNA gibi makromoleküllerde oksidasyonu yaparak; hücre zarında, hücre organellerinde ve DNA'larda patolojik değişiklikler oluşturabilmektedir. Bunların sonucunda hücre hemostazı bozulmakta ve birçok hastalığın etiyopatogenezinde serbest radikaller rol oynayabilmektedirler.

Reaktif oksijen türevlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda, histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda amino asitler okside olmakta ve/veya proteinlerin peptit omurgasında oluşan oksidatif hasara bağlı olarak protein karbonil (PC) ürünleri meydana gelmektedir (Stadtman ve Levine 2003; Dalle-Donne ve ark. 2003).

DNA molekülünde serbest radikaller için önemli bir hedeftir ve kolaylıkla hasara uğratılır (Hagen 1986; Sonntag ve ark. 2004). DNA bünyesinde Cu^{+2} iyonları en çok Guanin-Sitozin'ce (G-C) zengin bölgelerde bulunduğundan, metallerin hidrojen peroksit ile reaksiyona girmesi sonucu daha toksik hidroksil radikali oluşabilmektedir. Bu yüzden en fazla oksidatif hasara maruz kalan baz guanindir. Bu iyonların polianyonik karakterde olan DNA'nın özellikle guanin bazlarına yüksek afinite ile bağlandığını ve H_2O_2 ile etkileşime girerek DNA hasarını başlattığı gösterilmiştir. Bu nedenle en yaygın olarak ölçümlenen baz hasarı 8-hidroksi deoksi guanozin (8-OHdG)'dir (Helbock ve ark. 1999).

Lipit peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) reaktif oksijen türleri tarafından peroksitler, alkoller, malondialdehit (MDA), etan ve pentan gibi ürünlere yıkılma tepkimelerine denilmektedir. Yağ asitlerinin peroksidasyonu sonrasında açığa çıkan ürünler zar geçirgenliğini ve akışkanlığını ciddi şekilde etkileyip hücre ve organel içeriklerinin ayrılmasına neden olan kopma ve kırılmalara yol açmaktadır. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen zar hasarı geri dönüşümsüzdür (Kurutaş ve ark. 2004; Gutteridge 1995).

Çalışmamızda orak hücreli anemi hastalarının oksidatif stresin makromoleküller üzerine (Lipid, Protein ve DNA) etkilerini araştırmak amacıyla, orak hücreli anemi tanısı konmuş hasta grubu ve kontrol grubu olarak sağlıklı bireyler seçilmiş ve her iki grupta da aynı parametrelerin çalışılması planlanmıştır.

Bu çalışmada lipid peroksidasyon ürünü olan MDA ile lipid hasarı, DNA'nın yapısındaki guaninin oksidatif modifikasyonu sonucu oluşan 8-OHdG ile DNA hasarı ve protein oksidasyonu sonucu oluşan PC düzeyleri ile protein hasarı tespit edilecek, kontrol grubu ve hasta bireyler arasında kıyaslanması yapılacaktır.

Şu ana kadar olan bilgilerimize göre PC, MDA ve 8-OHdG parametreleri literatürde OHA'da ELISA yöntemi ile çalışılmamış olup, çalışmamızda bu parametrelerden MDA ve PC'in daha önce literatürde gösterilmiş manuel spektrofotometrik yöntemle ilaveten ELISA yöntemi ile de çalışılarak protein, lipid ve DNA hasarının mevcut çalışmamızda birarada değerlendirilmesi planlanmıştır.

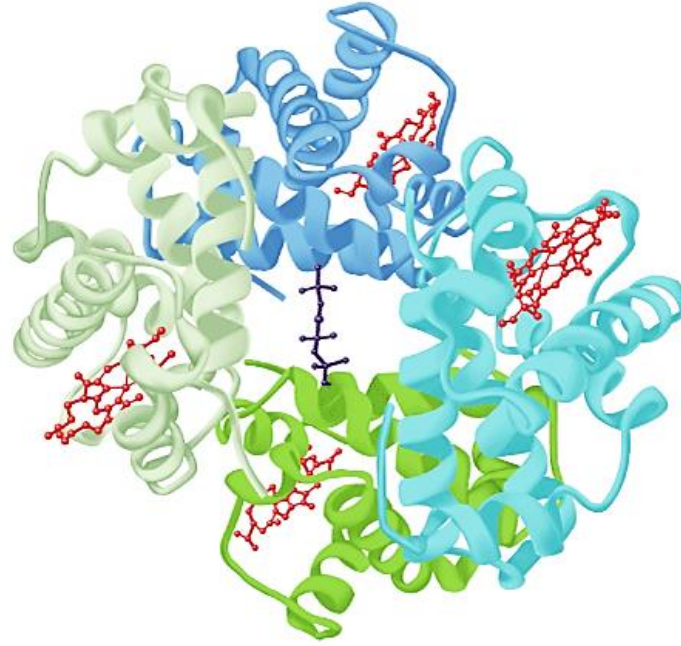
2.GENEL BİLGİLER

2.1. Hemoglobinin Yapısı

Hemoglobin O₂'i akciğerlerden alıp dokulara götüren ve dokulardan CO₂'i alarak akciğerlere getiren taşıyıcı bir proteindir (Brozovic ve Henthorn 1995; Klinken 2002). Hemoglobinin bu özelliği organ ve dokuların işlevlerini yapabilmeleri için hayati önem taşımaktadır (Thomson ve ark. 1991). Bu protein, en yüksek oranda akciğerden doku kapillerlerine oksijen taşınması fonksiyonunu gördüğü eritrositlerde bulunur (Champe ve ark. 2007). Eritrositin yaklaşık %30'unu kapsar.

Hemoglobin molekülü, hücre kuru ağırlığının % 60'ını, kan proteinlerinin 2/3'nü oluşturmaktadır. Erkeklerde 100 ml kanda ortalama 15 gr, kadınlarda ise 13 gr hemoglobin bulunmaktadır (Murray ve ark. 1988). Yenidoğanlarda ise bu değer yaklaşık 20 gr'dır (Huisman 1995).

Hemoglobin, iki çift özdeş olmayan ve globin olarak adlandırılan polipeptid zincirleri ile her bir globin içinde gömülü durumda dört molekül hem'den oluşan tetramer yapıda bir protein olup peptid zincirleri arasındaki etkileşimler ile bir arada tutulur (Sekil 2.1) (Higgs ve ark. 2001). Polipeptid zincirleri hemoglobinin dört alt birimini oluşturur. Bu alt birimler iki tane özdeş alfa (α veya ζ) ve iki tane beta (ϵ , δ , γ veya β) türü olarak tanımlanır. (Ho ve Thein 2000).



Şekil 2.1. Hemoglobinin yapısı (Ulutaş 2013)

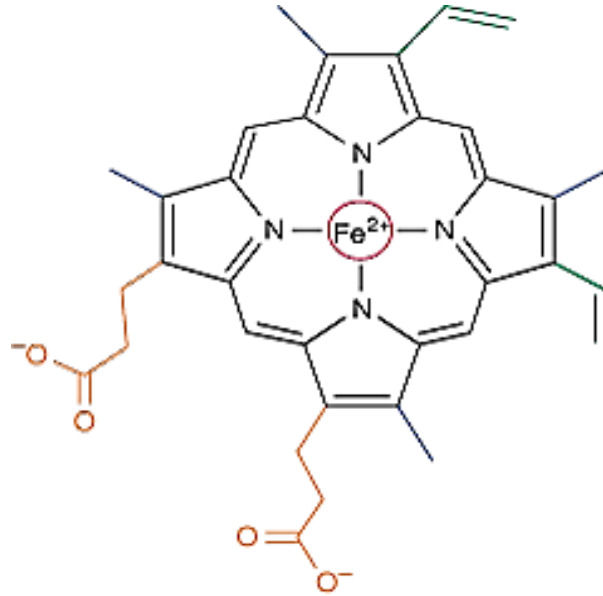
2.1.1. Hemin Yapısı

Moleküler ağırlığı 64500 dalton olan hemoglobin kabaca küresel yapıda olup yaklaşık 5,5 nm çapındadır (Nelson ve Cox 1999). Prostetik grup olarak halkalı bir tetrapirrol olan hem içerir (Murray ve ark. 2004). Globüler hemoglobin molekülünün kompleks yapısındaki hem molekülü tüm insan hemoglobin tiplerinde aynı olup, farklı olan globin zinciri aminoasitlerinin cinsi, sırası ve sayısıdır (Huisman 1993).

Hem grubu, 4 pirol halkasından meydana gelen protoporfirin IX halka sistemi ile bir demir atomundan oluşmaktadır (Şekil 2.2). Metenil köprüleriyle birbirine bağlanan dört pirol halkasından meydana gelen tetrapirrol halkasına yan zincir olarak iki vinil, iki propiyonat ve dört metil bağlanmıştır (Şişli 2002). Fe atomu porfirin halkasının dört N' i ile bağlanarak hem halkasının ortasında tutunur. Hemin Fe⁺²'i her biri düzlemsel porfirin halkasının ayrı tarafında olan iki bağ daha yapar. Bunlardan biri globin molekülünün bir histidin kalıntısının yan zincirine bağlanırken diğeri ise oksijen bağlamaya uygundur. Böylelikle hemoglobin oksijen taşıma pozisyonuna sahip olur (Champe ve ark. 2007). Oksijenin kanda taşınması O₂'nin

hemoglobinle geri dönüşümlü kombinasyonlar yapmasıyla sağlanır (Higgs ve ark. 2001).

Hem'in konjuge çift bağlardan oluşan yoğun ağ yapısı, görünür ışık spektrumunun alt ucundaki ışınları yutarak moleküle koyu kırmızı renk verir (Murray ve ark. 2004).

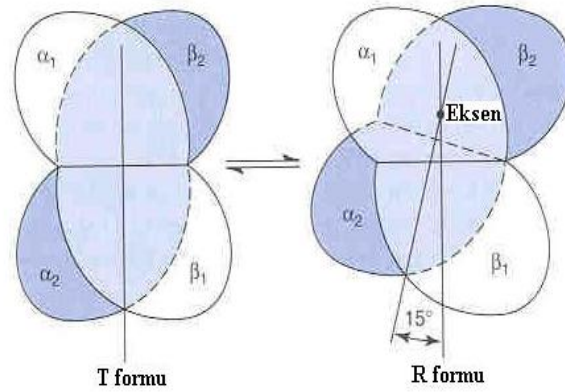


Şekil 2.2. Hem'in ferruz demir oluşturduğu tetrapiral yapı (Murray ve ark. 2004)

Hem grubu, globin molekülü yapısında yer alan hidrofobik bir çukura gömülü biçimde bulunur. Demir atomu, globin içerisine gömülü biçimde bulunan hem grubu ile kare düzlemsel koordinasyon yapısını (*square planar coordination complex*) oluşturur. Bu yapılanma içerisindeki demir atomu, beş numaralı bağını globin yapısında yer alan F8 konumundaki histidin (proksimal histidin) imidazol grubunun azot atomuyla yapar. Oksihemoglobinde altı numaralı bağını moleküler

oksijen ile; deoksihemoglobinde ise globine ait E7 histidin (distal histidin) ile oluşturulur. Demir, moleküler oksijeni distal histidin ile arasına alarak taşır.

Hemoglobine oksijen bağlanmasına, hem grubunun çevresindeki biçimsel değişiklikler eşlik eder. Hemoglobine oksijen bağlanmasıyla, dört alt ünitedeki karboksil uçları arasındaki tuz bağları parçalanır ve böylece sonraki oksijenin bağlanması kolaylaşır; çünkü ikinci oksijenin bağlanması için daha az tuz bağının parçalanması gerekir. Hemoglobine reversibl olarak oksijen bağlanması sırasında alt üniteler arasındaki ilişkinin %60'lık bölümü değişmeden kalırken %35'lik bölümü kayar; oksijen cep içine girerken Fe oksijene doğru hareket eder ve bağlı olduğu proksimal histidini de cebe çeker; Fe heliks hareket ederken tuz köprüleri kopmaya başlar. Hemoglobinin oksijenli formu, R (Relaks) form olarak tanımlanır.



Şekil 2.3. Hemoglobinin üç boyutlu yapısında meydana gelen değişiklik (Murray ve ark. 2004)
Hemoglobinin T formunun R formuna çevrimi sırasında bir çift katı altbirim (α_2/β_2) diğer katı çifte (α_1/β_1) göre 15 derece döner. Dönme eksenine eksantrik olup α_2/β_2 çifti aynı zamanda eksene doğru bir miktar kayar. Çizimde α_1/β_1 çifti içi boş bırakılıp sabit olarak tutulmuşken içi gölgeli α_2/β_2 çifti dönmekte ve kaymaktadır.

Tüm bu değişimlerin sonucunda; β_1 ve β_2 globin alt birimleri arasındaki uzaklık $33,4 \text{ \AA} - 40,3 \text{ \AA}$ Oksi-Hb-deoksi-Hb arasındaki değişikliği gösterir. Bu değişken yapısal farklılıklar, oksijene ilgisi düşük olan T (*tight-sıkı*) ve yüksek olan R (*relaxed-gevsek*) formlar olarak tanımlanır (Wada 2002; Nelson ve CoxMM 2000).

2.1.2. Normal Hemoglobinler

Normal hemoglobin 4 hem halkası ve 2 farklı globin zinciri çiftinden oluşur. Sağlıklı erişkin bir bireyde normalde üç tip hemoglobin bulunur. Bu hemoglobinlerde hem halkası aynı olup, globin yapısı farklıdır (Clarke ve Higgins 2000).

Hb A: Normal bir erişkinde hemoglobin molekülünün yaklaşık %97'si Hb A'dır. Hb A, iki α ve iki β globin zincirinden oluşur. $\alpha_2\beta_2$ şeklinde gösterilir. α zincirleri 141 β zincirleri ise 146 aminoasitten oluşur. Erişkinlerde Hb A dışında iki minör hemoglobin grubu daha bulunur (Clarke ve Higgins 2000).

Hb A₂: 2 α ve 2 δ globin zincirinden oluşur ve $\alpha_2\delta_2$ şeklinde gösterilir. Normal erişkinde %2–3 oranında bulunur. Hb A₂ oranı β talasemi taşıyıcılarında yükselir. Unstable hemoglobinopatilerde ve megaloblastik anemilerde bazen yükselir. Buna karşın demir eksikliği anemisinde ve sideroblastik anemilerde azalır (Clarke ve Higgins 2000).

Hb F: Fetus ve yeni doğanın temel hemoglobini olan Hb F ise ikinci minör hemoglobin olup 2 α ve 2 γ zincirinden oluşur, $\alpha_2\gamma_2$ şeklinde gösterilir. Erişkinde ortalama Hb F düzeyi %1'in altındadır (Clarke ve Higgins 2000).

Yeni doğan çocuklarda hemoglobinin % 70- 90 'nını oluşturur. Doğumdan sonra hızla düşerek 6. ayda % 5' e düşer. Hb F'in başlıca yükseldiği hastalıklar, hemoglobinopatiler ve talasemik sendromlardır. Bununla beraber ara sıra diğer hastalıklarda da Hb F düzeyinde artma olduğu bildirilmiştir. Bu hastalıklar arasında, konjenital ve akkiz aplastik anemiler, bazı lösemi çeşitleri, sideroblastik anemiler, paroksizmal nokturnal hemoglobinüri, megaloblastik anemiler sayılabilir.

Embriyonik dönemde ise Portland I ve II, Gower I ve II hemoglobinleri sentezlenir. Portland I'nın (embriyonik) moleküler yapısında $\delta_2\gamma_2$, Portland II'nin moleküler yapısında $\zeta_2\beta_2$, Gower I'nın (embriyonik) moleküler yapısında $\delta_2\varepsilon_2$ ve Gower II (embriyonik)'nin moleküler yapısında $\alpha_2\varepsilon_2$ globin zincirleri bulunur (Lukens ve Lee 1993; Olivieri ve Weatheral 1999).

2.1.3.Hemoglobin Sentezi

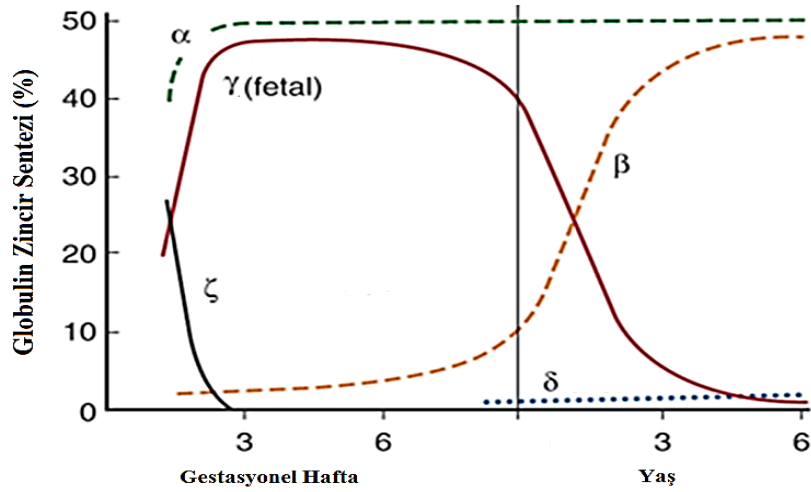
Hem grubu ve globin zincirlerinin ortak üretimine bağlı olarak hemoglobinin sentezi gerçekleşmektedir. Eritrosit öncüllerinde hem grubu mitokondri ve sitoplazma kısımlarında sentezlenmektedir. Olgun eritrositler mitokondri içermedikleri için hem grubunu sentezleyememektedirler (Yüregir 1990).

Gelişim boyunca, globin genlerinin ifadesinin düzenlenmesi, globin değişikliği (*globin switching*) olarak adlandırılmakta ve gelişimsel gen ifadesinde klasik örnek olarak gösterilmektedir. İki globin zincirine ait genler, 5' ucundan 3' ucuna doğru gelişim boyunca sırayla ifade edilmektedir. Gelişime bağlı olarak ifade edilen zincirlerin birbirlerine oranları Şekil 2.4'te gösterilmektedir. Bu ifade sonucu alfa, beta ve benzeri genlerin ürünleri dengeli miktarda üretilmektedir. Globin genlerinin sırayla ifade edilmesi aşamalarında, eritropoezin gerçekleştiği organlar değişmektedir (Ganong 1985).

Döllenmenin 3. ve 8. haftalarında, eritropoez sarı kesede (*yolk sac*) meydana gelmektedir. Bu dönemde sırasıyla; Gower-I, Gower-II, Portland-I ve Portland-II hemoglobinleri sentezlenmektedir (Ganong 1985). Eritropoezin mezoblastik döneminde ilk sentezlenen hemoglobin Hb Gower 1'dir. 2 zeta (ζ_2) ve 2 epsilon (ϵ_2) zincirinden oluşur. Bundan kısa bir süre sonra α ve β zincir sentezi başlar. Bu sırada diğer üç embriyonik hemoglobin; Hb Portland I ($\delta_2 \gamma_2$), Portland II ($\zeta_2 \beta_2$) ve Hb Gower II ($\alpha_2 \epsilon_2$) gözlenir (Rodwell 1996).

Embriyogenezin ilk haftaları dışında globin zincirlerinden ikisi daima alfadır. Embriyoda ilk sentezlenen globin zinciri zeta (δ) ve epsilon (ϵ) (Arıyürek 2009).

Gebeliğin 6.cı haftasından sonra γ zincir sentezi başlar, ardından gebeliğin 13. haftasında embriyonik hemoglobinler kaybolur ve fetüsta sadece Hb F bulunur (Rodwell 1996). 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 γ veya Glisin içeren G γ olmak üzere iki farklı gama zincirine sahiptir. G γ /A γ oranı doğumda 3/1 iken beş aylıkken 2/3'e iner (Olivieri ve Weatheral 1999; Weatheral 2001; Gümrük 1996).



Şekil 2.4. Globin zincir sentezinin evreleri (Ulutaş 2013)

Fetal hemoglobinde bulunan γ -zincirlerinin, hemoglobin A'daki beta globin zincirlerindeki histidin grupları yerine serin grupları taşıması, hemoglobin F'nin oksijene olan ilgisini arttırır. Hemoglobin F'nin bu özelliği, düşük kısmi oksijen basıncında yaşayan fetusa gerekli oksijenin sağlanmasında katkıda bulunur (Ganong 1985).

Gebeliğin ilerlemesiyle γ zincirlerindeki dereceli azalmaya paralel olarak β zincir sentezinde artma gözlenir. Gebeliğin 35.ci haftasında %85'e düşen Hb F düzeyleri, haftada % 3 – 4 oranında azalmaya devam ederken bu sırada Hb A sentezi artmaya başlar (Rodwell 1996).

Doğumdan sonra gama globin zincirinin sentezi azalırken, beta globin zincirinin sentezi artmaktadır. Bu değişime rağmen doğumdan yedi-sekiz ay sonrasına kadar hemoglobin F, önemli miktarda sentezlenmeye devam etmektedir. Ancak HPFH (*Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin*) olarak adlandırılan durumda, γ -globin zincir sentezi doğumdan sonra azalmadan devam etmekte ve buna bağlı olarak Hb F miktarı normal değerinin üzerinde saptanır (Ganong 1985).

Çizelge 2.1. Hemoglobın tipleri (Higgs ve ark. 2001)

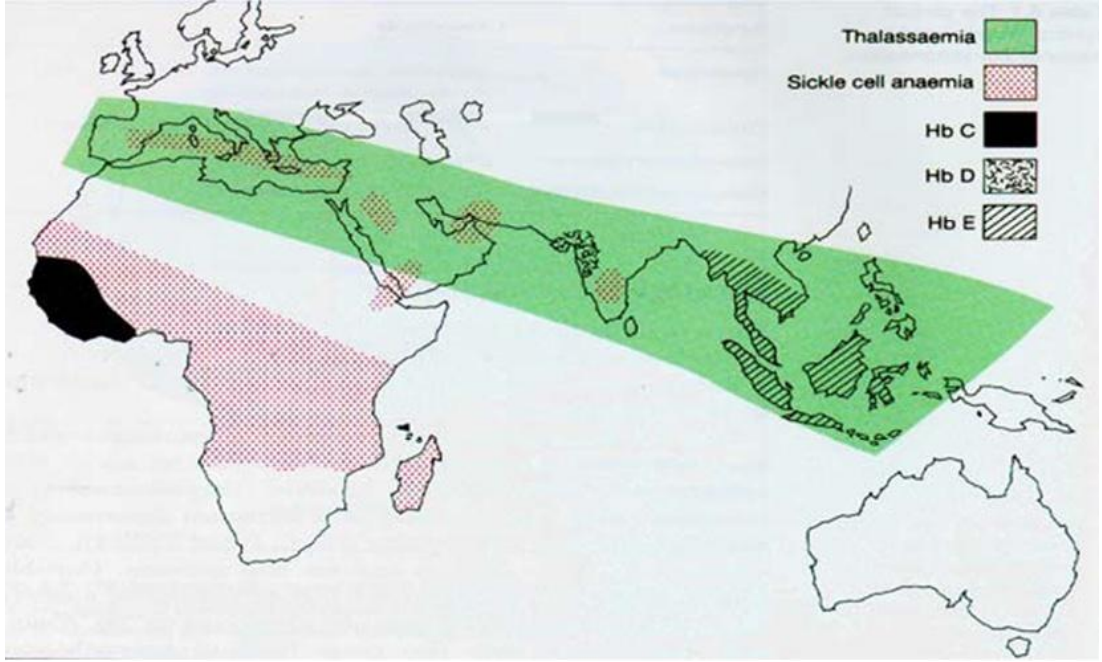
İsim	Dönem	Formül	Erişkin Değeri	Fetusta Yapım Zamanı
Hb GowerI	Embriyonik Hb	$\delta 2\epsilon 2$	-	İlk üç ayda
Hb GowerII	Embriyonik Hb	$\alpha 2\epsilon 2$	-	İlk üç ayda
Hb PortlandI	Embriyonik Hb	$\delta 2\gamma 2$	-	İlk üç aydan sonra ve kordon kanında
Hb PortlandII	Embriyonik Hb	$\delta 2\beta 2$	Hb H ve talasemi taşıyıcılarında az miktarda	İlk üç aydan sonra
Hb F	Fetal Hb	$\alpha 2\gamma 2$	% 1 den az	İntrauterin 10-12.haftada
Hb A	Erişkin Hb	$\alpha 2\beta 2$	%97	3.trimesterde
Hb A2	Erişkin Hb	$\alpha 2\delta 2$	%2,5-3,5	6-8.haftada yapımı başlar

2.1.4.Hemoglobınopatiler

Dünyada en yaygın görülen kalıtsal hastalıklardan biri de hemoglobınopatidir. Hemoglobınopatiler, hemoglobın molekülünün polipeptid zincirlerindeki yapısal değişiklikler veya sentez bozukluklarından kaynaklanan kan hastalıklarıdır. Talasemi ve anormal hemoglobınler olmak üzere iki kısımda incelenir (Cao ve ark. 1997).

Dünya Sağlık Örgütü dünya genelinde hemoglobın bozukluklarının taşıyıcı sıklığını %5 olarak ve her yıl yaklaşık 365 000 hasta çocuk doğduğunu bildirmektedir (Weatheral ve ark. 2001; Hoffbrand ve Pettit 2000). Bu kalıtsal

hastalık yoğun olarak Afrika, Asya ve Akdeniz ülkelerinde görülmekle birlikte göçlerle Avrupa, Amerika ve Avustralya'ya da yayılmıştır (Cavalli ve ark.1996)



Şekil 2.5. Talasemi,orak hücre anemisi ve diğer yaygın hemoglobin hastalıklarının dünya üzerindeki yayılımı (Hoffbrand ve Petti 2000).

2.1.5.Anormal Hemoglobinler

Hemoglobin molekülün yapısında yer alan globin zincirleri üzerindeki aminoasit değişikliği sonucu meydana gelmektedir. Bu genlerin ekzon bölgesindeki veya bu bölge dışındaki nokta mutasyonları, insersiyonlar ve delesyonlar çeşitli hemoglobin varyantlarının oluşumuna yol açmaktadır (Bunn ve Forget 1986).

Mutasyonların büyük bir kısmını nokta mutasyonları oluşturmaktadır. Bu mutasyonlar bazen polipeptid zincirinde tek bir aminoasit değişimine neden olmaktadır. Delesyonlar polipeptid zincirinin kısalmasına, insersiyonlar ise uzamasına yol açmaktadır. Homolog olmayan crossing-over sonucu oluşan bazı varyantlar ise normal uzunlukta hibrit polipeptid zincirleri içermektedirler (Bunn ve Forget 1986).

Ülkemizde ve dünyada en yaygın olarak gözlenen anormal hemoglobinler Hb S, Hb D, Hb E ve Hb C'dir. Bugüne kadar Türkiye genelinde 49 anormal hemoglobin tipi gösterilmiş olup bunların 16 tanesi α globin zincirinde, 29 tanesi β globin zincirinde, biri γ globin zincirinde ve birisi de δ zincirinde yer almaktadır, ikisi de hibrit hemoglobin olarak belirlenmiştir (Altay 2002; Akar ve Akar 2007).

2.2.Orak Hücre Anemisi

2.2.1.Tarihçe

Eritrositlerde oraklaşma, ilk defa 1910 yılında anemik zencilerin kanında J.B.Herrick tarafından saptanmış, 20 yaşında bir hemolitik anemili hastanın periferik yaymasında orak hücrelerin görülmesi ile tanımlanmıştır (Herrick 1910; Harmening 1997).

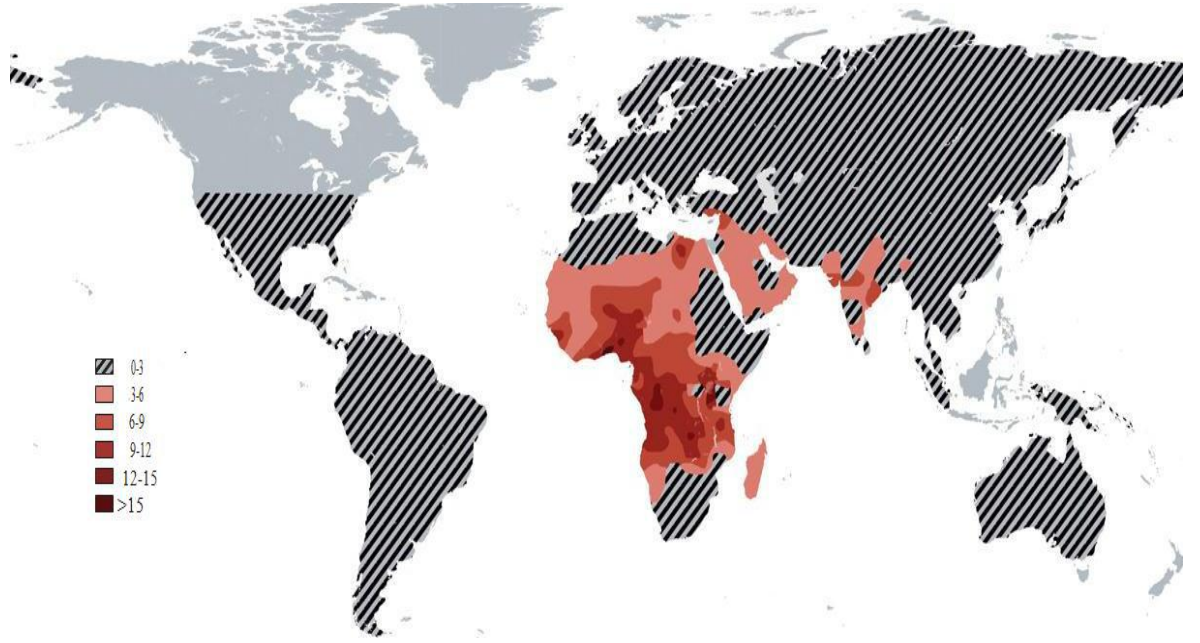
Orak hücre hastalığı 1910'da Dr. James Herrick tarafından tariflenmeden çok önceleri Afrika'da klinik bir olay olarak bilinmekteydi. Dr. James Herrick tarafından sunulan raporda, orak şeklindeki eritrositlerin ilk tarifi yer almıştır. Yine ilk defa bu raporda şekli bozulmuş olan eritrositlerle tekrarlayan ağrılar ve anemi arasında ilişki olduğu sunulmuştur (Embury 2000; Canatan 2003).

1923 yılında bu bozukluğun otozomal resesif yolla geçtiği tespit edilmiştir (Platt ve Dover 1993; Lukens 1993). 1927 yılında Hahn ve Gillepsie orak hücre anemisinin patolojik temelini ve hemoglobin molekülü ile ilgisini tanımladı (Herrick 1910;Hahn ve Gillepsie 1927). 1949 yılında Pauling ve arkadaşları orak hücre anemili hastaların hemoglobin elektroforezinin anormal olduğunu tespit ederek, elektroforetik olarak HbA'dan daha yavaş hareket eden bu anormal proteine HbS veya 'sickle hemoglobin' adını vermişlerdir. Ingram,1957 yılında hemoglobinin β zincirinin altıncı pozisyonundaki glutamik asit yerine valinin geçmesi sonucu bu hastalığın oluştuğunu ispat etmiştir (Platt ve Dover 1993; Lukens 1993).

2.2.2.Coğrafik Yayılım

Orak hücre mutasyonunun oluşması ve malaryaya karşı sağladığı koruma, hastalığın dünyadaki dağılımını belirleyen iki önemli faktördür. Malaryanın oldukça yaygın olduğu Orta Afrika OHA'nin en sık görüldüğü bölgelerden biridir. Bu bölgedeki bazı etnik gruplarda % 40 dolayında taşıyıcılık saptanmıştır (Dover ve Platt 2003; Kılınç ve ark. 1993). Bu bölgelerde saptanan mutasyonlar saptandığı yerlere (Senegal, Kamerun, Benin, Bantu) göre isimlendirilmişlerdir (Kulozik ve ark. 1986) Orak hücre anemisi İtalya'nın güney, Yunanistan'ın kuzey ve Türkiye'nin güney bölgelerini kapsayan Akdeniz çevresindeki ülkelerde, Sicilya, Orta Doğu ve Hindistan'da da yaygın olarak görülmektedir (Serjeant 1992; Lukens 1993).

Ülkemizde hemoglobinopatiler ile ilgili ilk çalışmalar, M. Aksoy tarafından 1950'li yıllarda Çukurova bölgesinde yaşayan Eti Türklerinde yapılmıştır (Aksoy ve ark. 1958). Ülkemizde yapılan tarama çalışmaları OHA'nin bazı bölgelerde daha sık olduğunu göstermektedir. Çukurova bölgesi ülkemizde OHA'nin en sık bulunduğu yöredir (Arpacı ve ark. 1991; Gümrük ve Altay 1995; Kılınç ve ark. 1992). 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 (Edelstein 1980).



Şekil 2.6. HbS allelinin Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından kabul gören dağılım haritası (Modell ve Darlison 2008; Modell ve ark. 2007).

2.2.3.Genetik

Emmel tarafından 1917 yılında bir OHA hastasının babasında orak hücrelerinin gösterilmesi, hastalığın genetik bir temeli olduğunu gündeme getirmiştir (Emmel 1917). Oraklaşma testi pozitif olan hastalar klinik bulgularına göre incelendiğinde iki ana grupta toplandıkları görülmüştür. Bu iki grubu ayırt etmek için semptomatik grubu oluşturan olgular “ orak hücre anemisi ”, asemptomatik grubu oluşturan olgular ise “ orak hücre taşıyıcısı ”(trait) olarak tanımlanmıştır (Diggs ve ark. 1933).

Orak hücre anemili hastaların anne ve babalarında da oraklaşma saptanması, hastalığın homozigot kalıtımına güçlü bir kanıt olarak sunulmasının ardından hastalığın orak hücre taşıyıcılığının (trait) yaygın olduğu tüm toplumlarda görülebileceği ve sıklığın taşıyıcılık prevelansı ile belirlendiği tezi ortaya atılmıştır (Neel 1947; Neel 1949). Orak hücre anemili hastalar, OHA taşıyıcıları ve normal bireylerin hemoglobinleri arasındaki elektroforetik ve kimyasal farklılıkların gösterilmesi OHA'nin moleküler bir hastalık olduğunu ortaya koymuştur (Pauling ve ark. 1949). HbS ile normal hemoglobin karşılaştığında hem grupları arasında bir fark olmadığı görülmüştür. İki hemoglobin tipi arasındaki fark globulinden

kaynaklanmaktadır (Schroeder ve ark. 1950). Yüksek voltajlı elektroforez ve kromatografi ile birlikte kullanılabilen gelişmiş finger printing yöntemlerinin kullanılmaya başlanması, HbA ile HbS arasındaki farkın tespit edilmesine olanak sağlamıştır. Hemoglobinin protein yapısının belirli peptid parçalarına ayrılmasını sağlayan bu tip yöntemler kullanılarak yapılan bir çalışmada HbS yapısındaki bir peptidin HbA yapısındaki aynı peptide göre pozitif yükünün daha fazla olduğu gösterilmiştir (Ingram 1956). Bu peptidin daha az glutamik asit ve daha fazla valin içerdiğinin saptanması neticesinde valinin glutamik asitin yerini aldığı saptanmıştır. Beta zincirinin amino terminalini oluşturan bu peptidin Val-His-Leu-Thr-Glu-Lys aminoasit dizisi yerine Val-His-Leu-Thr-Pro-Val-Glu-Lys amino asit dizisini içerdiği gösterilmiştir (Hunt ve Ingram 1958; Hunt ve Ingram 1959). Bu aminoasit değişikliği 11. kromozomun kısa kolunda bulunan GAG (guanin, adenin, guanin) kodunun GTG (guanin, timin, guanin)'ye dönüşmesi sonucunda meydana gelmektedir (Hunt ve Ingram 1958; Hunt ve Ingram 1959). Orak hücre anemisi otozomal resesif geçiş göstermektedir. Eğer 1. kromozomun kısa kolunda β globulin zincirini kodlayan her iki allel gen de orak hücre anemisine özel GAG-GTG şeklinde mutasyona uğramışsa normal β zinciri dolayısıyla da HbA sentezlenemez ve eritrositler yüksek oranda HbS içerir. Sadece mutant zincir sentezleyebilen bu kişiler homozigotlardır (HbSS). Bir anormal gene sahip heterozigotlar (HbAS) ise taşıyıcıdırlar ve eritrositler % 20-40 oranında HbS içerir.

Orak hücre geninin β talasemi geni veya HbC gibi diğer hemoglobinopati genleri ile birlikte bulunması farklı orak hücre anemisi tiplerinin görülmesine neden olmaktadır. Orak hücre mutasyonu ve β talasemi mutasyonun beraber görüldüğü Afrika kökenli olgular fenotipik olarak iki ana gruba ayrılır. Birinci grubu -29 (A→G) veya -88 (C→T) mutasyonlarının olduğu ve % 20-30 HbA bulunan orak hücre $-\beta^+$ talasemi olguları oluştururken, ikinci grubu hiç HbA bulunmayan ve IVS2- 849(A→G) veya IVS2- 71(G→A) mutasyonlarının bulunduğu orak hücre- β talasemi olguları oluşmaktadır. Hindistan'da görülen bir talasemi mutasyonu olan IVS1-5(G→C), HbA'nın % 3-5 arasında olduğu ve daha ağır klinik bulgulara yol açan orak hücre $-\beta^+$ talasemi tablosuna neden olmaktadır. Bu tür orak hücre $-\beta$ talasemi hastalıklarının klinik özelliklerini β geni mutasyonunun tipi ve HbA miktarı belirlemektedir. Orak hücre anemisine yol açan diğer heterozigot durumlar ise; orak

hücre-hemoglobin C (SC) hastalığı (Marotta ve ark. 1977), orak hücre- hemoglobin O Arab (Kaplan ve ark. 1951), orak hücre-hemoglobin Lepore Boston (Hunt ve Ingram 1959) ve orak hücre-hemoglobin D Punjab"dır (Ramot ve ark. 1960; Stamatoyannopoulos ve Fessas 1963).

2.2.4.Patofizyoloji

HbS'in fiziksel yapısındaki değişim eritrositlerin şekil değiştirmesine yol açar ve eritrositler uzamış yarımay (orak) şeklini alırlar (McCavit 2012). Orak şeklini alan eritrositler dolaşımın akışkanlığını azaltır ve kan akımı yavaşlar. Bu da özellikle küçük damarlarda tıkanıklık ve oksijensiz bir ortam oluşmasına yol açar. Orak şeklini alan eritrositler hem damar içinde, hem de damar dışında yıkıma uğrar (Steinberg 2011). Bu durum eritrositlerin kısa ömürlü olmalarının nedenidir ve aneminin şiddetiyle doğrudan ilişkilidir (Richard 2009). Artmış serbest plazma hemoglobin düzeyleri hemolizin yaklaşık 1/3'ünün damar içinde olduğunu düşündürmektedir (Richard 2009). Damar içi hemolizin bir mekanizması hücrelerin kompleman aracılığı ile oluşabilecek yıkıma karşı savunmasız bırakılmasıdır. Diğer bir mekanizma ise hücrelerin kırılabilirliğindeki artışa bağlı hemolizin hızlanmasıdır (Wood ve ark. 2008, Heibel ve ark. 2004). Oraklaşan hücrelerin bir kısmı geri dönüşümlü olup eski normal şeklini alabilir. Ancak bir kısmı ise hücre membranlarında oluşan kalıcı hasar nedeniyle normal şekline dönemezler. Bu hücreler damar tıkanıklığına yol açarak dokularda hipoksi oluşturup ağrılı kriz ve organ nekrozuna, sonuçta akut ve kronik süreçte doku harabiyetine neden olmaktadır (Embury 2000).

Bazı etkenler oraklaşmaya eğilimi artırır. Bunlar; infeksiyonlar, parsiyel oksijen basıncında azalma, dehidratasyon, aşırı fiziksel egzersiz, alkol, gebelik, damar çapını azaltan durumlar, vücut ısısının artışı, kan yoğunluğunda artma, oksihemoglobin disosiasyon eğrisinin sağa kaymasına neden olan pH azalması, yüksek HbS, düşük HbF miktarı, glikoz-6- fosfat dehidrogenaz (G6PD) eksikliği ve 2,3 difosfogliserat düzeyinin azalmasıdır (Canatan 2003; Mary 2000).

Orak hücre hastalığının patogenezi üzerinde son zamanlarda yapılan çalışmalar oksijensiz ortamdaki HbS 'nin polimerizasyonu ile vazo-oklüzyon arasında oluşan patolojik durumlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Hücresel düzeyde dehidratasyon,

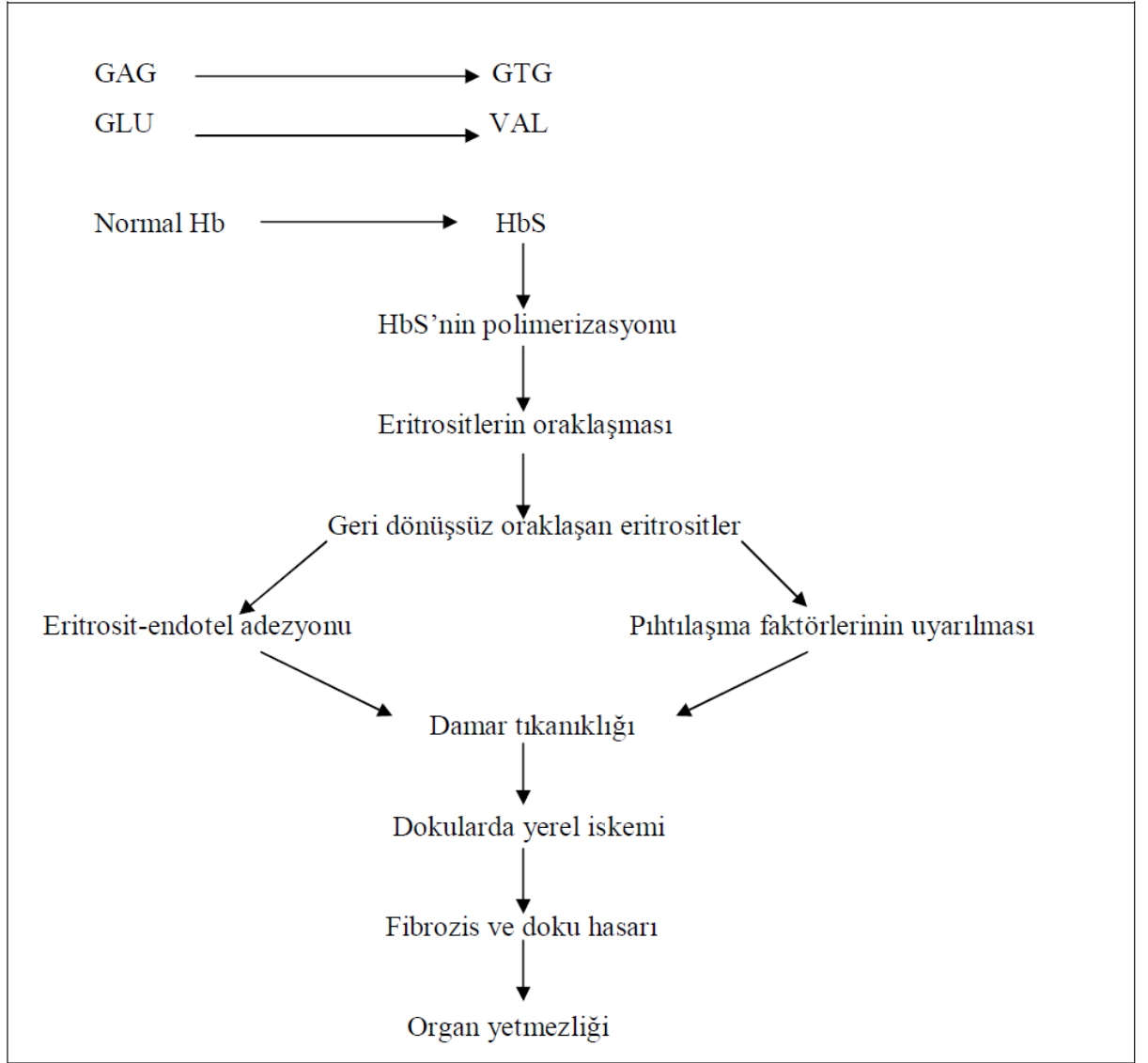
inflatuar yanıt ve reperfüzyon yaralanmaları önemli patofizyolojik mekanizmalar gibi görünmektedir (Ballas 2002).

Hemoglobin, biyolojik sistemlerde superoksit üretiminin önemli bir kaynağıdır. Hemoglobinin yapısındaki +2 (ferröz) değerlikli demirin İlaçlar, serbest radikaller veya H_2O_2 gibi endojen ürünlerin etkisi ile oksitlenerek +3 hale (ferrik) dönmesi sonucu molekülün üç boyutlu yapısının bozularak, oksijen taşıyamaması durumu olarak bilinen methemoglobin oluşumu HbS'de HbA'ya göre 1.7 kez daha hızlıdır. Bu durum ferröz formdaki demirin zaten moleküler oksijencede zengin olan hemoglobinde, moleküler oksijenin ferröz demiri yükseltgeyerek superoksit oluşturma ihtimalini arttırmaktadır. Oluşan superoksit oluşumunu hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri oluşumu takip eder. Yine, HbS içeren eritrositlerin HbA içeren eritrositlere göre iki kat daha fazla süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil ve lipid peroksidasyon ürünleri içerdiği rapor edilmiştir (Aslan ve ark. 2000).

Hidrojen peroksite maruz bırakılan methemoglobinler ile ilgili yapılan çalışmalarda, aşırı hidrojen peroksitin, hemi ayrıştırdığı, demiri bırakmasını uyardığı ve sonrada ayrışan demirin hidrojen peroksit ile tepkimeye girerek hidroksil yada diğer radikal türleri oluşturduğu gösterilmiştir (Aslan ve ark. 2000).

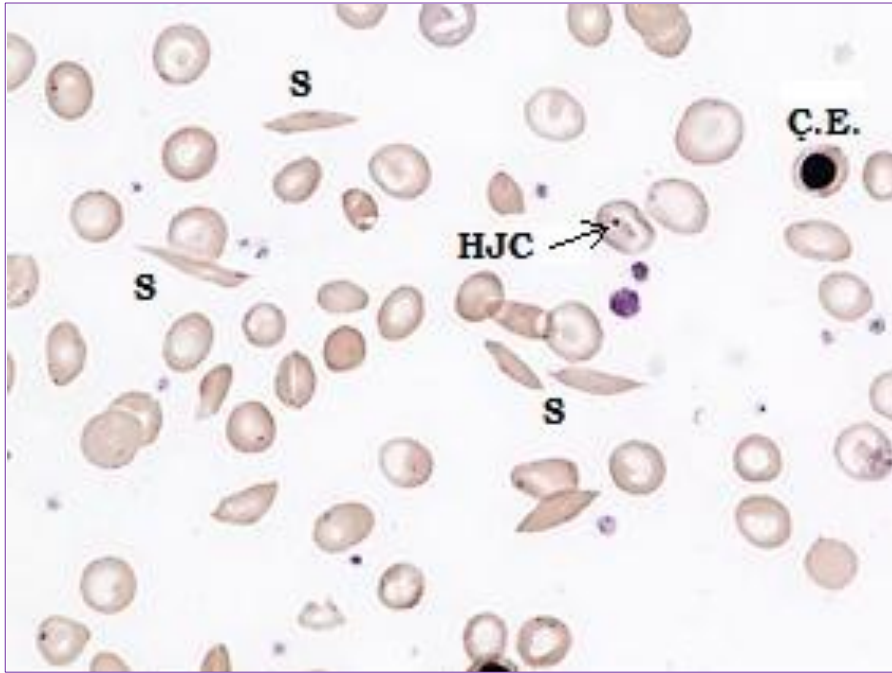
Orak eritrosit membranında hemin yapısında olan ve olmayan demirin anormal ilişkisi belgelenmiştir. Yapılan çalışmalarda Desferrioksamin inkübasyonuna maruz bırakılan eritrosit membranındaki lipid hasarının baskılanması eritrosit zarıyla ilişkili demirin ferröz formda olduğunu göstermektedir. Demir şelatörleri eritrosit membranında demir birikimini önlemiş, bu durum ferrik demirin aşırı yüksek aviditeyle eritrosit membranıyla ilişkili olduğunu göstermiştir (Aslan ve ark. 2000).

Oksijensiz ortamda hemoglobin polimerize olarak bir araya toplanır. Polimerize olan hemoglobin hücre içinde kristalleşerek çöker. Tekrar oksijenizasyon sırasında orak şekli değişmeyen hücrelere geri dönüşsüz orak hücreler (ISCs) denir. Bu hücrelerdeki yapısal bozulma dolaşım sisteminde yarı ömürlerinin kısalmasına neden olur (Wang ve Lukens 1999). Şekil 2.7.'de Orak hücre hastalığının fizyopatolajisi özetlenmiştir (Uzun 2006).



Şekil 2.7. Orak Hücre Hastalığının Fizyopatolojisi (Uzun 2006).

Orak hücre hastalarının periferik yaymasında görülen orak şeklindeki hücreler ISCs'dir. Bu hücrelerin sayısı sabittir ve hastalığın komplikasyonları ile (ağrılı kriz gibi) değişmez. ISCs, homozigot orak hücre hastalığında bulunurken taşıyıcılık tipinde yoktur (Wang ve Lukens 1999). Oksijensizliğin derecesine göre orak şekline dönen eritrositlerin periferik yayma görünüşleri Şekil 2.8'de olduğu gibidir (Ulutaş 2013).



Şekil 2.8. OHA hastasına ait periferik yayma örneği. (S) Oraklaşmış eritrosit; (Ç.E.) Çekirdekli eritrosit; (HJC) Howell-Jolly Cismi; Grunwald-Giemsa ile boyalı) (Ulutaş 2013).

2.3.Oksidatif Stres

Serbest radikaller; radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron azalması veya eklenmesi sonucu elektron çiftinin dengesinin bozulmasıyla oluşan, dış yörüngesinde eşleşmemiş elektron taşıyan , organik ve inorganik moleküller ile reaksiyona girebilme yeteneğine sahip, yüksek oranda reaktif kısa ömürlü bileşiklerdir (Baykal ve ark. 2002). Özellikleri; dengesiz ve tek olan elektronu çiftlemek için diğer moleküller ile tepkimeye girmeye yatkın olmalarıdır (Halliwell 1994). Hücrelerde metabolik dengeğin bir parçası olarak sürekli yapılırlar (Aksoy 1991).

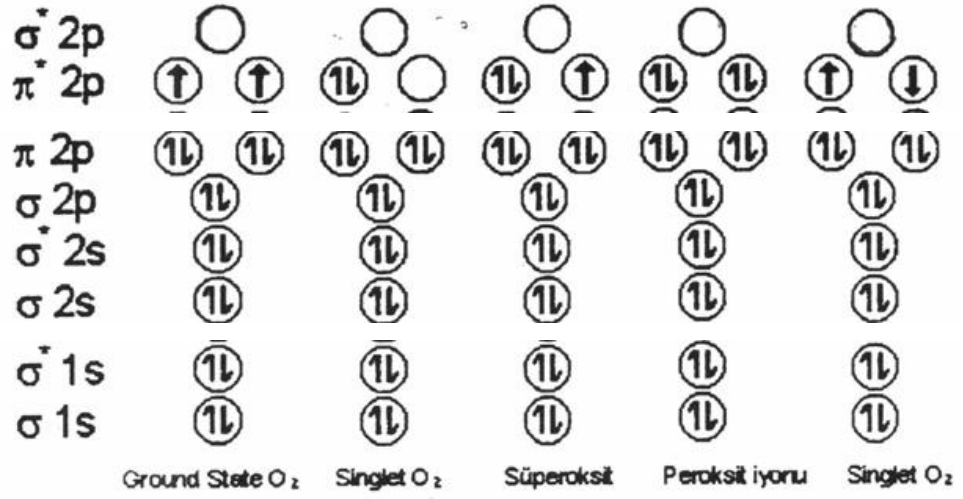
Aerobik metabolizmada denge, oluşan serbest radikallerin antioksidan sistemler tarafından uzaklaştırılması ile karakterizedir (Borgna-Pignatti ve Galanello 2004). Antioksidan, organizmadaki esansiyel maddelerin oksidasyonuna neden olabilecek moleküllerin etkileri önleyen veya geciktirebilen maddelerdir. Fizyolojik şartlarda insan vücudunda oluşan reaktif oksijen ürünleri ile antioksidan cevap bir denge halindedir. Oksidan ve antioksidan arasındaki dengesizlik fazla miktardaki reaktif oksijen türlerinin yapılmasına ve oksidatif hasara sebep olur. Geri dönüşümsüz oksidatif hasarın birikimi ile önce hücre daha sonra doku ve organ sistemlerinde yapısal ve işlevsel bozukluklar ortaya çıkabilir. Bu durum oksidatif stres olarak adlandırılır (Yeum ve ark. 2004; Kurutaş ve ark. 2004).

Reaktif oksijen türleri, reaktif nitrojen türleri (RNS) ve sülfür merkezli radikaller oksidan sınıfına girer. Ancak tüm reaktif türleri radikal değildirler (Abuja ve Albertini 2001; Word ve Peters 1996). Radikal olan ve olmayan reaktif türleri Çizelge 2.2'de gösterilmiştir (Yeum ve ark. 2004).

Çizelge 2.2. Radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri (Yeum ve ark. 2004).

Reaktif Türleri	
Radikal	Non-Radikal
Hidroksil ($\cdot\text{OH}$)	Peroksinitrit (ONOO^-)
Alkoksil ($\text{L(R)O}\cdot$)	Hipoklorit ($-\text{OCl}$)
Hidroperoksil ($\text{HOO}\cdot$)	Hidroperoksit (L(R)OOH)
Peroksil ($\text{L(R)OO}\cdot$)	Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)
Nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Süperoksit ($\text{O}_2\cdot$)	Ozon (O_3)

Canlı organizma için önemli olan yapıları, fiziksel ve kimyasal özellikleri, hücrel kaynakları, rol oynadıkları tepkimeler ve etkileri ile çeşitli klinik durumların patogeneğinde rol oynayan serbest radikaller; atomik yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulundurarak bağımsız olarak varolabilen moleküllerdir. Eşleşmemiş elektronun kazandırdığı en önemli özellik birçok radikal ile bu elektronun paylaşılabilmesidir (Dormandy 1983; Kaynak 2002; Halliwell ve Gutteridge 1989). Serbest radikallerin en önemli tepkimeleri , moleküler oksijen ve onun reaktif türlerinin olduğu tepkimelerdir. Şekil 2.9’da oksijenin orbital yapısı ve oluşan reaktif türleri belirtilmiştir (Halliwell ve Gutteridge 1989; Zwart ve ark. 1999).



Şekil 2.9. Oksijen molekülünün orbital yapısı (Halliwell ve Gutteridge 1989)

Demir, bakır, mangan, molibden gibi geçiş metalleri de dış yörüngelerinde birer elektron taşımalarına rağmen radikal karakter göstermezler. Serbest radikal kabul edilen atom ve moleküller elektron dağılımlarının yanı sıra termodinamik yapıları ve lokal kinetik reaktiviteleri ile değerlendirilir (Aslan ve ark. 1995; Byung 1994).

Antioksidan ise; okside olabilen substrata göre ortamda daha az derişimde bulunan ve bu substratın oksidasyonunu belirgin şekilde geciktiren veya engelleyen madde olarak tanımlanabilir. Bu tanıma göre antioksidanların fizyolojik rolü, serbest radikalleri içeren kimyasal tepkimelerin sonucunda hücresel bileşenlere gelebilecek zararı önlemektir (Young ve Woodside 2001). Aerobik metabolizmada denge, serbest radikal oluşumu ve bunların benzer hızla antioksidan sistemler tarafından uzaklaştırılmasıyla karakterizedir. Geri dönüşümsüz oksidatif hasarın birikimi ile önce hücre daha sonra doku ve organ sistemlerinde yapısal ve işlevsel bozukluklar ortaya çıkabilir (Clarkson ve Thompson 2000). Dokuda oksidatif hasar oluşumu ile radikal metabolitlerinin artması ve bunların oluşturduğu lipit peroksidasyonu (LPO) ile protein ve DNA oksidasyonu sonucu olarak hücre membranında kontrol kaybolur, geçirgenlik artar ve hücresel ölüm gelişir (Halliwell 1989; Freeman ve Crapo 1982).

Serbest radikaller ve serbest radikal tepkimeleri sonrası oluşan ürünlerde son 20 yıldır ciddi düzeyde artış olmuştur. Bunun sonucunda hücresel yaşam hasarı ve genetik mutasyonlar da artmıştır (Valko ve ark. 2007). Oksidatif strese yol açan

faktörlerden kaçınılması birçok hastalığın oluşumu ve progresyonu açısından oldukça önemlidir. Oksidatif stres ile ilişkili hastalıkların bazıları çizelge 2.3'de belirtilmiştir (Clarkson ve Thompson 2000).

Çizelge 2.3. Oksidatif stres ile ilişkili bazı hastalıklar (Clarkson ve Thompson 2000).

• Astım
• Ateroskleroz
• Serebral vasküler hastalıklar
• Kronik obstruktif pulmoner hastalık
• Konjestif kalp yetmezliği
• Diabet
• Hipertansiyon
• Grip
• Miyokard enfaktüs
• Pnömoni
• Hepatit
• Kanser
• İnflamasyon hastalıkları

Serbest radikallerin aerobik hücrelerde en önemli tepkimeleri moleküler oksijen ve onun reaktif türleri (süperoksit anyonu ve hidroksil radikali), peroksitler ve geçiş metallerinin olduğu tepkimelerdir (Zwart ve ark. 1999).

2.3.1. Reaktif oksijen türleri

Normal şartlarda oksijen kararlı, kokusuz, tatsız, renksiz, sudaki çözünürlüğü sınırlı bir gazdır. İnsan hayatı için hem gerekli hem de toksik olan bir moleküldür. Oksijenin iki eşleşmemiş elektronlarının ayrı orbitallerde aynı yönde dönmesi sonucu oluşan oksijen bir radikaldir (Akkuş 1995).

İnsan vücudundaki tüm hücelere kolaylıkla girebilen ve en çok kullanılma özelliğine sahip moleküler oksijen (O₂), yapı itibariyle radikal olmaya çok uygundur. Fizyolojik şartlarda ROS; hücrede mitokondrial respirasyon, hücrenin sinyal iletim sistemi ve bakteri fagositozu gibi görevler için gereklidir. Serbest radikaller karaciğerde detoksifikasyon işlemi için kullanılmaktadır. Nötrofiller de zararlı patojenleri yok etmek için serbest radikalleri üretirler. Diyabet mellitus, kanser gelişimi, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın etiyolojisinde ve ilerlemesinde ROS'un rol oynadığı gösterilmiştir (Von Sonntag 2006; Halliwell ve Whiteman 2004; Scheibmeir ve ark.2005).

Moleküler oksijen elektron transferiyle suya kadar indirgenir. Bu yol 4 elektron gerektirir ve bu yolda reaktif ara moleküller oluşur ki bunlar süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleridir. Bunlar önemli oksidatif stres ajanları olup reaktif oksijen türleri olarak adlandırılır (Çizelge 2.4) (Fridovich 2001; Nordberg ve Arner 2001).

Çizelge 2.4. Oksijenin indirgenmesi (Fridovich 2001; Nordberg ve Arner 2001).

$O_2 + e + H^+ \rightarrow HO_2^{\cdot}$	Hidroperoksil radikali
$HO_2^{\cdot} \rightarrow H^+ + O_2^{\cdot}$	Süperoksit radikali
$O_2^{\cdot} + 2H^+ + e \rightarrow H_2O_2$	Hidrojen peroksit
$H_2O_2 + e \rightarrow OH^- + \cdot OH$	Hidroksil radikali
$\cdot OH + e + H^+ \rightarrow H_2O$	

Vücutta oluşan ROS ile antioksidan savunma sistemi denge halindedir. ROS üretiminin artması veya antioksidan savunmanın azalması durumunda biyomoleküllerin yapısal ve fonksiyonel yapılarında değişikliklere yol açar ve oksidatif stres oluşur.

2.3.2.Süperoksit Radikali (O₂^{•-})

Oksijenli ortamda yaşam, oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi açısından önemli ölçüde yarar sağlarken bazı tehlikeleri de beraberinde getirir. Oksidatif fosforilasyonun ana bileşeni olan oksijene bir elektron eklenmesi ile süperoksit radikali oluşur (Kurutaş ve ark. 2004).



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 (Jacob ve Burri 1996; Halliwell 1994).

2. Çoğu 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 kaçağının olmasıdır (Dranka ve ark. 2011; Guevara ve ark. 2011).

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 (Hirche ve ark. 2005; Lafuse ve ark. 2000).

2.3.3.Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Oksijenin 2 elektronla redüklenmesi veya O₂·-'nin dismutasyonu ile H₂O₂ meydana gelir (Kim ve ark. 2011). Bu reaksiyonda, 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 (Darmon ve ark. 1992; Zhang ve ark. 1994).



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 H₂O₂'nin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirirler (Halliwell 1987; Ward 1983).



H₂O₂, Fe²⁺ veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu süperoksit radikalının (O₂·) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini (OH·) oluşturur (Jiang ve ark. 2011; Pang ve ark. 2011)

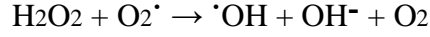
2.3.4.Hidroksil radikali (·OH)

Hidroksil radikali, “Fenton reaksiyonu” ve “Haber-Weiss reaksiyonu” sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır (Kim ve ark 2010).

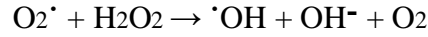
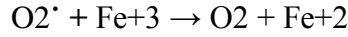
Hidroksil radikalının major oluşumu suyun yüksek enerji ile iyonizasyonudur.



Hidrojen peroksit ise süperoksit ile tepkimeye girerek en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.



Bu tepkimeye Haber-Weiss tepkimesi denir ve tepkime katalizörsüz ortamda oldukça yavaşken, demirin katalizörlüğünde çok hızlıdır. Katalizörlü tepkimede demir önce ferrik formdan (Fe+3) süperoksit ile ferröz forma (Fe+2) indirgenir. Ferröz form Fenton tepkimesi ile ferrik forma tekrar yükseltgenirken $\cdot\text{OH}$ ve OH^- üretilir (Akkuş 1995; Gutteridge 1995).



Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikalidir ve tüm biyolojik moleküllerle reaksiyona girebilir. Yarılanma ömrü çok kısadır (Catala 2009). Hızlı üretilip hızlıca ortamdan uzaklaştırılır. Buna karşın meydana getirdiği yıkıcı hasar büyüktür (Catala 2009). Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan $\cdot\text{OH}$, su dâhil ortamda rastladığı her biyomolekülle diffüzyon limiti hızı ile tepkimeye girer (Jiang ve ark. 2011; Pang ve ark. 2011).

Her tür biyolojik molekül hidroksil radikalının bir hedefi ise de, özellikle elektronca zengin bileşikler seçilen tercihli hedeflerdir (Halliwell ve Gutteridge 1984; Winterbourn 1981). Nükleik asitler, proteinler ve lipidlerde 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 (Breen ve Murphy 1995; Simic 1994). Hücre zarı su içermediğinden hidroksil radikalının (OH^{\cdot}) başlıca hedefi yağ asitleridir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini arttırıp hücre ölümüne neden olabilir (Ashley ve ark. 2008; Bhatt ve ark. 2005; Catala 2009).

Bütün bu etkiler ne kadar hidroksil radikali üretildiğine bağlıdır ve gerek H_2O_2 'den gerekse de organik peroksitlerden (ROOH), hidroksil radikali (OH^{\cdot})

yapımı ortamdaki serbest metal iyonları tarafından katalizlenir (Belcher ve ark. 2000; Valko ve ark. 2007; Yamazoe ve ark. 1998).

2.3.5.Singlet Oksijen

Dış yörüngede eşlenmemiş bir elektronu bulunmadığından serbest radikal olarak kabul edilmemektedir. Fakat serbest radikal reaksiyonlarını başlattıklarından serbest radikal sınıfına dâhil edilmiştir (Haleng ve ark. 2007; Kulbacka ve ark. 2009).

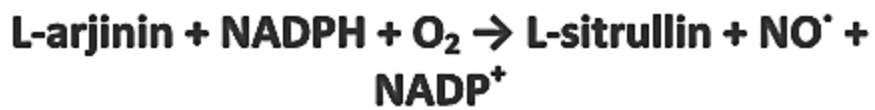
Moleküler oksijende paylaşılmamış iki dış elektron aynı yönde, ayrı yörüngelerdedir. Singlet oksijende ise elektron dönme yönleri birbirine zıttır ve oluşturdukları delta veya sigma formuna göre aynı veya ayrı yörüngelerde bulunurlar. Dönme yönlerinin farklılığından dolayı oksijenin yüksek reaktif formudur (Gutteridge 1995).

Aynı yörüngede ise delta singlet oksijen , ayrı yörüngelerde iseler sigma singlet oksijen formu oluşur. Sigma formu delta formuna göre daha enerjetik olup kolayca delta formuna dönüşebilir (Halliwell ve Gutteridge 1989; Ünal 1999).

Singlet oksijen (O₂), 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 (Afanas'ev ve ark. 1995; Karbownik ve Reiter 2000). Vücutta deri ve retina gibi gün ışığına maruz kalan bölgelerde sıkça oluştuğu tespit edilmiştir (Augustin ve ark. 1994; Augustin ve ark. 1996).

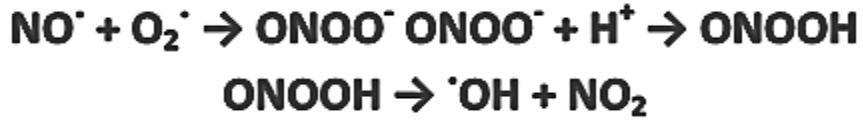
2.3.6.Nitrik Oksit (NO[•])

NO[•] enzimatik olarak nitrik oksit sentaz enzimi tarafından L-arjinin'den sentezlenir.



NO[•] eşleşmemiş elektron bulundurmasına rağmen birçok biyomolekül ile kolayca tepkimeye giremez, öte yandan peroksil, alkil gibi diğer serbest radikallerle kolayca tepkimeye girerek daha az reaktif moleküller oluşturur.

Yüksek miktarlarda O₂^{•-} yapımı NO[•] ile paraleldir ve birbirlerini etkileyerek [•]OH ve [•]NO₂ oluşumuna neden olurlar. Tepkime sırasında ise peroksinitrit (ONOO⁻) ve peroksinitröz asit (ONOOH) ara ürünleri oluşur (Nordberg ve Arner 2001).



NO[•]'in ROS ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan olan peroksinitriti (ONOOH) oluşturduğu ve bunun da ileri dekompozisyonla OH radikalinin oluşumuna yol açtığı ifade edilmektedir. OH radikali ise biyolojik olarak yıkıcı bir moleküldür. Ayrıca, peroksinitrit de tirozin gibi fenolik aminoasitleri nitrolayarak toksik nitro-türevlerini (nitrotirozin) oluşturmaktadır (Blokina ve Fagerstedt 2010). Sonuç olarak NO, endotel hücre disfonksiyonu ve buna bağlı ateroskleroz, hipertansiyon, şizofreni, ikiüçlü bozukluk, otizm ve Diabetes mellitus gibi bazı önemli hastalıklarda rol oynayabilmektedir (Domenech ve Macho 1991; Gallego ve ark. 1994).

2.3.7.Serbest Radikallerin Etkileri

2.3.8.DNA ve Nükleik Asitlere Etkileri

DNA molekülü yeniden sentezlenemeyen ancak kopyalanabilen bir molekül olduğundan DNA modifikasyonları mutasyonlara ve genetik bozukluklara neden olmaktadır (Hagen 1986; Sonntag ve ark. 2004). Proteinler, DNA tamir enzimleri ve DNA polimerazlar serbest oksijen radikallerinin major hedefleri arasındadır. DNA molekülü serbest radikaller için önemli bir hedeftir ve kolaylıkla hasara uğratılır (Hagen 1986; Sonntag ve ark. 2004). DNA molekülü hasarı sonucu kronik inflamasyon, enfeksiyon, yaşlanma, karsinogenezis, nörodejeneratif ve

kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli patolojilerin görüldüğü bilinmektedir (Cwikel ve ark. 2010; Robinson ve ark. 2012).

Radikaller, protein yapısındaki enzimlerin aktivitelerini değiştirir, membran transport proteinlerini ve reseptör etkileşimlerini bozar (Ravanat ve ark. 2012).

İyonize edici radyasyona maruz kalınması ile oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona neden olurlar. Sitotoksik etki, büyük oranda nükleik asit baz modifikasyonlarından kaynaklanan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer değişikliklere bağlıdır. Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer. Hidrojen peroksit zarlardan kolayca geçip hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücrede fonksiyon bozukluğuna ve hatta hücre ölümüne neden olabilir (Meram ve Aktaran 2002; Özkan ve Fışkın 2004).

8-OH-Guanin oluşumu

DNA bünyesinde Cu^{+2} iyonları en çok G-C'ce zengin bölgelerde bulunduğundan, en fazla oksidatif hasara maruz kalan baz guanindir. Bu iyonların polianyonik karakterde olan DNA'nın özellikle guanin bazlarına yüksek afinite ile bağlandığını ve H_2O_2 ile etkileşime girerek DNA hasarını başlattığını gösterilmiştir. Bu nedenle en yaygın olarak ölçümlenen baz hasarı 8-OHdG'dir (Helbock ve ark 1999).

DNA'da normal baz eşleşmesi Guanin-Sitozin, Adenin-Timin'dir. 8-OHdG içeren DNA'nın, *in vitro* DNA sentezi sırasında bir kalıp olarak kullanıldığı zaman yanlış okumaya ve GC—TA mutajenezine yol açtığı gösterilmiştir (Kasai 1997).

2.3.9. Proteinlere Etkileri

Proteinler, radikallerin etkilerine lipitlere oranla daha az hassastır ve amino asit dizilişlerine bağlı olarak etkilenirler. Özellikle doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle etkileşimi yüksektir. Bu nedenle triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitleri içeren proteinler serbest radikallerden daha kolay etkilenirler. İmmungulobin G ve albumin gibi disülfid bağı fazla olan proteinlerin ise üç boyutlu yapıları bozulur (Akkuş 1995; Gutteridge 1995;

Meram ve Aktaran 2002) normal fonksiyonlarını yerine getiremezler (Dean 1987; Thomas ve Aust 1986). Prolin ve lizin reaktif oksijen türleri üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler (Belcher ve ark. 2000).

Hemoglobin gibi hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler (Aslan ve ark. 2001; Blazovics 2009; Nishinaka ve Yokota 1994). Özellikle hemoglobinin süperoksit radikali veya hidrojen peroksitle reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur. Enzimler protein yapısında olduklarından enzim aktivitelerinde de değişiklik meydana gelir (Stadtman 1993).

Protein oksidasyonu; hipoklorik asit, hidroperoksit, peroksinitrit, hidroksi ve peroksi gibi serbest oksijen radikalleri türevleri varlığında direkt ve indirekt birçok yolla gerçekleşebilir (Castegna ve ark. 2002; Castegna ve ark.2002). Protein oksidasyon ürünleri arasında, protein karbonil bileşikleri (PCC); 3-nitrotirozin (3-NT), klorotirozin gibi yan zincir oksidasyon ürünleri; ditirozin ve protein ileri oksidasyon ürünleri (advanced oxidation protein products; AOPP) gibi çapraz bağlanma ürünleri sayılabilir. Bunların içerisinde, PCC ve AOPP, daha büyük protein fraksiyonlarını etkileyen global modifikasyon örnekleridir (Castegna ve ark. 2002; Stadtman 1998).

Protein karbonil türevlerinin oluşumuna yol açan primer modifikasyon reaksiyonları amino asitlerin α - karbon atomlarının veya R yan zincirlerinin oksidatif modifikasyonlarından ve bu modifikasyonları takiben meydana gelen reaktif oksijen aracılı peptit ayrılması reaksiyonundan oluşmaktadır. Reaktif oksijen türevlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda, histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda amino asit bakiyesinde ve/veya proteinlerin peptit omurgasında oluşan oksidatif hasara bağlı olarak protein karbonil ürünleri meydana gelir. Protein karbonil düzeylerinin saptanması protein oksidasyonunu belirlemede duyarlı ve genel olarak kabul görmüş bir yöntemdir (Stadtman ve Levine 2003; Dalle-Donne ve ark. 2003).

2.3.10.Karbonhidratlara Etkileri

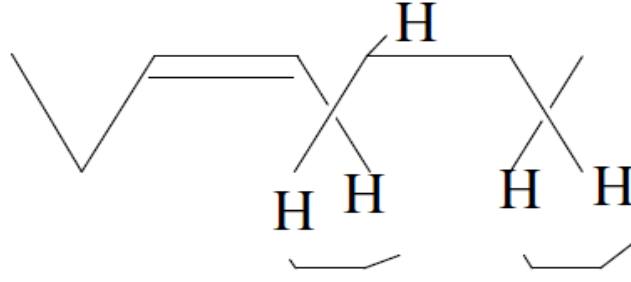
Monosokkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksit ve okzoaldehitler meydana gelir. Açığa çıkan okzoaldehitler proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki göstererek etki eder ve böylece kanser ve yaşlanmaya neden olabilirler (Meram ve Aktaran 2002). Serbest oksijen radikalleri bağ dokunun önemli bir bileşeni olan hiyalüronik asit gibi karbohidratların parçalanmalarına da yol açabilirler (Kurutaş ve ark. 2004).

2.3.11.Lipitlere Etkileri

Serbest radikallerin biyolojik dokulardaki doymamış yağ asitlerine etkileri lipit peroksidasyonu olarak bilinir. Biyolojik zarların yapısı lipit ve proteinden oluşmaktadır, lipit peroksidasyonu lipitlere olduğu kadar zar proteinlerine de zarar verir (Halliwell B, Gutteridge 1989). Lipit peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) reaktif oksijen türleri tarafından peroksitler, alkoller, malondialdehit, etan ve pentan gibi ürünlere yıkılma tepkimelerine denilmektedir. Yağ asitlerinin peroksidasyonu sonrasında açığa çıkan ürünler zar geçirgenliğini ve akışkanlığını ciddi şekilde etkileyip hücre ve organel içeriklerinin ayrılmasına neden olan kopma ve kırılmalara yol açar. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen zar hasarı geri dönüşümsüzdür (Kurutaş ve ark. 2004; Gutteridge 1995).

Hücre fonksiyonları açısından, hücre membranlarının bütünlüğü ve akışkanlığı çok önemlidir. Ökaryotlarda bu akışkanlık membran lipidleri içine sokulan çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) sayesinde (Sekil 2.10) olmaktadır. Lipid peroksidasyonunun (LPO) başlaması için, PUFA'ların yan zincirindeki bir metilen karbonundan bir hidrojen atomu çekmeye yetecek reaktivitesi olan herhangi bir kimyasal yeterlidir (Halliwell ve Gutteridge 1985).

Bütün PUFA'lar temel bir yapıya sahiptir. Komşu çifte bağlar, karbon-alilik hidrojen bağlarını zayıflatır. İki çifte bağ arasındaki karbon atomlarına bağlı alilik hidrojenler, serbest radikaller tarafından çıkarılmaya karşı kısmen aktif halde bulunurlar. Bu şekilde oluşan lipid radikalleri, reaksiyon zincirinin başında moleküler oksijen ile reaksiyona girerler ve böylece PUFA'ların yapısı bozulmuş olur. Oluşan bu reaksiyon dizisi, lipit peroksidasyonudur (Horton ve Fairhurst 1987).



Alilik hidrojen

Şekil 2.10. PUFA'ların genel yapıları (Horton ve Fairhust 1987)

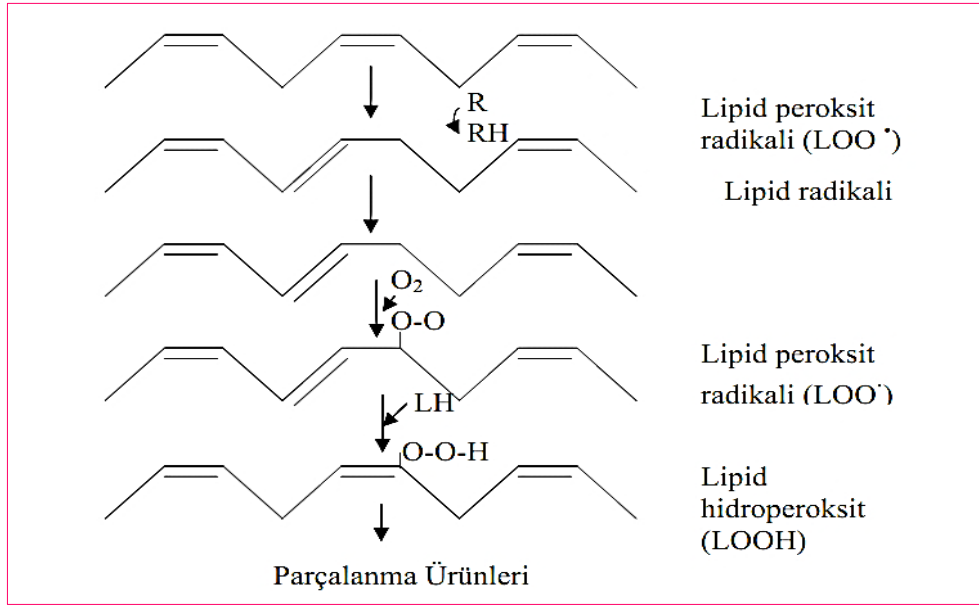
Lipid peroksidasyonu (LPO) üç basamakta oluşur (Şekil 2.11).

1)Başlama Evresi: Serbest radikal etkisiyle yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması sonucu zincir, radikal, (L[•]) özelliği kazanır.

2)Türeme Evresi: Bu radikal, aerobik hücrelerde moleküler düzenlenmeye uğrar ve moleküller oksijen ile reaksiyona girerek peroksil radikalini (LOO[•]) oluşturur.

3)Sonlanma Evresi: Radikal olmayan ürünün oluşma basamağıdır. Çifte bağların yeniden düzenlenmesinden sonra moleküler oksijen eklenerek lipid hidroperoksit ya da endoperoksit oluşur.

Orjinal yağ asidinde en az üç çift bağ varsa son ürün olarak malondialdehit (MDA) oluşur. Böylece tek bir başlatıcı etkisiyle yüzlerce yağ asidi zincirinin lipid hidroperoksitlere (LOOH) dönüşümü söz konusudur (Fuji 1991).



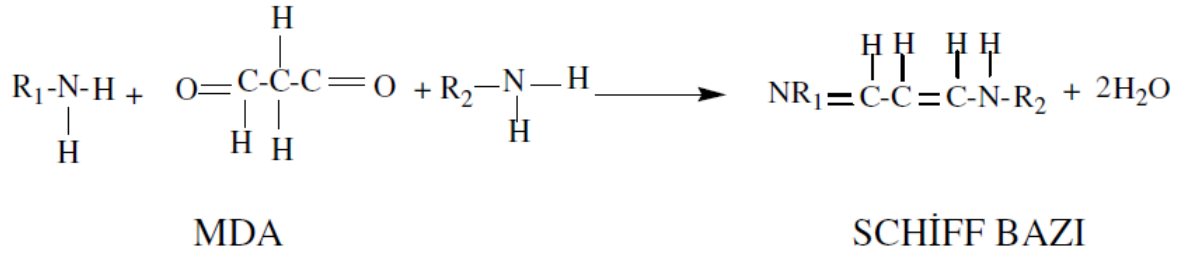
Şekil 2.11. Lipit peroksidasyonu ve parçalanma ürünleri (Ulutaş 2013)

Malondialdehit (MDA)

Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü MDA'dır. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği sebebiyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir. (Niki 1987; Placer ve ark. 1990; Porter 1984).

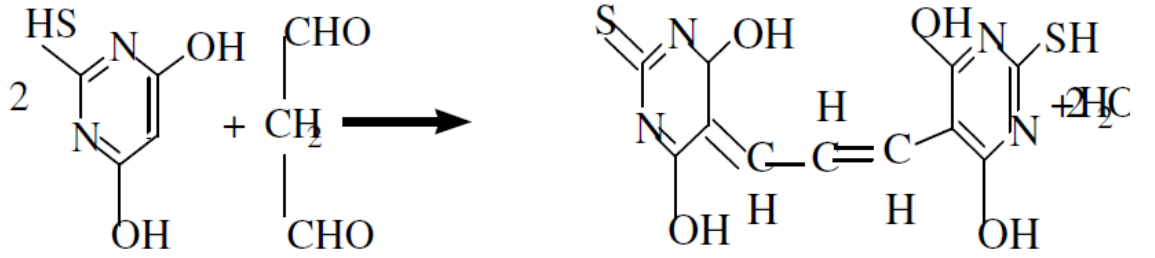
MDA, tiobarbitürik asid (TBA) ile belirlenebilen bir lipid peroksidasyon ürünüdür. Bilirubin gibi diğer başka maddeler de TBA ile reaksiyon verdiğinden, lipid peroksidasyon düzeyi TBA-Rs olarak ifade edilir (Knight ve ark. 1988).

MDA, kısa zincirli bifonksiyonel bir aldehittir. İki amino grubu ile bir SCHIFF bazı vermek üzere reaksiyona girer. MDA'nın biyolojik moleküllerle çapraz bağ yapmasıyla oluşan schiff bazının floresansı, lipid peroksidasyonu tayini için kullanılmaktadır (Horton ve Fairhurst 1987).



Şekil 2.12. MDA' nın biyolojik moleküllerle çapraz bağ yapmasıyla oluşan schiff bazı (Yalçın 2006).

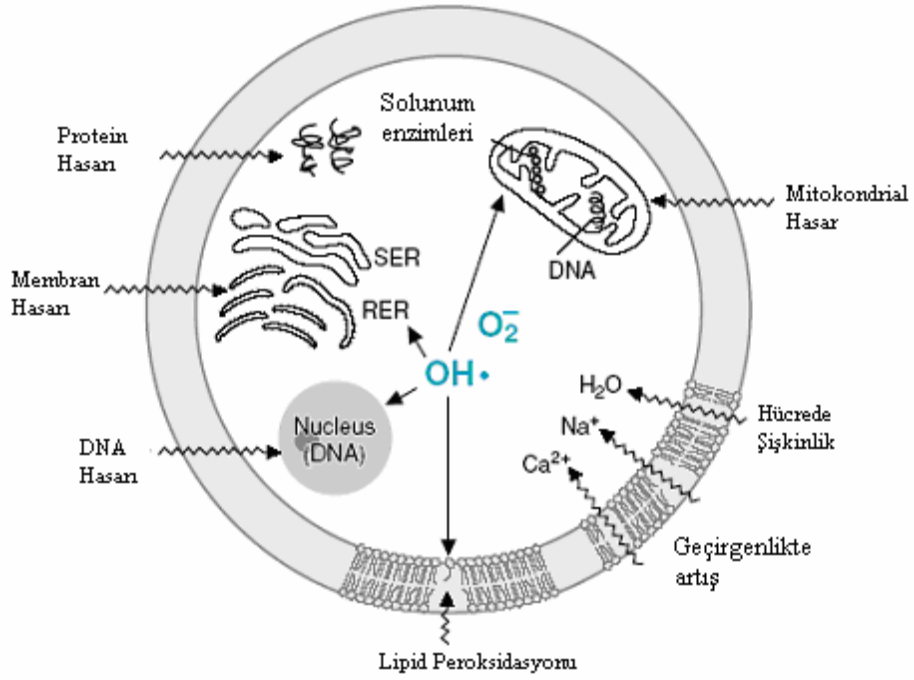
MDA iki molekül TBA ile reaksiyona girerek UV spektrofotometrede 532 nm'de pembe renkli bir kompleks oluşturur (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. MDA ile Tiyobarbitürik asitin reaksiyonu (Slater 1984).

2.4. Antioksidan Sistemler

Organizma içindeki radikaller, geri dönüşümsüz hücre hasarına yol açan birçok tepkimeye neden olurlar (Şekil 2.14). Süperoksit ve hidroksil radikalleri hüresel, mitokondrial, nükleer ve endoplazmik zarlarda lipit peroksidasyonunu başlatırlar. Geçirgenlikteki artış mitokondrial hasara neden olan Ca⁺²'un hücreye akın etmesine neden olur (Word ve Peters 1996).



Şekil 2.14. Radikallerin yol açtığı hücre hasarı (Antmen 2005).

Hücre ve organ sistemlerini reaktif oksijen türlerine karşı koruyabilmek için organizma karmaşık bir sistem geliştirmiştir. Bu sistem endojen ve eksojen orjinli, etkileşimli ve birlikte çalışan çeşitli bileşenler içerir (Percival 1998). Antioksidan sistem hasar öncesi radikal oluşumunu önler, oksidatif hasarı onarır, hasara uğramış molekülleri temizler ve mutasyonları önler.

Antioksidanları hücre içi, hücre dışı ve zar antioksidanları olarak sınıflandırabiliriz. Bunlara örnek vermek gerekirse; hücre içi antioksidanlar için süperoksit dismutazları, katalazı, glutatyon peroksidazı, glutatyon S transferazı, glutatyon redüktazı; zar antioksidanları için E vitaminini, β karoteni, koenzim Q'yu; hücre dışı antioksidanlar da ise transferini, laktoferrini, haptoglobini, hemopeksini, albumini, seruloplasmini, ekstrasellüler süperoksit dismutazı, ekstrasellüler glutatyon peroksidazı, bilirubini ve askorbik asiti sayabiliriz (Gutteridge 1995).

Reaktif oksijen türlerine karşı primer savunma enzimatik ve enzimatik olmayan intrasellüler antioksidanlarca yapılır (Bowler ve Crapo 2002).

2.4.1.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 radikalini temizler (Reiter ve ark. 2001; Poeggeler ve ark. 1993; Yoshida ve ark. 2003).

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 (Lakshmi ve ark. 1994).

E Vitamini: α , β , γ , δ olmak üzere dört farklı tokoferol formu bulunur. Biyolojik olarak en yaygın ve en aktif E vitamini şekli olan d- α -tokoferoldür. Yağda çözünen fakat suda çözünmeyen bu bileşikler oksijen bulunmayan ortamlarda asit ve sıcaklığa dayanıklıdır (Tadmouri ve Başak 2001).

Eşleşmemiş elektronlarla reaksiyona giren ve indirgeyebilen hidroksil grubu içerir. Radikal reaksiyonları sırasında zincir kırıcı etkiye sahiptir. Glutasyon ve askorbik asit ile antioksidan etkisi artar (Zwart 1999; Tadmouri ve Başak 2001; Burtis ve Ashwood 2005). Lipid peroksidlerini inaktive eder. Ayrıca lipid peroksid zincirini kırar ve LPO tepkimelerini durdurur (Gilbert ve Colton 2002).

Seruloplazmin (Cp): Seruloplazmin total serum bakırının yaklaşık %95'ini içeren α 2-globulindir. Cp'nin primer fizyolojik rolü plazma redoks reaksiyonlarıyla ilişkilidir. Serbest ferik iyonları ve ferritin bağlayan bölgelerin varlığı gibi faktörlere bağlı olarak oksidan veya antioksidan olarak işlev görür. Cp'nin demirin iyonik durumunu düzenlemede ve toksik demir ürünleri oluşmaksızın demirin transferine girmesinde yaşamsal önemi vardır (Burtis ve Ashwood 2005).

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 (Büyükhatipoğlu ve ark. 2010).

C vitamini: Askorbik asit insan plazmasında ve hücre zarında bulunan, zarı geçebilen major antioksidanlardan biridir. Suda çözünebilir düşük moleküler ağırlıklı bu antioksidan kollojen sentezi, demir absorpsiyonu ve hücrelerin redoks durumunun korunmasında gereklidir. Tokoferoller, peroksidler ve süperoksit gibi reaktif oksijen türlerini redükler.

Askorbik asitin antioksidan olarak esas görevi lipit hidroperoksitlerin oluşumunu engellemektir. Bu da aterosklerotik plak oluşumunu engellemede önemli rol üstlendiğini gösterir (Frei ve ark. 1990).

Transferin ve Laktoferrin: Transferin dolaşımda serbest halde bulunan demiri bağlar (Habdous ve ark. 2003; Montagna ve ark. 1994). Kanda demir taşıyan bir β -globindir. Laktoferrin ise dolaşımdaki serbest demiri düşük pH'larda bağlar (Akkuş 1995; Burtis ve Ashwood 2005).

Ürik asit: İnsanlarda pürin nükleozidleri olan adenzin ve guanozin katabolizmasının temel ürünü ürik asittir. Metal bağlayıcı ve serbest radikal temizleyicisi olarak görev alır (Becker ve Roessler 1995).

Normal plazmadaki süper oksit, hidroksil ve peroksil radikallerini temizlemekle görevlidir (Montagna ve ark. 1994; Senol ve ark. 2008).

Albümin: Geçiş metallerini bağlar, lipid hidroperoksit (LOOH) ve hipoklorit (HOCl) toplayıcısıdır (Haleng ve ark. 2007).

Bilirubin: Bilirubinin büyük bir kısmı ömrünü dolduran eritrositlerin parçalanmasından kaynaklanır, dolaşımdan karaciğer tarafından alınır ve biyotransformasyona uğrar, safra ve idrarla atılır (Burtis ve Ashwood 2005).

Antioksidan olarak serbest radikalleri tutar, süper oksit ve hidroksil radikalleri toplar (Haleng ve ark. 2007).

Taurin: Ksenobiotiklere bağlanır. Hipoklorit ile tepkimeye girer ve etkisini azaltır. LPO ve nötrofil infiltrasyonunu inhibe eder. Antioksidan etkisinin olduğu gösterilmiştir (Halliwell 1987).

Sistein: Potent bir antioksidandır. Glutasyon sentezi için prekürsördür (Halliwell 1994).

β -Karoten: A vitamininin öncüsüdür ve membranlarda bulunur. Serbest radikal temizleyicisidir. Peroksitlere doğrudan (Bolzan ve ark. 1997) etki ederek peroksitleri inaktif hale getirir (Blazovics 2009; Ames ve ark. 2005).

Haptoglobin (Hp): Haptoglobin hemoglobini geri dönüşümsüz olarak bağlayan bir α 2-glikoproteindir. Ekstrasellüler hemoliz sırasında hemoglobin eritrositlerden salınır ve serbest hemoglobin dimerleri tümüyle haptoglobine bağlanır (Burtis ve Ashwood 2005).

Selenyum: Selenyum yiyeceklerde selenosistein öncü maddesi olan selenitler, selenatlar ve selenometiyonin olarak bulunur. İn vitro hayvan deneylerinde Se bileşiklerinin apoptozisi ve transforme hücrelerde hücre siklusunu indirgediği gösterilmiş ve bundan dolayı da kanser hücre gelişimini durduğu ileri sürülmüştür (Burtis ve Ashwood 2005; Onat ve ark. 2002).

Flavonoidler: Flavonoidler çeşitli sebze, meyve ve otlarda bulunan polifenol grubu doğal kimyasallardır. Doğada altı binin üzerinde flavonoid vardır. Antioksidan, antiarteriyosklerotik, antiinflamatuvar, antitümör, antitrombojenik, antiviral, antialerjik etkileri vardır. Flavonlar, flavonollar, flavanonlar; kateşinler, isoflavonlar, antosiyanidinler olarak altı sınıfa ayrılırlar.

Flavonoidler, önemli metal şelatörleri ve serbest radikal temizleyicisi gibi rol oynarlar. Flavonoidler tarafından temizlenebilen ve formasyonları inhibe edilebilen reaktif oksijen ürünleri; süperoksit anyonları, hidroksil radikali, alkol radikali, peroksil radikali ve perhidroksi radikalidir. Flavonoidler, radikallerin reaktif kısımlarıyla etkileşerek, reaktif oksijen ürünlerini stabilize ederler (Nijveldt ve ark. 2001).

Ubikinon (Koenzim Q): Ubikinon esas olarak mitokondride elektron transport zincirinin bir parçası olarak kullanılmaktadır, bunun yanında ubikinon düşük derişimlerde plazmada ve hücre zarlarında lipit peroksidasyonuna karşı koruyucu antioksidan olarak bulunur.

Ubikinonun yenilenmesi lipoamid dehidrogenaz ve kısmen tiyoredoksin redüktazı da içeren enzim ailesinin diğer üyeleriyle gerçekleştirilir (Ernster ve Dallner 1995; Xia ve ark. 2001).

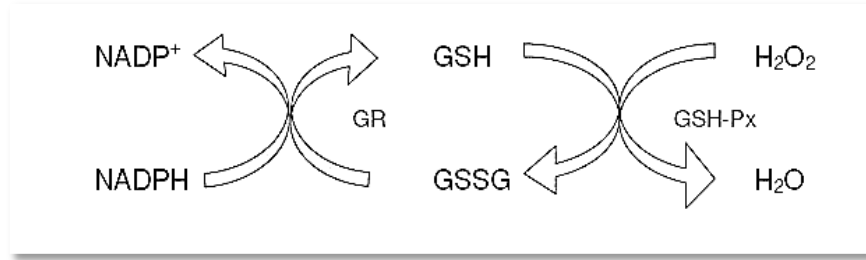
2.4.2.Enzimatik Antioksidanlar

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) belli başlı antioksidan enzimlerdir (Kaur ve Ling 2008). Bu enzimler, oksidatif strese bağlı oluşan aşırı hasarın dengelenmesinde büyük öneme sahiptir.

Glutasyon Peroksidaz Enzimi

Glutasyon Peroksidaz organik hidroperoksitlerin (lipit hidroperoksitler, DNA hidroperoksitler) veya hidrojen peroksitin GSH tarafından indirgenmesi tepkimesini katalizler. 1957'de Mills tarafından keşfedilmiştir (Knapen ve ark. 1999). Yapısında selenyum metalini bulundurur. Bu nedenle metalloenzim grubunda değerlendirilir. İn vitro ortamda Redükte glutasyon (GSH), okside glutatyona (GSSG) çevrilir (Bolzan ve ark. 1997). Bu tepkimede hidrojen peroksiti (H₂O₂) yüksek özgülük ile katalizleyerek detoksifiye eder. Tepkimede GSH, GSSG haline dönüşürken glutasyon peroksidaz enzimi H₂O₂'yi suya indirger. GSSG ise glutasyon redüktaz (GR) enziminin katalizlediği tepkimeyle NADPH harcanarak tekrar redükte hale

çevrilir (Bolzan ve ark. 1997; Fujita ve Fujimoto 1992; Jain 1984). Tepkime aşağıdaki şekilde şematize edilmiştir. Ortamda H_2O_2 düşük konsantrasyonda bulunduğu glutasyon peroksidaz enzimi (GSH-Px), katalaz enziminine göre daha etkili bir antioksidandır (Bolzan ve ark. 1997).



Glutasyon Peroksidaz enzimi iki gruba ayrılabilir: selenyum bağlı ve selenyum bağlı olmayan. Selenyum bağlı grupta hidrojen peroksit ve diğer organik peroksitleri indirgeyen beş üye vardır, selenyum bağımsız Glutasyon Peroksidaz ise hidrojenperoksit ile ihmal edilebilir bir aktifliğe sahip olup sadece organik hidroperoksitleri redükler (Cnubben ve ark. 2001).

Selenyum bağımlı üyelerden, GSH-Px 1 veya hücrel GSH-Px bütün hücrelerde eksprese edilen, tetramerik yapıda, sitozolik bir enzimdir. Eritrosit, böbrek ve karaciğerde yüksek miktarda bulunur. GSH-Px 2 veya gastrointestinal GSH-Px insanlarda karaciğer ve gastrointestinal kanalda eksprese edilir; böbrek, kalp, akciğer, plasenta ve uterusunda bulunmaz. GSH-Px 3 veya plazma GSH-Px plazmanın lipit kısmından izole edilmiş bir glikoproteindir, akciğer, plazma ve diğer ekstrasellüler sıvılarda bulunur. GSH-Px 4 veya fosfolipit GSH-Px sitozolde, mitokondri ve hücre zarında bulunur. GSH-Px 5 veya epididimal GSH-Px selenyum bağlı değildir ve yalnız epididimiste eksprese edilir. GSH-Px 6 hücrel GSH-Px ile homoloji gösterir, burun epiteli ve embriyolarda eksprese edilir (Knapen ve ark. 1999; Hall ve ark. 1998; Haan ve ark. 1998).

Katalaz Enzimi

Katalaz enzimi (CAT) glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. Ferri protoporfirin grubu içeren dört alt üniteden oluşmuştur. Prostetik grubunda Fe^{+3} 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 (Schallreuter ve ark. 1999; Schellhorn 1995). H₂O₂'in yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu ortamlarda oldukça etkilidir. Ortamda oluşan H₂O₂'yi okside edici enzimlerin etkisiyle direkt olarak suya dönüştürür. CAT enzim aktivitesi, ortamda H₂O₂ konsantrasyonunun çok arttığı durumlarda aşikar olarak artmaktadır (Del Rio ve ark. 1992; Nishikawa ve ark. 2009).

Ortamdaki H₂O₂ konsantrasyonu düşük olduğu durumlarda hidrojen peroksiti substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (GSH-Px gibi) devreye girerek hidrojen peroksiti ortamdan uzaklaştırırlar (Schallreuter ve ark. 1999). 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 (Csiszar ve ark. 2004; Spector ve ark. 1996).

Süperoksit Dismutaz Enzimi

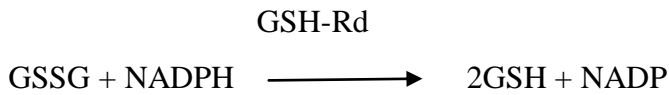
Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksitin H₂O₂'e dismutasyonunu katalizleyen enzim grubudur. Bu tepkime spontan olarak oluşabilmektedir. SOD enzimi bu tepkimeyi katalize ettiğinde hız normale göre 4 kat artar (Ishigami 2002; Peskin 1997). Radikallere karşı hücreyi koruyan savunma mekanizmaları arasında 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 (Fukai ve Ushio-Fukai 2011; Hileman ve ark. 2001).

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 (Skrzycki ve Cieczot 2004). Mn-SOD homotetramer yapıdadır, her subünitesinde bir Mn iyonu bulunur ve 88 kDa ağırlığındadır. Hücresel Mn-SOD içeriği kalp, beyin, karaciğer,

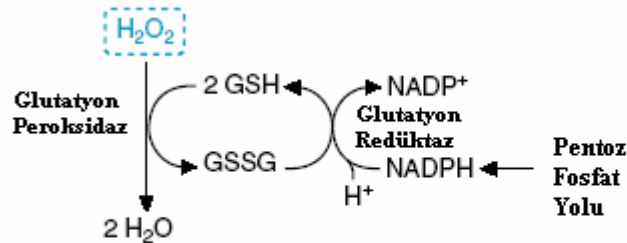
böbrek gibi yüksek metabolik aktivitesi olan dokularda daha fazladır (Mansouri ve ark. 2010; Ozden ve ark. 2011). CuZn-SOD 32 kDa ağırlığında olup memelilerde en çok karaciğer, böbrek, eritrosit ve santral sinir sisteminde bulunur. İki protein subünitesi içerir her subünitede Cu ve Zn atomları bulunur. EC-SOD ise en çok vaskülatür, akciğer, uterus ve tiroid bezlerinde bulunur (Peskin 1997; Fujii ve ark. 1996).

Glutasyon Redüktaz Enzimi (GSH-Rd)

Okside glutasyon (GSSG) NADPH bağlı flavo enzim olan Glutasyon Redüktaz tarafından redükte formuna (GSH) indirgenir (Young ve Woodside 2001; Nordberg ve Arner 2001; Knapen ve ark. 1999).



Glutasyon redüktazın kalıtımı otozomal dominanttır, 8. kromozom üzerindedir. Glutasyon peroksidaz ile benzer doku dağılımı gösterir. Glutasyon redüktaz flavin adenin dinükleotid (FAD) içerir, NADPH'tan bir elektronun GSSG'nin disülfid bağlarına aktarılmasını katalizler. Bu nedenle NADPH serbest radikal hasarına karşı gereklidir ve major kaynağı pentoz fosfat yoludur (Özkan ve Fışkın 2004).



Şekil 2.15. Glutasyon redoks döngüsü (Antmen 2005).

Glutasyon-S-Transferaz Enzimi (GST)

GST memeli türlerinde elektrofilik bileşenlerin GSH ile konjugasyonunu katalizleyen izoenzimlerin oluşturduğu çoklu bir gen ailesinden oluşur; alfa, mu, teta, pi, zeta, sigma, kappa ve omega olarak gösterilen 8 esas gen sınıfı ile düzenlenmiştir. Alfa kromozom 6'da, mu kromozom 1'de, teta kromozom 22'de, pi kromozom 11'de, zeta kromozom 14'de, sigma kromozom 4'de, kappa ve omega kromozom 10'da kodlanır (Özkan ve Fışkın 2004; Strange ve ark. 2001).

GST karsinogenleri, çevresel etmenleri, ilaç ve geniş spektrumlu ksenobiotikleri metabolize eder. Mikrozomal GST belirlendiyse de GST aktivitesi esasen sitozoliktir (Knapen ve ark. 1999). GST iki subüniteden oluşmuş dimerik bir proteindir. Bu subünitelerden her biri glutasyon bağlanma bölgesi (G bölgesi) ve buna komşu elektrofilik substrata bağlanan nispeten hidrofobik olan bölge içerir. Bunun yanında çeşitli izoenzimlerde transport veya düzenleyici fonksiyonu olduğu düşünülen substrat bağlanmayan bölge de belirlenmiştir.

GST, hidroksialkenler, lipit peroksidasyonunun ürünlerinden propenaller ve DNA hidroperoksitleri gibi endojen zararlı bileşiklerin detoksifikasyonunu sağlayabildiği için oksidatif strese karşı savunmaya katılır, bunun yanında epoksidler ve kinonlar gibi maddelerin biotransformasyonunda elektrofilik ksenobiotikler ve/veya reaktif ara ürünler oluşabilir (Özkan ve Fışkın 2004; Cnubben ve ark. 2001).

GST enziminin teta ve alfa sınıfları selenyum bağlı olmayan Glutasyon peroksidaz aktivitesi gösterirler, GST pi formu lipit hidroperoksitleri ve hidroksialkenler, malondialdehitler ve propenalleri inaktive eder. GST pi ayrıca hassas SH- grubuyla ROS ile direkt reaksiyona girerek disülfüd yapımının inaktif olmasına neden olur (Cnubben ve ark. 2001).

Tiyoredoksin sistem

Tiyoredoksin sistem oksidoredüktaz enzim aktivitesi gösteren tiyoredoksin (Trx) ile tiyoredoksin redüktazı (TrxR) içeren iki antioksidan enzim sistemi içerir. Memeli ve prokaryotik hücrelerde bulunur.

Tiyoredoksin redüktaz NADPH kullanarak tiyoredoksinin disülfid aktif bölgesini ve pek çok substratı redükler. Yapılan çalışmalarda, tiyoredoksinin insanda immun sistem düzenlenmesiyle ilişkili olduğu ve farklı genlerce kodlanan üç farklı

varyantı gösterilmiştir. Tiyoredoksin redüktaz izoenzimleri, her subünitesinde bir FAD bulunduran NADPH bağlı oksidoredüktazlardır. Tiyoredoksin redüktazın ilk saflaştırılması 1977’de yapılmıştır (Nordberg ve Arner 2001).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Çalışma Şekli

Çalışmada kullanılacak olan kan örnekleri Antakya Devlet Hastanesi Hematoloji Polikliniği'nde Orak Hücreli Anemi tanısı konmuş ve tedavisi tamamlanmamış 18 yaş altı hastalardan, kontrol grubunun kan örnekleri ise herhangi bir hemoglobinopatisi bulunmayan 18 yaş altı sağlıklı bireylerden alındı. Olgulardan jelli biyokimya tüpüne alınan kan örnekleri +4°C'de 15 dakika bekletilip santrifüjde çevrildikten sonra elde edilen serumlar ependorf tüplere porsiyonlandı. Örnekler çalışma yapılncaya kadar -80°C derin dondurucuda saklandı. Soğuk zincire göre dondurulup çözülen serum numunelerden MDA ve protein karbonil düzeyleri ELISA ve manuel spektrofotometrik olarak, 8-OHdG düzeyleri ise sadece ELISA yöntemiyle ölçüldü.

3.2. Kullanılan Cihazlar

Cihazlar	Marka & Model
✓ UV spektrofotometre	Schimadzu-UV 1800
✓ Su Banyosu	Thermomix BU
✓ Soğutmalı Santrifüj	NUVE Centrifuge RF1200
✓ Manyetik karıştırıcı	Heidolph MR 2002
✓ Vorteks	Elektro-mag M-16
✓ Elektrikli Terazı	Mettler P 1210
✓ Otomatik pipet	Gilson P-20, P-100, P-200, P-1000 µl
✓ Biomerieux (TekTime) Micro ELISA cihazı	
✓ Architect c 8000 Biyokimya Otoanalizörü (Abbott inc, USA)	

3.3.Kimyasal Maddeler

Kimyasallar	Firma	Kullanım Yeri
✓ Trikloroasetik asit (TCA)	Merck 1.00810.0250	Protein karbonil, MDA
✓ Tiyobarbütirik asit (TBA)	Merck 1.08180.0025	MDA
✓ Hidroklorik asit (HCl)	Merck 1.00314.2500	Protein karbonil
✓ 2,4-Dinitrofenilhidrazin (DNPH)	Sigma D199303-100G	Protein karbonil
✓ Etanol	Merck 1.00983.2500	Protein karbonil
✓ Etil Asetat	Merck 1.00864.2500	Protein karbonil
✓ Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck 1.06642.1000	Protein karbonil

3.4.Hematolojik Analizler

3.4.1.Total Protein Miktar Tayini

Nunumuneler oda ısısında çözdürülerek Architect c 8000 Biyokimya Otoanalizör (Abbott inc, USA) cihazıyla total protein değerinin ölçümleri yapıldı ve sonuçları kaydedildi.

3.4.2.Manuel Spektrofotometrik Yöntem ile Protein Karbonil Tayini

Deney Prensipleri

Serum protein karbonil grupları Levine ve ark. Modifiye spektrofotometrik metoduna göre çalışıldı. 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNP) karbonil grupları ile birleştiğinde renkli bir hidrazon oluşmakta ve oluşan bu hidrazonun absorbanısı 360 nm dalga boyunda okutulmaktadır.

Reaktifler

- ✓ 2 M Hidroklorik asit (HCl)
- ✓ 10 mM 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNP) (MW= 198,14 g/mol)
- ✓ %20'lik trikloroasetik asit (TCA)
- ✓ Etanol-Etil Acetat (1/1)
- ✓ 100 mM Sodyum Hidroksit (NaOH) (MW=40 g/mol)

Deneyin yapılışı

1- 2 ml'lik ependorflara:

Numune.....0,5 ml

TCA (%20).....0,5 ml

eklenerek vortekslendi, 11.000 g'de 10 dk santrifüj edildikten sonra, süpernatantı dikkatlice döküldü.

2- Tortunun üstüne:

2 M HCl içinde 10 mM 2,4 DPH 0,5 ml

eklenerek iyice vortekslendi, oda ısısında 1 saat bekletildi. Her 10-15 dakikada bir vortekslendi.

3- Üstüne:

% 20 TCA.....0,5 ml

eklenerek vortekslendi, 11.000 g'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatant döküldü.

4- Üstüne 3 defa:

Etanol-Etil asetat.....1 ml

eklenerek vortekslendi 10 dk beklendikten sonra, 11.000 g'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant süzgeç kağıdı ile süzülerek döküldü.

5- Tortunun üstüne:

100 mM NaOH.....0,6 ml eklendi ve 15 dk. 37 C'de çalkalayıcıda çözüldü.

6- 11.000 g'de 5 dk santrifüj ile çözünmeyenler çöktürüldü.

360 nm de 1 ml'lik quartz küvet ile okundu.

Hesaplaması

PC miktar= [(Abs/22000)x100000x dilüsyon faktörü]/(Protein mg/ml)= nmol/mg prot.

3.4.3.ELISA Yöntemi ile Protein Karbonil Tayini

ELISA yöntemi, özgül antijen-antikor bağlanmasını göstermek amacıyla enzimle işaretli konjugat ve enzim substratı kullanılarak renklendirilmesi esasına dayanmaktadır. Yöntem; antijen, antikor ve haptenlerin saptanmasında kullanılan kantitatif bir tekniktir.

Bütün ELISA testleri kompleks, birden fazla içeriği olan sistemlerden oluştuğundan ve bu içeriklerin duyarlı ve kesin sonuçlar alınmasını direkt etkilemelerinden dolayı, test parametrelerinin ve içeriklerinin dikkatlice seçilmesi gerekmektedir.

Katı faz

İmmünreaktiflerin antijen ya da antikorun bağlandığı katı faz, daha sonra oluşacak olan antijen-antikor reaksiyonlarının kendine bağlı kalmasını sağlar. Katı faza bağlanmayı etkileyen faktörler şunlardır; katı fazın yapısı, antijenin fiziksel özellikleri, izoelektrik noktası, kimyasal yapısı, immünreajenlerin konsantrasyonu ve saflığı, kaplama için gerekli ısı ve inkübasyon periyodu, kaplama solüsyonunun iyonik gücü ve pH'dır.

Konjugat

Yönteme bağlı olarak ELISA, enzimle işaretli antijen veya antikor içermelidir. Konjugat kullanılırken antikorun enzimle işaretlenmesi kolay olduğu için daha sıklıkla antikor kullanılır. Klinik immünoloji laboratuvarlarında en yaygın olarak kullanılan enzimler alkaline fosfataz ve horseradish peroksidaz'dır. Bunun dışında β galaktosidaz, glukoz oksidaz, üreaz, karbonik anhidraz, lizozim, glukoz-6 fosfat dehidrogenaz enzim olarak kullanılabilir.

Substrat

Substrat, enzimle reaksiyona giren ve böylece renk değişikliğine uğrayan maddedir. Kullanılan enzime bağlı olarak kullanılan substrat, floresan, radyoaktif, kemilüminesans, kromojenik karakterli olabilir. Substrat enzime spesifiktir. Öncelikle substrattan ölçülebilir ve çözünür bir reaksiyon ürünü oluşmalıdır. Bu ürün renkli olup gözle ya da spektrofotometre ile tespit edilebilir. En yaygın kullanılan substratlar O-fenilendiamin, 5-aminosalisilik asit, Azido-benzo-thiazolidin-sülfat, 3-3', 5-5' Tetrametilbenzidin, alfa-naftol ve toluidin'dir (Altuntaş 2007).

Protein karbonil tayinleri Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarlarında yapıldı. Çalışmada serum Protein Karbonil düzeyleri Sandwich Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle ölçüldü. Ölçümler için 96 numunelik ticari Protein Karbonil kiti kullanıldı (Human Protein Carbonyl(PC) ELISA Kit, Katalog CK-E11583, HANGZHOU EASTBIOPHARM CO.,LTD.)

Jelli biyokimya tüplerine alınan hasta ve sağlıklı bireylerin kanları +4°C’de 15 dakika bekletilip soğutmalı santrifüjde (+4°C) 3500 devirde 10 dakika çevrildi. Elde edilen serum örnekleri ependorf tüplere porsiyonlandı. Örnekler çalışma yapılincaya kadar -80°C derin dondurucuda saklandı. Protein Karbonil tayini yapılırken her bir hasta ve sağlıklı birey için birer ependorf serum örneği oda ısısında çözdürülerek ELISA yöntemi ile çalışıldı ve Protein Karbonil düzeyleri belirlendi.

Prosedür

1-Çalışmaya başlamadan önce – 80°C’de muhafaza edilen serum örnekleri ve PC kiti oda ısısına gelene kadar bekletildi.

2-Seri Dilüsyon: Bu adımda Human Protein Carbonyl Standrd solüsyonu dilüe edildi. Seri dilüsyon işlemi için 5 boş godenin içine 120’şer µl Standrd Dilüent konuldu. Sonrasında sadece ilk godeye 120 µl Human Protein Carbonyl Standart eklenerek karıştırıldı. Bu karışımdan 120 µl alınıp ikinci godeye eklendi ve karıştırıldı. İkinci godedeki karışımdan 120 µl alınarak 3.godeye eklendi ve karıştırıldı. Bu işlem 5. godeye kadar aynı şekilde devam ettirildi. Sonuç olarak 5. godede en seyrek Standart elde edildi ve seri dilüsyon tamamlandı.

3- Elde edilen Standart, 96 numunelik platenin ilk kuyucuğuna pipetlendi. Sonraki 5 kuyucuğa (2, 3, 4, 5 ve 6. kuyucuklar) 50 µl Human Protein Carbonyl Standrd solüsyonu pipetlendi.

4- Yedinci kuyucuktan itibaren bütün kuyucuklara sırayla kontrol ve hasta serum numunelerinden 40 µl pipetlendi.

5- Numunelerin ardından tekrar 7.kuyucuktan itibaren tüm kuyucuklara 10 µl Biotin-Ab PC Dilüent solüsyonu pipetlendi.

6- İkinci kuyucuktan itibaren (kalibratör ve numune kuyucukları) tüm kuyucuklara 50 µl Str-HRP Conjugate Reager solüsyonu pipetlendi.

7-Bu aşamaya gelen platenin üzeri kapatılarak 37°C de 1 saat çalkalamalı inkübasyon yapıldı.

8-İnkübasyonun ardından platenin her sefer 350 µl ile 6 defa cihaz tarafından yıkanması için gerekli olan 600 ml yıkama solüsyonu hazırlandı. Yıkama solüsyonu 20 ml esas yıkama solüsyonunun (Washing Solution) distle su ile 600ml ye tamamlanması ile hazırlandı.

9- Hazırlanan yıkama solüsyonu ve plate cihaza yerleştirilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi.

10- Sonrasında bütün kuyucuklara önce 50 µl Chromogen Solution A ardından tekrar tüm kuyucuklara 50 µl Chromogen Solution B pipetlendi.

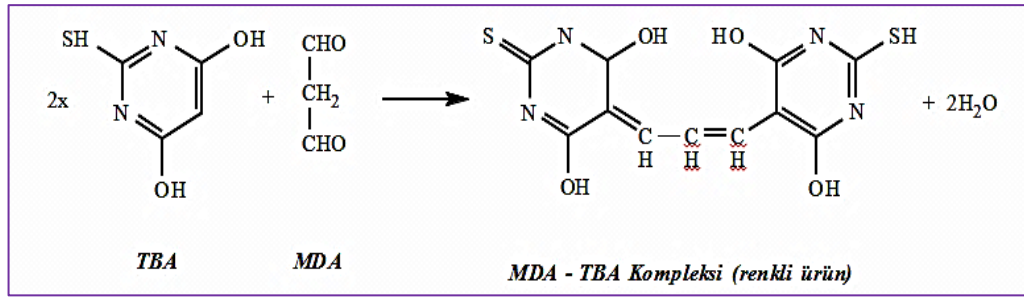
11- Plate üzeri kapatılarak 10 dk 37°C de çalkalamalı inkübasyon yapıldı.

12- İnkübasyonun ardından tüm kuyucuklara 50 µl Stop Solution pipetlendi. 450 nm de PC değerleri okundu.

3.4.4. Manüel Spektrofotometrik Yöntem ile MDA Tayini

Deney Prensipleri

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. (1995) yönteminde, TBA-MDA'nın oluşturduğu (Şekil 3.1) renkli kompleksin 532 nm'de verdiği absorbansıyla doğru orantılı olarak MDA'nın konsantrasyonu hesaplanmış olur.



Şekil 3.1. MDA'nın TBA ile reaksiyonu ve oluşan renkli TBA-MDA kompleksinin yapısı (Ulutaş 2013).

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.

Çizelge 3.1. MDA çalışma tablosu 1.

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.

Çizelge 3.2. MDA çalışma tablosu 2.

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.

3.4.5.ELISA Yöntemi İle MDA Tayini

MDA tayinleri Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarlarında yapıldı. Çalışmada serum MDA düzeyleri Sandwich Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle ölçüldü. Ölçümler için 96 numunelik ticari MDA kiti kullanıldı (Human Malondialdehyde(MDA) ELISA Kit, Katalog No: CK-E10376, HANGZHOU EASTBIOPHARM CO.,LTD.) Kullanılan kit prosedürüne göre gerekli inkübasyonlar yapılarak MDA düzeyleri belirlendi.

Jelli biyokimya tüplerine alınan hasta ve sağlık bireylerin kanları +4°C'de 15 dakikabekletilip soğutmalı santrifüjde (+4°C) 3500 devirde 10 dakika çevrildi. Elde edilen serum örnekleri ependorf tüplere porsiyonlandı. Örnekler çalışma yapılabileceği kadar -80°C derin dondurucuda saklandı. MDA tayini yapılırken her bir hasta ve sağlıklı birey için birer ependorf serum örneği oda ısısında çözündürülerek ELISA yöntemi ile çalışıldı ve MDA düzeyleri belirlendi.

Prosedür

1-Çalışmaya başlamadan önce – 80°C'de muhafaza edilen serum örnekleri ve MDA kiti oda ısısına gelene kadar bekletildi.

2-Seri Dilüsyon: Bu adımda Human MDA Standrd solüsyonu dilüe edildi. Seri dilüsyon işlemi için 5 boş godenin içine 120'şer µl Standrd Dilüent konuldu. Sonrasında sadece ilk godeye 120 µl Human MDA Standrd eklenerek karıştırıldı. Bu karışımdan 120 µl alınıp ikinci godeye eklendi ve karıştırıldı. İkinci godedeki karışımdan 120 µl alınarak 3.godeye eklendi ve karıştırıldı. Bu işlem 5. godeye kadar aynı şekilde devam ettirildi. Sonuç olarak 5. godede en seyrek Standart elde edildi ve seri dilüsyon tamamlandı.

3- Elde edilen Standart, 96 numunelik platenin ilk kuyucuğuna pipetlendi. Sonraki 5 kuyucuğa (2, 3, 4, 5 ve 6. kuyucuklar) 50 µl Human MDA Standrd solüsyonu pipetlendi.

4-Yedinci kuyucuktan itibaren bütün kuyucuklara sırayla kontrol ve hasta serum numunelerinden 40 µl pipetlendi.

5-Numunelerin ardından tekrar 7. Kuyucuktan itibaren tüm kuyucuklara 10 µl Biotin- MDA Ab Dilüent solüsyonu pipetlendi.

6- İkinci kuyucuktan itibaren (kalibratör ve numune kuyucukları) tüm kuyucuklara 50 µl Str-HRP Conjugate Reager solüsyonu pipetlendi.

7-Bu aşamaya gelen platenin üzeri kapatılarak 37°C de 1 saat çalkalamalı inkübasyon yapıldı.

8-İnkübasyonun ardından platenin her sefer 350 µl ile 6 defa cihaz tarafından yıkanması için gerekli olan 600 ml yıkama solüsyonu hazırlandı. Yıkama solüsyonu 20 ml esas yıkama solüsyonunun (Washing Solution) distle su ile 600 ml ye tamamlanması ile hazırlandı.

9-Hazırlanan yıkama solüsyonu ve plate cihaza yerleştirilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi.

10-Sonrasında bütün kuyucuklara önce 50 µl Chromogen Solution A ardından tekrar tüm kuyucuklara 50 µl Chromogen Solution B pipetlendi.

11-Plate üzeri kapatılarak 10 dk 37°C de çalkalamalı inkübasyon yapıldı.

12- İnkübasyonun ardından tüm kuyucuklara 50 µl Stop Solution pipetlendi. 450 nm de MDA değerleri okundu.

3.4.6.8-OHdG Ölçümü

8-OHdG tayinleri Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarlarında yapıldı. Çalışmada serum 8-OHdG düzeyleri Sandwich Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle ölçüldü. Ölçümler için 96 numunelik ticari 8-OHdG kiti kullanıldı (Human 8-Hydroxy-desoxyguanosine(8-OHDG) ELISA Kit, Katalog No: CK-E90285, HANGZHOU EASTBIOPHARM CO., LTD.) Kullanılan kit prosedürüne göre gerekli inkübasyonlar yapılarak 8-OHdG düzeyleri belirlendi.

Jelli biyokimya tüplerine alınan hasta ve sağlık bireylerin kanları +4°C'de 15 dakika bekletilip soğutmalı santrifüjde (+4°C) 3500 devirde 10 dakika çevrildi. Elde edilen serum örnekleri ependorf tüplere porsiyonlandı. Örnekler çalışma yapılançaya kadar -80°C derin dondurucuda saklandı. 8-OHdG tayini yapılırken her bir hasta ve sağlıklı birey için birer ependorf serum örneği oda ısısında çözdürülerek ELISA yöntemi ile çalışıldı ve 8-OHdG düzeyleri belirlendi.

Prosedür

1-Çalışmaya başlamadan önce – 80°C'de muhafaza edilen serum örnekleri ve 8-OHdG kiti oda ısısına gelene kadar bekletildi.

2-Seri Dilüsyon: Bu adımda Human 8-OHdG Standrd solüsyonu dilüe edildi. Seri dilüsyon işlemi için 5 boş godenin içine 120'şer µl Standrd Dilüent konuldu. Sonrasında sadece ilk godeye 120 µl Human 8-OHdG Standrd eklenerek karıştırıldı. Bu karışımdan 120 µl alınıp ikinci godeye eklendi ve karıştırıldı. İkinci godedeki karışımdan 120 µl alınarak 3.godeye eklendi ve karıştırıldı. Bu işlem 5. godeye kadar aynı şekilde devam ettirildi. Sonuç olarak 5. godede en seyrek Standart elde edildi ve seri dilüsyon tamamlandı.

3- Elde edilen Standart, 96 numunelik platenin ilk kuyucuğuna pipetlendi. Sonraki 5 kuyucuğa (2, 3, 4, 5 ve 6. kuyucuklar) 50 µl Human 8-OHdG Standrd solüsyonu pipetlendi.

4-Yedinci kuyucuktan itibaren bütün kuyucuklara sırayla kontrol ve hasta serum numunelerinden 40 µl pipetlendi.

5-Numunelerin ardından tekrar 7. Kuyucuktan itibaren tüm kuyucuklara 10 µl Biotin- Ab 8-OHdG Dilüent solüsyonu pipetlendi.

6- İkinci kuyucuktan itibaren (kalibratör ve numune kuyucukları) tüm kuyucuklara 50 µl Str-HRP Conjugate Reager solüsyonu pipetlendi.

7-Bu aşamaya gelen platenin üzeri kapatılarak 37°C de 1 saat çalkalamalı inkübasyon yapıldı.

8-İnkübasyonun ardından platenin her sefer 350 µl ile 6 defa cihaz tarafından yıkanması için gerekli olan 600 ml yıkama solüsyonu hazırlandı. Yıkama solüsyonu 20 ml esas yıkama solüsyonunun (Washing Solution) distle su ile 600 ml ye tamamlanması ile hazırlandı.

9-Hazırlanan yıkama solüsyonu ve plate cihaza yerleştirilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi.

10-Sonrasında bütün kuyucuklara önce 50 µl Chromogen Solution A ardından tekrar tüm kuyucuklara 50 µl Chromogen Solution B pipetlendi.

11-Plate üzeri kapatılarak 10 dk 37°C de çalkalamalı inkübasyon yapıldı.

12- İnkübasyonun ardından tüm kuyucuklara 50 µl Stop Solution pipetlendi. 450 nm de 8-OHdG değerleri okundu.

3.5. İstatistiksel analiz

Hasta ve kontrol ve grubuna ait verilerin değerlendirilmesinde MedCalc (Medical calculator 12.3.0.0) istatistik programı kullanıldı. Hasta ve kontrol grubuna ait verilerin normal dağılıma uyup uymadığı Kolmogorov-simirnov testi ile belirlendi. Normal dağılıma uyan hasta ve kontrol grubuna ait verilerin değerlendirilmesinde Bağımsız t-testi kullanıldı. Normal dağılıma uymayan hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılması için Bağımsız t-testinin karşılağı olan Mann Whitney U testi uygulandı. Gruplar arasındaki anlamlı farklılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi. Hasta ve kontrol grubuna ait verilerin grafiksel olarak gösterilmesinde Box-Whisker grafileleri kullanıldı.

4.BULGULAR

Orak Hücreli Anemi hastalarında oksidatif stresin değerlendirilmesini amaçlayan bu çalışmada, hasta grubu örnekleri Antakya Devlet Hastanesi Hematoloji Polikliniği'nde yapılan muayene ve tetkiklerle tanısı konulmuş olan 18 yaş altı Orak Hücre Anemisi hastalarından toplanmıştır. Kontrol grubu örnekleri ise herhangi bir hemoglobinopatisi veya sistematik rahatsızlığı bulunmadığı kesinleştirilmiş 18 yaş altı sağlıklı bireylerden toplanmıştır. Çalışma kanları jelli biyokimya tüplerine alınmıştır. +4°C'de 15 dakika bekletilip santrifüjde çevrildikten sonra ependorf tüplere porsiyonlanarak -80°C de derin dondurucuda saklandı.

OHA grubu, 18 yaş altı 23 erkek ve 22 bayan hastadan oluşmaktadır. Çalışmaya onsekiz yaş altı homozigot orak hücre hastalığı olan, diyabeti, hipertansiyonu, kalp, böbrek ve karaciğer yetmezliği olmayan, hastalar dahil edildi. Hastalar yaş, cinsiyet, boy, ağırlık ve ilaç kullanımı açısından ayrıntılı bir şekilde değerlendirildi. Çalışmaya dahil edilmeme kriterleri; orak hücre anemi hastalarının akut krizde olması (vazooklüziv kriz, aplastik kriz, sekestrasyon krizi gibi), son üç ay içerisinde transfüzyon almış olması, orak hücre anemisinin komplike olması, hipertansiyon, kalp, böbrek, karaciğer yetmezliğinin eşlik etmesi olarak belirlendi ve bu kriterlere sahip olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Kontrol grubu ise 18 yaş altı 16 erkek ve 22 bayandan oluşmaktadır.

Çalışmamızda cinsiyet, yaş, boy, kilo demografik özellik olarak değerlendirildi. Hastaların demografik özellikleri Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Kontrol ve Hasta grubunun demografik özellikleri

	KONTROL (Ort±SD)	HASTA (Ort±SD)	P
Yaş (yıl)	11,47±4,06	12,24±4,08	0,223
Boy (cm)	146±18,8	144±16,9	0,667
Kilo (kg)	41,7±16	35,2±13,1	0,054
BMI	18,2±3,8	17,3±6,9	0,49

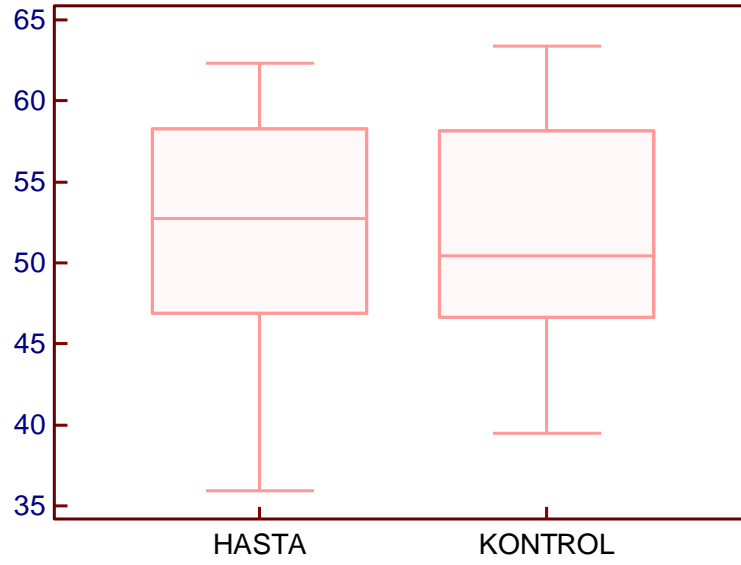
OHA ve kontrol grubuna ait MDA, protein karbonil ve 8-OHdG oksidatif stres parametrelerine ait ortalama, standart sapma ve istatistiksel analiz verileri Tablo 4.2’de verildi.

Çizelge 4.2. Hasta ve kontrol grubunun MDA, protein karbonil ve 8-OHdG oksidatif stres parametrelerine ait ortalama, standart sapma ve istatistiksel analiz verileri

GRUPLAR		N	Ort. ± S.S.	P Değeri
MDA (μmol/l)	<i>Hasta</i>	45	1,3205 ± 0,4398	< 0.0001
	<i>Kontrol</i>	38	0,8384 ± 0,1537	
MDA (nmol/gr protein)	<i>Hasta</i>	45	0,7927 ± 0,2676	< 0.0001
	<i>Kontrol</i>	38	0,5515 ± 0,1040	
MDA (nmol/ml)	<i>Hasta</i>	45	52,4963 ± 7,1502	=0,6181
	<i>Kontrol</i>	38	51,6300 ± 7,3283	
PROTEİN KARBONİL (nmol/mg protein)	<i>Hasta</i>	45	0,4047± 0,1270	< 0.0001
	<i>Kontrol</i>	38	0,3070 ± 0,1270	
PROTEİN KARBONİL (ng/ml)	<i>Hasta</i>	45	114,5617 ± 110,6427	=0,8439
	<i>Kontrol</i>	38	130,6203 ± 119,8809	
8-OHdG (ng/ml)	<i>Hasta</i>	45	12,1483 ± 16,2811	=0,0243
	<i>Kontrol</i>	38	6,4132 ± 6,4830	

4.1. ELISA Yöntemi ile MDA Tayini İstatistik Verileri

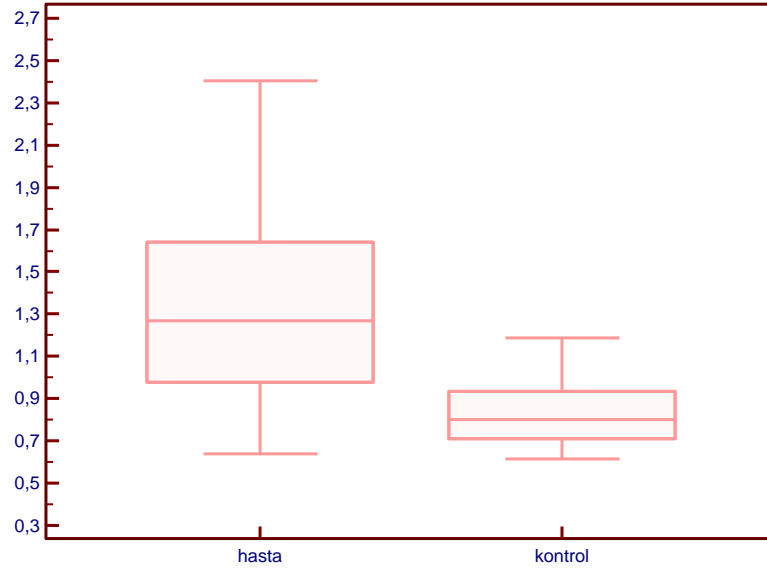
MDA düzeyleri, ELISA yöntemi ile çalışıldığında Orak hücre anemili hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,6181$). MDA seviyelerine ait gruplara göre veri dağılım grafiği Şekil 4.1'de verilmiştir.



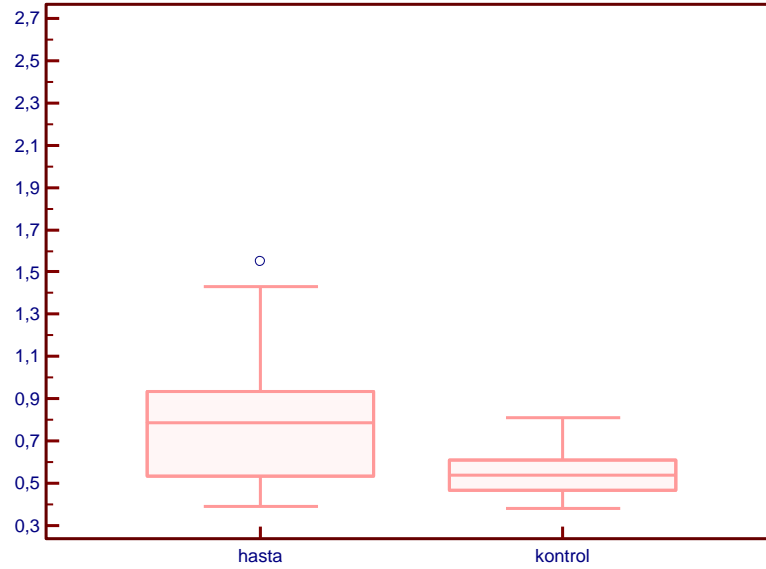
Şekil 4.1. MDA seviyelerinin OHA ve kontrol gruplarına göre dağılımı ($p=0,6181$)
MDA (nmol/ml)

4.2. Manüel Spektrofotometrik Yöntem ile MDA Tayini İstatistik Verileri

MDA düzeyleri, manuel spektrofotometrik olarak çalışıldığında ise Orak hücreli anemili hastalarda anlamlı olarak yüksek tespit edildi ($p<0,0001$).



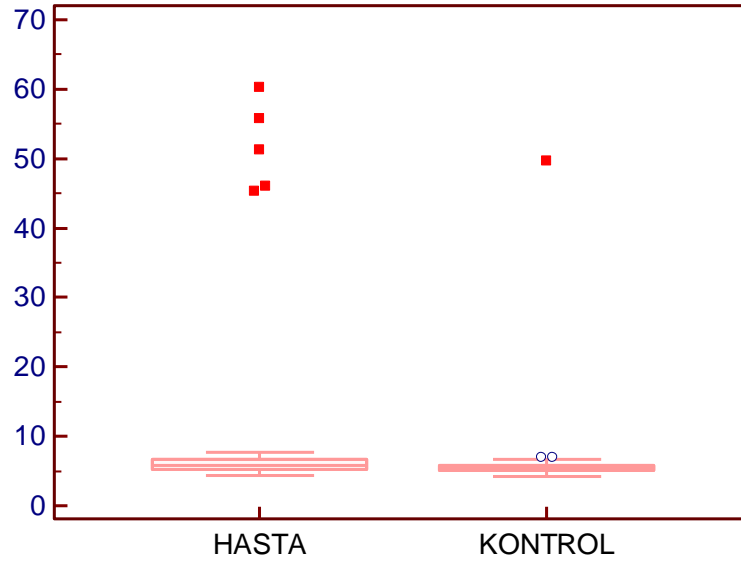
Şekil 4.2. MDA seviyelerinin OHA ve kontrol gruplarına göre dağılımı ($p<0,0001$) MDA ($\mu\text{mol/lt}$)



Şekil 4.3 MDA seviyelerinin OHA ve kontrol gruplarına göre dağılımı ($p<0,0001$) MDA (nmol/gr protein)

4.3. 8-OHdG Ölçümü İstatistik Verileri

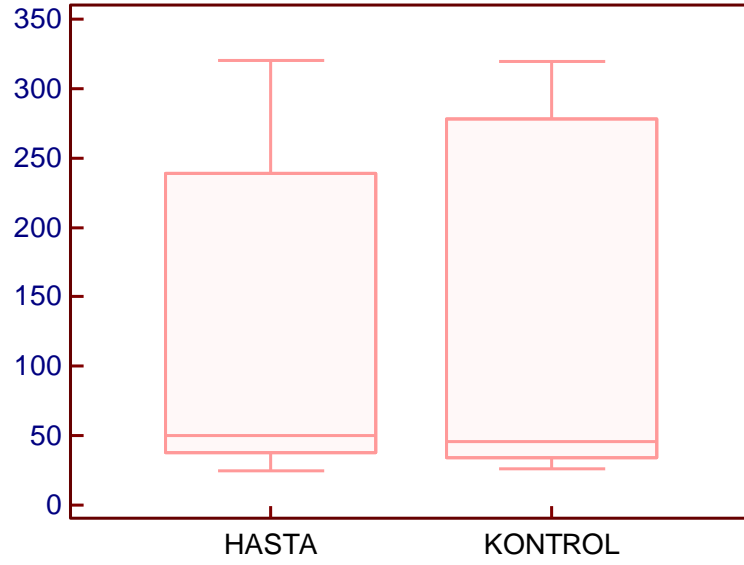
ELISA yöntemi ile çalışılan 8-OHdG düzeylerine, istatistiksel olarak Mann-Whitney Testi uygulandığında Orak hücre anemili hastalarda anlamlı olarak yüksek tespit edildi ($p=0,0243$). 8-OHdG seviyelerine ait gruplara göre veri dağılım grafiği Şekil 4.4’de verilmiştir.



Şekil 4.4. 8-OHdG seviyelerinin OHA ve kontrol gruplarına göre dağılımı ($p=0,0243$)
8-OHdG (ng/ml)

4.4. ELISA Yöntemi ile Protein Karbonil Tayini İstatistik Verileri

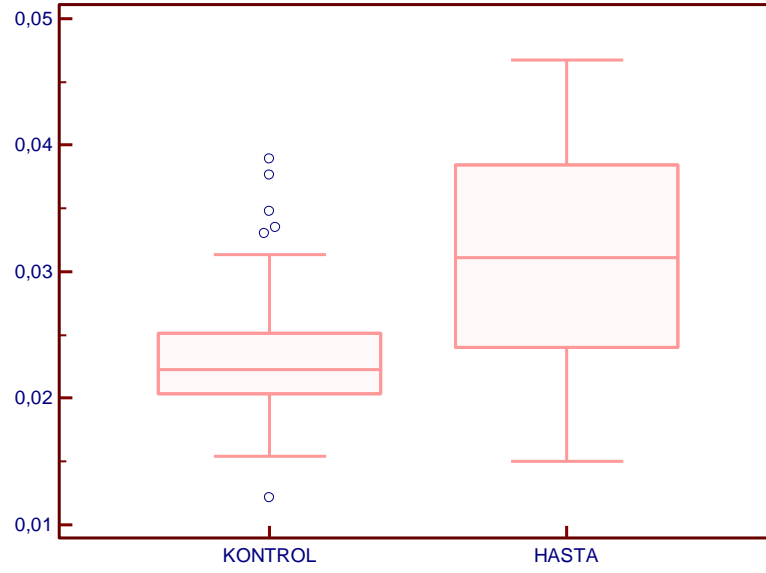
Protein karbonil düzeyleri, ELISA yöntemi ile çalışıldığında Orak hücre anemili hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,8439$). Protein karbonil seviyelerine ait gruplara göre veri dağılım grafiği Şekil 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.5. Protein karbonil seviyelerinin OHA ve kontrol gruplarına göre dağılımı ($p=0,8439$)
Protein karbonil (ng/ml)

4.5. Manuel Spektrofotometrik Yöntem ile Protein Karbonil Tayini İstatistik Verileri

Protein karbonil düzeyleri, manuel spektrofotometrik olarak çalışıldığında ise Orak hücreli anemili hastalarda anlamlı olarak yüksek tespit edildi ($p < 0,0001$).



Şekil 4.6. Protein karbonil seviyelerinin OHA ve kontrol gruplarına göre dağılımı ($p < 0,0001$)

Protein karbonil (nmol/mg protein)

5.TARTIŞMA

Orak hücre anemisi (OHA), fizyolojik pH'da negatif yüklü glutamik asidin yerine, fizyolojik pH'da nötr bir amino asit olan valinin geçişiyle hemoglobinde meydana gelen üç boyutlu nihai bozuk yapının eritrositlerin normal işlevini, hemoglobinin oksijen taşınımının özellikle deoksi formda bozulması ile karakterize olan konjenital bir hemoglobinopatidir. OHA, vaskülopati zemininde özellikle deoksi Hb'nin birbiri ile yapışarak meydana getirdiği fibriler ağ ile kapiller damarlarda vazookluziv krizler oluşturmaktadır. Ayrıca bir çok çalışmada OHA' li hastalarda okluziv olaylar sonrası gelişen reperfüzyon hasarı, kronik inflamasyon ve oksidatif stresin arttığı biyobelirteçler ve artan oksidatif stresin devamlı endotel aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Aslan ve Canatan 2008; Aslan ve Freeman 2007; Ozmen ve ark. 1999; Vladimirov 1987; Meng 1991). OHA'da artmış oksidatif strese bağlı makromoleküllerde (DNA, protein, lipid) meydana gelen hasarlar ayrı ayrı bir çok çalışmada gösterilmiştir (Aslan ve ark. 2007; Küpesiz ve ark. 2012; Rocha LB ve ark. 2012). Ancak OHA'li hastalarda oksidatif stres parametrelerinin makromoleküllerimiz protein, lipit ve DNA'da birarada çalışıldığı tek bir çalışma literatürde mevcut değildir. Çalışmamızda OHA hastaları ve sağlıklı bireyler serum protein oksidasyon göstergesi protein karbonil (PC), lipid hasarı göstergesi malondialdehit (MDA) ve DNA hasar göstergesi 8-hidroksi-deoksiguanozin (8-OHdG) düzeyleri açısından kıyaslanmıştır.

Çalışmamıza OHA hasta grubuna 45 HbSS hastası, kontrol grubuna 38 sağlıklı gönüllü dahil edildi. OHA hasta grubunun yaş ortalaması 12,24 yıl, kontrol grubunun yaş ortalaması 11,47 yıl olarak bulunmuştur. OHA hasta ve kontrol grubu yaş ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p:0,223). OHA hasta grubu; yaş ortalaması 11 yıl olan 23 erkek hasta ve yaş ortalaması 13,4 yıl olan 22 kadın hastadan oluşturulmuştur. Kontrol grubu ise yaş ortalaması 10,7 yıl olan sağlıklı erkek ve yaş ortalaması 12 yıl olan sağlıklı kadın gönüllülerden oluşturulmuştur. Kontrol grubu da cinsiyet ve yaş kriterleri bakımından hasta grubu

ile uyumlu gönüllülerden oluşturulmuştur. Hasta ve kontrol grubunun boy, kilo ve BMI ortalaması arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Sağlıklı bireylerin eritrositlerindeki antioksidan koruma sistemleri, meydana gelebilecek bazal ROS değişimlerinden olumsuz yönde etkilenmemektedir (Wood ve Granger 2007). Normal bir eritrositin antioksidan koruma sistemi olan endojen antioksidanlar (SOD, Gpx, CAT gibi enzimler) reaktif oksijen radikallerine karşı bir savunma yapmaktadır. Ancak, OHA hastalarında görülen aşırı ROS üretimi (Aslan ve ark. 2001; Aslan ve Freeman 2002), HbS'in oto-oksidasyonu (Hebbel ve ark.1982), hem demirinin salınması (Landburg ve ark.2010), artmış asimetrik dimetilargininin (Xia ve ark.2006; Xia ve ark. 1996), ve azalmış NO seviyeleri sebebiyle bu durum değişmektedir (Morris ve ark. 2005). Artan aşırı ROS sebebiyle oksidan-antioksidan dengesi bozulmakta, eşleşmemiş elektron sahibi bu yapılar hücrelerin normal bileşeni olan DNA, protein ve lipit gibi makromoleküllere saldırmakta; böylece hücrede yapısal modifikasyona sebep olarak hücrenin normal fonksiyonunu yerine getirmesine engel olmaktadır. 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 (Amer ve ark. 2006; Schacter ve ark. 1988).

Hebbel ve arkadaşları (1988;1982), yaptıkları iki çalışmada OHA'lı hastalarda oksijen varlığında Hemoglobin S'in normal Hemoglobine (HbA) kıyasla artmış oto-oksidasyon hızına sahip olduğunu ve OHA hastalarının eritrositlerinde süperoksit ve hidroksil radikallerini yüksek tespit ettiler. Repka ve Hebbel (1988; 1991), Orak hücre hemoglobininin (HbS) eritrosit membranına tutunduğu ve bir Fenton reaktifi gibi davranarak süperoksit ve hidroksil radikali gibi oksidant ajanların üretimini arttırdığını tespit etti. Bunun yanı sıra Hemoglobin S'in aşırı oto-oksidasyonu ve denatürasyonu sonucu hücre membranında demir kompleksleri birikiminin meydana geldiği gösterildi (Rother ve ark. 2005).

Artmış radikaller sonucu oluşan Lipit peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) reaktif oksijen türleri tarafından peroksitler, alkoller, malondialdehit, etan ve pentan gibi ürünlere yıkılma tepkimelerine denilmektedir. Yağ asitlerinin peroksidasyonu sonrasında açığa çıkan ürünler zar geçirgenliğini ve akışkanlığını ciddi şekilde etkileyip hücre ve organel içeriklerinin ayrılmasına neden

olan kopma ve kırılmalara yol açar. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen zar hasarı geri dönüşümsüzdür (Kurutaş ve ark. 2004; Gutteridge 1995). Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü MDA'dır. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği sebebiyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (Niki 1987; Placer ve ark. 1990; Porter 1984). Aslan ve arkadaşları (2007; 2003; 2000; 2004), OHA'lı hastaların eritrositlerinde artmış lipit peroksidasyonunu gösterdi. Amer ve arkadaşları (2005; 2003) tarafından yapılan benzer iki çalışmada da oksidatif hasarın göstergelerinden olan MDA seviyeleri, OHA'lı hastaların eritrositlerinde kontrol grubuna göre yüksek tespit edildi. Walter ve arkadaşları (2006), OHA ve talasemi hastalarında yaptığı araştırmalarda demir komplekslerinin inflamasyonda artışa ve lipidleri içeren membranda oksidatif hasara sebebiyet verdiğini gösterdi. Yine OHA'da yapılan çalışmalarda, lipit peroksidasyonunun ve oksidatif stresin göstergesi olan MDA seviyeleri, sağlıklı bireylere göre serum ve eritrositlerinde yüksek tespit edildi (Jain ve ark. 1990; Oztas ve ark. 2011). Ayrıca, Jain ve arkadaşlarının yaptığı çalışma (1984), MDA'nın eritrosit membranında kümelenmesi sonucu membrandaki fosfolipidlerin organizasyonunu bozduğunu ve oksidatif hasarın şiddetini arttırdığını gösterdi. Çalışmamızda, manuel spektrofotometrik yöntemle ölçülen MDA seviyelerinin hasta grupta anlamlı olarak yüksek çıkması OHA'da oksidatif stresin meydana getirdiği peroksidasyon hasarının açık bir göstergesi olup literatür ile uyumludur. Ancak ELISA yöntemi ile çalışılan MDA seviyeleri hasta grupta daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Protein oksidasyonu, hipoklorik asit, hidroperoksit, peroksinitrit, hidroksi ve peroksi gibi serbest oksijen radikalleri türevleri varlığında, direkt ve indirekt birçok yolla gerçekleşebilir (Castegna ve ark. 2002; Castegna ve ark.2002). Protein oksidasyon ürünleri arasında, protein karbonil bileşikleri (PCC); 3-nitrotirozin (3-NT), klorotirozin gibi yan zincir oksidasyon ürünleri; ditirozin ve protein ileri oksidasyon ürünleri (advanced oxidation protein products; AOPP) gibi çapraz

bağlanma ürünleri sayılabilir. Bunların içerisinde, PCC ve AOPP, daha büyük protein fraksiyonlarını etkileyen global modifikasyon örnekleridir (Castegna ve ark. 2002; Stadtman 1998). PC türevlerinin oluşumuna yol açan primer modifikasyon reaksiyonları amino asitlerin α - karbon atomlarının veya R yan zincirlerinin oksidatif modifikasyonlarından ve bu modifikasyonları takiben meydana gelen reaktif oksijen aracılı peptit ayrılması reaksiyonundan oluşmaktadır. Reaktif oksijen türevlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda, histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda amino asit oksidasyonu sonucu PC ürünleri meydana gelir. PC düzeylerinin saptanması protein oksidasyonunu belirlemede duyarlı ve genel olarak kabul görmüş bir yöntemdir (Stadtman ve Levine 2003; Dalle-Donne ve ark. 2003). Küpesiz ve ark. (2012) OHA'lı hastalarda hemolizin plazma oksidasyonu ve nitrasyonu üzerine olan etkisini belirlemek amacıyla yapmış oldukları çalışmada, PC seviyelerinin dikkate değer şekilde orak hücreli hastalarda kontrol grubuna göre yüksek olduğunu tespit ettiler. Öztaş ve ark. (2012) yapmış oldukları çalışmada PC seviyesinin plazma demir ve hemolizat çinko ile ilişkili olduğunu ve hasta grupta kontrol grubuna göre daha yüksek seviyede olduğunu tespit ettiler. Benzer çalışmalarda (Alsultan ve ark. 2010 ; Martins ve ark. 2009) PC seviyeleri hasta grupta kontrol grubuna göre yüksek tespit edildi. Çalışmamızda hasta grupta manuel spektrofotometrik yöntem ile ölçülen PC seviyesinin kontrol gruba göre anlamlı olarak yüksek çıkması OHA'da oksidatif stresin meydana getirdiği protein hasarının göstergesi olup literatür ile uyumludur. Ancak ELISA yöntemi ile ölçülen PC düzeylerinde hasta ve kontrol grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

DNA molekülü serbest radikaller için önemli bir hedeftir ve kolaylıkla hasara uğratılır (Hagen 1986; Sonntag ve ark. 2004). İyonize edici radyasyona maruz kalınması ile oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona neden olurlar. Sitotoksik etki, büyük oranda nükleik asit baz modifikasyonlarından kaynaklanan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer değişikliklere bağlıdır. Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer. Hidrojen peroksit zarlardan kolayca geçip hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücrede fonksiyon bozukluğuna ve hatta hücre ölümüne neden olabilir (Meram ve Aktaran 2002; Özkan ve Fışkın 2004). DNA bünyesinde Cu+2 iyonları en çok G-C'ce zengin bölgelerde bulunduğu için, en fazla oksidatif hasara maruz kalan baz

guanindir. Bu iyonların polianyonik karakterde olan DNA'nın özellikle guanin bazlarına yüksek afinite ile bağlandığını ve H₂O₂ ile etkileşime girerek DNA hasarını başlattığını gösterilmiştir. Bu nedenle en yaygın olarak ölçümlenen baz hasarı 8-OHdG'dir (Helbock ve ark. 1999). Hidroksiüre ile tedavi edilen OHA hastalarında periferal kandaki lökositlerde DNA hasarının araştırılması amacıyla Alkalın Comet Testi kullanılarak yapılan çalışmada; hasta grupta kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek oranda DNA hasarı tespit edilmiştir (Rocha LB ve ark. 2012). Yine hidrosikarbamid tedavisi alan ve almayan OHA'lı çocukların kromozom stabilite kesit analizlerinin kıyaslandığı bir başka çalışmada, hidrosikarbamid alan grupta kromozom hasarının daha az olduğu tespit edilmiştir (McGann ve ark. 2011). Çalışmamızda ELISA metodu ile çalışılan serum 8-OHdG seviyesinin Orak hücre anemisi hastalarında kontrol gruba göre anlamlı olarak yüksek tespit edilmesi, 8-OHdG'nin OHA'da oksidatif stresin meydana getirdiği DNA hasarının değerlendirilmesinde önemli bir parametre olduğunu göstermektedir.

ELISA yöntemi antijen-antikor prensibi ile çalışan bir yöntem olduğundan spektrofotometrik metoda göre daha duyarlı bir yöntem olması beklenmesine rağmen, parametrelerimiz içinde 8-OHdG dışında hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bununla beraber 8-OHdG sonuçlarında, özellikle OHA grubunda daha fazla olmak üzere, her iki grupta uç değerler tespit ettik. Bu durumun grupların karşılaştırılmasında anlamlılık düzeyini etkilediğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda ELISA yöntemi, çalıştığımız parametreler arasından PC ve MDA için gruplar arasındaki anlamlı farklılığın belirlenmesi açısından yeterince duyarlı olmamış olup; literatürde ELISA yöntemi ile çalışılmış mevcut parametrelerin bulunmaması bu yöntemin gruplar arasındaki anlamlı farklılığı belirleme açısından yeterince duyarlı olmadığından kaynaklanıyor olabilir. Dolayısı ile gruplar arasındaki anlamlılığı belirleme açısından mg protein başına verilen manuel spektrofotometrik yönteminin daha duyarlı olduğunu düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, Orak hücre anemili hastalarda oksidatif stresi değerlendirmek amacıyla yapmış olduğumuz çalışmamızda, DNA oksidatif hasar göstergesi olan 8-OHdG ELISA yöntemiyle, lipid oksidatif hasar göstergesi MDA hem ELISA hem manuel spektrofotometrik yöntemle ve protein oksidatif hasar göstergesi olan PC düzeyleride hem ELISA hem manuel spektrofotometrik yöntemle OHA ve kontrol

grubunda çalışılmış olup birbiriyle kıyaslaması yapılmıştır. Parametreler ELISA yöntemiyle çalışıldığında 8-OHdG dışında hasta ve kontrol grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Manuel spektrofotometrik yöntem ile çalışılan MDA ve PC düzeyleri ise hasta grupta kontrol grubuna göre daha yüksek tespit edilmiş olup istatistiksel olarak iki grup arasında anlamlı fark bulunmuştur.

6.SONUÇ

Şu ana kadar olan bilgilerimize göre PC, MDA ve 8-OHdG parametreleri literatürde OHA'da ELISA yöntemi ile çalışılmamış olup, çalışmamızda bu parametrelerden MDA ve PC'in daha önce literatürde gösterilmiş manuel spektrofotometrik yöntemle ilaveten ELISA yöntemi ile de çalışılarak protein, lipit ve DNA hasarının mevcut çalışmamızda birarada değerlendirilmesi yapılmıştır.

Çalışmamızda ELISA yöntemi ile çalışılan MDA ve PC düzeylerinde hasta ve kontrol grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir. Hasta grupta manuel spektrofotometrik yöntem ile ölçülen PC ve MDA seviyelerinin kontrol gruba göre anlamlı olarak yüksek çıkması, OHA'da oksidatif stresin meydana getirdiği protein ve lipit hasarının değerlendirilmesi açısından önemlidir.

Çalışmamızda, OHA'da daha önce bakılmamış bir parametre olan 8-OHdG düzeylerinin hasta grupta daha yüksek çıkması, OHA'lı hastaların DNA'larındaki oksidatif hasarın değerlendirilmesine ışık tutmaktadır.

DNA'nın yapısındaki guaninin oksidatif modifikasyonu sonucu oluşan 8-OHdG ile ilgili daha fazla çalışma yapılmasının, DNA'daki oksidatif hasarın değerlendirilmesi açısından faydalı olacağını düşünmekteyiz.

7.KAYNAKLAR

1. **Abuja PM, Albertini R.** Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*, **2001**, s. 306:1-17
2. **Afanas'ev IB, Suslova TB, Cheremisina ZP, Abramova NE, Korkina LG.** Study of antioxidant properties of metal aspartates. *Analyst*. **1995**, 120(3):859-62. Epub 1995/03/01.
3. **Akar E, Akar N.** A review of abnormal hemoglobins in Turkey. *Turk J Hematol*, **2007**, 24:143-145
4. **Akkuş İ.** Serbest Oksijen Radikalleri ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Basım Yayın ve Dağıtım, Konya:1995, 1-15
5. **Aksoy M.** Türkiye'de Talaseminin tarihçesine kısa bir bakış. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, **1991**, 34:1-8.
6. **Aksoy M, Lekin EW, Maurant AE and Lehman H.** Blood groups, hemoglobins and thalassemia in Southern Turkey and Eti Turks. *Brit Med J*, **1958**, s. 2: 937.
7. **Alsultan AI, Seif MA, Amin TT, Nabolli M, Alsuliman AM.** Relationship between oxidative stress, ferritin and insulin resistance in sickle cell disease. **2010**, Jun;14(6):527-38.
8. **Altay Ç.** Abnormal hemoglobins in Turkey. *Turkish J Hematol*, **2002**, 19(1): 63-74.
9. **Altuntaş İ.** Otoimmün Tiroit Hastalığının Tanı ve Takibinde Oksidatif DNA Hasar Belirleyicisi 8-OHdG'nin Önemi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2007**.
10. **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. Epub 2005/04/22.
11. **Amer J, Ghoti H, Rachmilewitz E, Koren A, Levin C ve ark.** 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. Epub 2005/12/24.
12. **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. Epub 2003/02/13.
13. **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. Epub 2005/08/17.
14. **Antmen Ş.** Beta Talasemide Oksidatif Stres. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2005**.
15. **Arıyürek S.** Konya Bölgesinin Anormal Hemoglobin ve Talasemi Mutasyon Tiplerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2009**.
16. **Arpacı A, Aksoy K, Dikmen N.** Çukurova'da orak hücre anemisi ve talasemi taraması. XXII. Ulusal Hematoloji Kongresi, İstanbul, **1991**, s.115.
17. **Ashley-Koch AE, Elliott L, Kail ME, De Castro LM, Jonassaint J ve ark.** Identification of genetic polymorphisms associated with risk for pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood*. **2008**, 111(12):5721-6. Epub 2008/01/12.
18. **Aslan M, Canatan D.** Modulation of redox pathways in neutrophils from sickle cell disease patients. *Exp Hematol*. **2008**, 36(11):1535-44. Epub 2008/09/24.
19. **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. Epub 2004/03/26.
20. **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. Epub 2002/10/31.

21. **Aslan M, Freeman BA.** Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. *Free Radic Biol Med.* **2007**, 43(11):1469-83. Epub 2007/10/30.
22. **Aslan M, Ryan TM, Adler B, Townes TM, Parks DA ve ark.** 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. Epub 2001/12/26.
23. **Aslan M, Ryan TM, Townes TM, Coward L, Kirk MC ve ark.** 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. Epub 2002/10/29.
24. **Aslan M, Thornley-Brown D, Freeman BA.** Reactive species in sickle cell disease. *Ann N Y Acad Sci.* **2000**, 899:375-91. Epub 2000/06/23.
25. **Aslan R, Şekeroğlu MR, Bayiroğlu F.** Serbest Radikal Türlerin Membran Lipid Peroksidasyonuna Etkileri ve Antioksidan Savunma, *Y.Y.Ü Sağlık Bil. Derg.* **1995**, 2(1); 137-142
26. **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. Epub 1994/10/01.
27. **Augustin AJ, Spitznas M, Sekundo W, Koch F, Lutz J ve ark.** 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. Epub 1996/05/01.
28. **Ballas SK.** Sickle Cell Anaemia, *Progress in Pathogenesis and Treatment. Drugs,* **2002**, 62(8): 1143-1172.
29. **Baykal Y, Gök F, Erikçi S.** Demir, serbest radikaller ve oksidatif hasar. *Sendrom* **2002**, 14(1):94-100.
30. **Becker MA, Roessler BJ.** Hyperuricemia and Gout. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, New York: 7th Ed. McGraw- Hill, **1995**, 1655-1677.
31. **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. Epub 2000/09/26.
32. **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. Epub 2005/10/21.
33. **Blazovics A.** [From free radicals to science of nutrition]. *Orv Hetil.* **2009**, 150(2):53-63. Epub 2008/12/24. A szabad gyokoktól a taplalkozas tudomanyaiig.
34. **Blokhina O, Fagerstedt KV.** Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. *Plant Physiol Biochem.* **2010**, 48(5):359-73. Epub 2010/03/23.
35. **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. Epub 1997/08/01.
36. **Borgna-Pignatti C, Galanello R.** Thalassemias and Related Disorders: Quantitative Disorders of Hemoglobin Synthesis. In: Greer JP, Foerster J, Lukens JN Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B. (eds). *Wintrobe's Clinical Hematology*, eleventh ed, Vol 1, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, **2004**, 1319-1365.
37. **Bowler RP, Crapo JD.** Oxidative Stress in Allergic Respiratory Diseases. *J. Allergy Clin Immunol.* **2002**, 110(3):349-356.
38. **Breen AP, Murphy JA.** Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med.* **1995**, 18(6):1033-77. Epub 1995/06/01.
39. **Brozovic M, Henthorn J.** Investigation of Abnormal Haemoglobins and Thalassemia in Practical Haematology (Eds Dacie JV, Lewis SM). Churchill Livingstone, Hong Kong, **1995**, 249-256.
40. **Bunn HF, Forget BG.** Hemoglobin In; Molecular, Genetic and Clinical Aspects. WB Saunders Com, Philadelphia. **1986**.
41. **Burtis CA, Ashwood ER.** Vitaminler. Aslan D. Eds. *Klinik Kimyada Temel İlkeler.* Ankara: Palme Yayınları, **2005**, 548-550, 332-333, 578-601.
42. **Buyukhatipoglu H, Sezen Y, Yildiz A, Guntekin U, Bas M ve ark.** Effects of statin use on total oxidant and antioxidant capacity and ceruloplasmin activity. *Clin Invest Med.* **2010**, 33(5):E313-20. Epub 2010/10/12.

43. **Byung PY.** Cellular Defenses Against Damage from Reactive Species. *Physiological Review*,. **1994**, 74(1): 139-172
44. **Canatan D.** Orak Hücre Anemisi. XXX. Ulusal Hematoloji Kongresi, 7. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu. İstanbul-Türkiye, **2003**, 93-99.
45. **Cao A, Saba L, Galanello R, Rosatelli MC.** Molecular diagnosis and carrier screening for thalassemia. *JAMA*, **1997**, 278(15): 1273-1277.
46. **Castegna A, Aksenov M, Aksenova M, Thongboonkerd V, Klein JB ve ark. (2002)** Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I. Creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Radic Biol Med* 33, 562-571.
47. **Castegna A, Aksenov M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM ve ark. (2002)** Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II. Dihydropyrimidinase- related protein 2, alpha-enolase and heat shock cognate 71. *J Neurochem* 82, 1524-1532.
48. **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. Epub 2008/11/04.
49. **Cavalli SL, Menozzi P, Piazza A.** The History and Geography of Human Genes. Princeton, University Pres. **1996**.
50. **Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR.** *Lippincott Biyokimya*. 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul, 2007, s. 25-41
51. **Clarke GM, Higgins TN.** Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: *Clin Chem* **2000**, 46(8B): 1284-1290.
52. **Clarkson PM, Thompson HS.** Antioxidants: What role do they play in physical activity and health?. *Am J Clin Nutr*, **2000**, 72:637-46
53. **Cnubben NHP, Rietjens IMCM, Wortelboer H, Zanden J, Bladeren PJ.** The interplay of glutathione related processes in antioxidant defense. *Envorimental Toxicology and Pharmacology*. **2001**, 10:141-152.
54. **Csiszar J, Szabo M, Erdei L, Marton L, Horvath F ve ark.** 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. Epub 2004/07/23.
55. **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. Epub 2010/04/15.
56. **Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. (2003)** Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329, 23-38.
57. **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. Epub 1992/01/01.
58. **da Silva Rocha LB, Dias Elias DB, Barbosa MC, Bandeira IC, Gonçalves RP.** DNA damage in leukocytes of sickle cell anemia patients is associated with hydroxyurea therapy and with HBB*S haplotype. **2012** Dec 12;749(1-2):48-52.
59. **Dean RT.** Free radicals, membrane damage and cell-mediated cytolysis. *Br J Cancer Suppl*. **1987**, 8:39-45. Epub 1987/06/01.
60. **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. Epub 1992/11/01.
61. **Diggs LW, Ahmann CF, Bibb J.** The incidence and significance of sickle cell trait. *Annals of internal medicine* **1933**, 7: 769- 78.
62. **Domenech RJ, Macho P.** [Endothelium and coronary circulation]. *Rev Med Chil*. **1991**, 119(2):189-96. Epub 1991/02/01. El endotelio y la circulacion coronaria.
63. **Dormandy TL.** An approach to free radicals. *Lancet*, **1983**, 322:1010-1013.
64. **Dover G, Platt O.** Sickle cell disease. In: Nathan D, Orkin SH, Ginsburg D, Look AT (eds). *Hematology of Infancy and Childhood*. (sixth edition). *WB Saunders Company, Philadelphia*, **2003**, 790- 841.

65. **Dranka BP, Benavides GA, Diers AR, Giordano S, Zelickson BR ve ark.** Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free Radic Biol Med.* **2011**, 51(9):1621-35. Epub 2011/08/30.
66. **Edelstein SJ.** Structure of the fibers of hemoglobin S. *Tex Rep Biol Med.* **1980**,40:221-32. Epub 1980/01/01.
67. **Embury SH.** Sick cell anemia and associated hemoglobinopathies. In: Goldman L, Bennett JC, Eds. *Cecil Textbook of Medicine.* 21st Edition, Philadelphia, WB Saunders Company, **2000**, s. 893-905.
68. **Emmel VE.** A study of the erythrocytes in a case of severe anemia with elongated and sickle shaped red blood corpuscles. *Archives of Internal Medicine* **1917**, 20: 586- 98.
69. **Ernster L, Dallner G.** Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim. Biophys. Acta*,**1995**, 1271:195–204;
70. **Freeman BA, Crapo JD.** Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* **1982**, 47: 412-426.
71. **Frei B, Stocker R, England L, Ames BN.** Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Av Exp Med Biol.* **1990**, 264:155-163.
72. **Fridovich I.** Oxidative Stres. *Encyclopedia of Life Sciences.* Nature Publishing Group, **2001**.
73. **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. Epub 1996/01/01.
74. **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. Epub 1992/06/01.
75. **Fuji T. (1991).** Site specific mechanisms of initiation by chelated iron and inhibition by alphotocopherol of lipid peroxide dependent lipid peroxidation in charged micelles. *Arch. Biochem. Biophys.* 28(1):120-126.
76. **Fukai T, Ushio-Fukai M.** Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal.* **2011**, 15(6):1583-606. Epub 2011/04/09.
77. **Gallego MJ, Garcia Villalon AL, Lopez Farre AJ, Garcia JL, Garron MP ve ark.** Mechanisms of the endothelial toxicity of cyclosporin A. Role of nitric oxide, cGMP, and Ca²⁺. *Circ Res.* **1994**, 74(3):477-84. Epub 1994/03/01.
78. **Ganong WF.** *Review Of Medical Physiology.* 12th ed. California: Lange Medical Publications, **1985**, 431.
79. **Gilbert DL, Colton CA.** *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach.* KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, **2002**.
80. **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. Epub 2011/08/26.
81. **Gutteridge JMC.** Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *ClinChemistry* **1995**, 41:1819-1828
82. **Gümrük F, Altay Ç.** Orak hücre anemisi. *Katkı*, **1995**, s. 16: 327- 345.
83. **Gümrük F.** Hemoglobin ve Hemoglobinopatiler. Eds; İliçin G, Ünal S, Biberoglu K, Akalın HE, Süleymanlar G, In. *Temel iç Hastalıkları*, 1.Baskı, Ankara, Günes Kitabevi Ltd, **1996**, 1233-1243.
84. **Haan JB, Bladier C, Griffith P, Keiner M, O'shea RD ve ark.** Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *Issue of August.* **1998**, 273(35):22528-22536.
85. **Habdous M, Herbeth B, Vincent-Viry M, Lamont JV, Fitzgerald PS ve ark.** 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. Epub 2003/04/02.
86. **Hagen U.** Current aspects on the radiation induced base damage in DNA. *Radiat Environ Biophys.* **1986**, 25(4):261-71. Epub 1986/01/01.
87. **Hahn EV, Gillepsie EB.** Sick cell anemia. Report of a case greatly improved by splenectomy. Experimental study of sickle cell formation. *Archives of Internal Medicine*, **1927**, s. 39: 233- 54.
88. **Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C, Chapelle JP.** [Oxidative stress]. *Rev Med Liege.* **2007**, 62(10):628-38. Epub 2007/12/12. Le stress oxydant.

89. **Halliwell B.** Antioxidants and Human Disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet*, **1994**, 344:721-724.
90. **Halliwell B.** Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev.* **1994**, 52(8 Pt 1):253-65. Epub
91. **Halliwell B, Gutteridge JMC. (1985).** The importance of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Mol. Aspects. Med.* 8:89-193.
92. **Halliwell B, Gutteridge JM.** *Free radicals in biology and medicine.* 2th Ed. Oxford: Clarendon Pres, **1989**, 125
93. **Halliwell B, Gutteridge JM.** Role of iron in oxygen radical reactions. *Methods Enzymol.* **1984**, 105:47-56. Epub 1984/01/01.
94. **Halliwell B.** Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.* **1987**, 1(5):358-64. Epub 1987/11/01.
95. **Halliwell B.** Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med* **1989**, 82:747-752.
96. **Halliwell B, Whiteman M.** Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* **2004**, 142: 231-255.
97. **Hall L, Williams K, Perry ACF, Frayne J, Jury JA.** The majority of human glutathione peroxidase type 5 (GPX5) transcripts are incorrectly spliced : implications for the role of GPX5 in the male reproductive tract. *Biochem J.* **1998**, 333:5-9.
98. **Harmening DM.** Hemoglobinopathies In: Harmening DM(Editor): Clinical hematology and fundamentals of hemostasis. 3rd Edition, Philadelphia, USA, **1997**, s. 173-192.
99. **Hebbel RP, Eaton JW, Balasingam M, Steinberg MH.** Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *J Clin Invest.* **1982**, 70(6):1253-9. Epub 1982/12/01.
100. **Hebbel RP, Morgan WT, Eaton JW, Hedlund BE.** Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1988**, 85(1):237-41. Epub 1988/01/01.
101. **Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D.** The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation.* **2004**, 11(2):129-51. Epub 2004/07/29.
102. **Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN. 1999.** 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8- Hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods in Enzymology*, 300, 156-166.
103. **Herrick JB.** Peculiar elongated and sickle shaped red corpuscles in a case of severe anemia. *Arch Intern Med,* **1910**, s. 6:517
104. **Higgs DR, Thein SL, Wood WG.** Human Haemoglobin. In; *The Thalassemia Syndromes*, Eds; Gibbons R, Higgs DR, Old JM, Oliveri NF, Thein SL, Wood WG, 4th Ed, Blackwell Science Ltd, Oxford, **2001**, 65-120.
105. **Hileman EA, Achanta G, Huang P.** Superoxide dismutase: an emerging target for cancer therapeutics. *Expert Opin Ther Targets.* **2001**, 5(6):697-710. Epub 2003/01/24.
106. **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. Epub 2005/01/22.
107. **Hoffbrand VA, Pettit JE.** *Color Atlas of Clinical Hematology* .3th Ed., Spain: Harcourt Publishers Limited, **2000**, 85-87.
108. **Ho PJ, Thein SL.** Gene regulation and deregulation: a β globin perspective. *Blood Rev* **2000**, 14:78-93.
109. **Horton AA, Fairhurst S. (1987).** Lipid peroxidation and mechanism of toxicity. *CRC Crit. Rev. Tox.* 18:27-69.
110. **Huisman THJ.** Human Hemoglobin In: *Blood Disease of Infancy and Childhood.* 7th ed, St Louis, Mosby, Inc ,st Louis **1995**.
111. **Huisman THJ:** The structure and function of normal and abnormal hemoglobins. *Br Clin Haematol* **1993** ; 6:1.
112. **Hunt JA, Ingram VM.** Abnormal human hemoglobins II. The chymotryptic digestion of the trypsin resistant „core“ of hemoglobin A and s. *Biochimica Biophysica Acta* **1958**, 28: 546-549.
113. **Hunt JA, Ingram VM.** A terminal peptid sequence of human hemoglobin? *Nature* **1959**, 184: 640- 641. 1994/08/01.

114. **Ingram VM.** A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle cell anemia hemoglobin. *Nature* **1956**, 178: 792- 94.
115. **Ishigami M.** [Superoxide dismutase (SOD)]. *Nihon Rinsho*. **2002**, 60 Suppl 8:475-85. Epub 2002/10/03.
116. **Jacob RA, Burri BJ.** Oxidative damage and defense. *Am J Clin Nutr*. **1996**, 63(6):985S-90S. Epub 1996/06/01
117. **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. Epub 1990/08/01.
118. **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. Epub 1984/03/25.
119. **Jensen SJK.** Oxidative stress and free radicals. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, **2003**, 666: 387-392.
120. **Jiang Y, Zhu W, Li H, Yin S, Liu H ve ark.** Oxidative desulfurization of fuels catalyzed by Fenton-like ionic liquids at room temperature. *ChemSusChem*. **2011**, 4(3):399-403. Epub 2011/03/12.
121. **Kaplan E, Zuelzer WW, Neel JW.** A new inherited abnormality of hemoglobin and its reactions with sickle cell hemoglobin. *Blood* **1951**, 6: 1240- 59.
122. **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. Epub 2000/09/21.
123. **Kasai H.** **1997.** Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutation. Research*, 387, 147-163.
124. **Kaur C, Ling EA.** Antioxidants and neuroprotection in the adult and developing central nervous system. *Curr Med Chem*. **2008**, 15(29):3068-80. Epub 2008/12/17.
125. **Kaynak K.** Akciğer kanserinde oksidatif hasarın rolü. *Solunum*, **2002**, 4(4):468-473
126. **Kılınc Y, Akmanlar N, Kümi M, Köker I.** The incidences of hemoglobinopathies and thalassemias in cord blood of newborns from Çukurova Province. *Med Bull İstanbul Medical Faculty*, **1992**, s. 25: 9- 14.
127. **Kılınc Y, Tanyeli A, Kümi M, Antmen B, Serbest M ve ark.** Hemoglobinopathies and thalassemia in Tarsus in Southern Turkey. *International Conference on Thalassemia, India*, **1993**.
128. **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. Epub 2010/12/24.
129. **Kim JH, Patra CR, Arkalgud JR, Boghossian AA, Zhang J ve ark.** Single-molecule detection of H₂O₂ mediating angiogenic redox signaling on fluorescent single-walled carbon nanotube array. *ACS Nano*. **2011**, 5(10):7848-57. Epub 2011/09/09.
130. **Klinken SP.** Red blood cells. *IntJ Biochem Cell Biol*, **2002**, 34:1513-1518.
131. **Knight JA, Pieper RK., Mc Clellan L. (1988).** Specificity of thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. *Clin. Chem*. 34:2433-2438.
132. **Kulbacka J, Saczko J, Chwilkowska A.** [Oxidative stress in cells damage processes]. *Pol Merkur Lekarski*. **2009**, 27(157):44-7. Epub 2009/08/05. Stres oksydacyjny w procesach uszkodzenia komorek.
133. **Kuliev AM, Modell B.** Problems in the control of genetic disorders. *Biomed Sci*. **1990**, 1(1):3-17. Epub 1990/01/01.
134. **Kulozik AE, Waiscoat JS, Serjeant GR.** Geographic survey of β S globulin gene Hablotypes: evidence for an independent Asian origin of the sickle cell mutation. *Annals of Journals of Human genetics* **1986**, 39: 239- 44.
135. **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. **2012**, Jul;46(7):883-90.
136. **Kurutuş Belge E, İnanç Güler F, Kılınc M.** Serbest Radikaller. *Arşiv*, **2004**, 13:120-13
137. **Lafuse WP, Alvarez GR, Zwilling 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. Epub 2000/10/24.

138. **Lakshmi VM, Zenser TV, Davis BB.** Mechanism of 3-(glutathion-S-yl)-benzidine formation. *Toxicol Appl Pharmacol.* **1994**, 125(2):256-63. Epub 1994/04/01.
139. **Landburg PP, Teerlink T, Biemond BJ, Brandjes DP, Muskiet FA ve ark.** Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in sickle cell disease are related to the hemolytic phenotype. *Blood Cells Mol Dis.* **2010**, 44(4):229-32. Epub 2010/02/27.
140. **Lukens JN.** Hemoglobino pathies S,C,D,E and O and associated diseases. In: Lee GR Bithel TC, Foerster J Eds. *Wintrobe's Clinical Hematology.* 9th ed, Philadelphia, Lea and Febiger, **1993**, s. 1061-1101
141. **Lukens JN, Lee GR.** The Abnormal Hemoglobins. In: *Wintrobe's Clinical Hematology.* Eds: Lee GR, Bithell CT, Foerster J, Athens JW, Wkens JN. Lea and Febiger Com, Pennsylvania **1993**.
142. **Mansouri A, Tarhuni A, Larosche I, Reyl-Desmars F, Demeilliers C ve ark.** 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. Epub 2010/01/01.
143. **Marotta CA, Wilson JT, Forget BJ, Weissman SM.** Human β globulin Messenger RNA III. Nucleotide sequences derived from complementary DNA. *Journal of Biological Chemistry* **1977**, 252:5040- 51.
144. **Martins VD, Manfredini V, Peralba MC, Benfato MS.** Alpha-lipoic acid modifies oxidative stress parameters in sickle cell trait subjects and sickle cell patients. **2009**, Apr;28(2):192-7
145. **Mary EE.** Hereditary Hemolytic Anemias. In: Tintinalli JE, Kelen GD, Stapczynski JS Eds. *Emergency Medicine, A Comprehensive Stuy Guide.* 5th Ed, North Carolina: McGraw Hill Companies Inc, **2000**, 1382-1387.
146. **McCavit TL.** Sickle cell disease. *Pediatr Rev.* **2012**, 33(5):195-204; quiz 5-6. Epub 2012/05/03.
147. **McGann PT, Howard TA, Flanagan JM, Lahti JM, Ware RE.** Chromosome damage and repair in children with sickle cell anaemia and long-term hydroxycarbamide exposure. **2011** Jul;154(1):134-40
148. **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. Epub 1991/09/01.
149. **Meram İ, Aktaran Ş.** Serbest Radikallerin Biomoleküller Üzerine Etkileri. *Arşiv.* **2002**, 11:299.
150. **MFCM Knapen, Zusterzeel PLM, Peters WHM, Steegers EAP.** Glutathione and Glutathione-Related Enzymes in Reproduction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* **1999**, 82: 171-184
151. **Minnet C.** Çocukluk çağında B12 vitamin eksikliğinin oksidan-antioksidan sistem ve DNA hasarı ile ilişkisi. Uzmanlık tezi, **2006**.
152. **Modell B, Darlison M, Birgens H, Cario H, Faustino P ve ark.** Epidemiology of haemoglobin disorders in Europe: an overview. *Scand J Clin Lab Invest.* **2007**, 67(1):39-69. Epub 2007/03/17.
153. **Modell B, Darlison M.** Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ.* **2008**, 86(6):480-7. Epub 2008/06/24.
154. **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. Epub 1994/06/01. Livelli plasmatici degli antiossidanti sierici (acido urico, ceruloplasmina, transferrina) in neonati a termine e pretermine nella prima settimana di vita.
155. **Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC ve ark.** Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA.* **2005**, 294(1):81-90. Epub 2005/07/07.
156. **Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW.** *Harper Biyokimya.* 25. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul, **2004**, s. 64, 67
157. **Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Radwell VW.** *Harper's Biochemistry.* 21th ed. Long. Medical Book London, **1988**.

158. **Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW.** *Harper Biyokimya.* 25. Baskı, İstanbul; Nobel Matbaacılık, **2004.**
159. **Neel JV.** The clinical detection of the genetic carriers of inherited disease. *Medicine* **1947**, 26: 115- 53.
160. **Neel JV.** The inheritance of sickle cell anemia. *Science* **1949**, 110: 64- 66.
161. **Nelson DL, Cox MM.** *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri.* 3. Baskıdan çeviri, İstanbul: Palme Yayıncılık, **1999**
162. **Nelson DL, Cox MM.** *Lehninger Principles of Biochemistry.* New York: Worth Publishers, **2000**, 213.
163. **Nijveldt RJ, Noad E, Hoarn DEC, Boelens PG, Norren K ve ark.** Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* **2001**, 74:418-425.
164. **Niki E. (1987).** Antioxidant in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phy. Lipids.* 44:227-253.
165. **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. Epub 2009/04/23.
166. **Nishinaka Y, Yokota M.** [Free radical]. *Nihon Rinsho.* **1994**, 52 Suppl(Pt 1):196-200. Epub 1994/07/01.
167. **Nordberg J, Arner ESJ.** Reactive Oxygen Species, Antioxidants and The Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biology and Medicine*, **2001**, 31(11): 1287-1317
168. **Olivieri NF, Weatheral DJ.** Thalassemiyas. Eds; Lilleyman JS, Hann IM, Blanchette VS In. *Pediatric Hematology*, 2th Ed., London: Churchill & Livingstone, **1999**, 307-327.
169. **Olivieri NF, Weatheral DJ.** Thalassemiyas. In; Pediatric Hematology. Eds: Lilleyman JS, Hann IM, Blanchette VS . 2th Ed, Churchill and Livingstone, London: **1999.**
170. **Onat T, Eerk K, Sözmen YE.** *İnsan Biyokimyası.* Ankara: Palme Yayıncılık. **2002**, 135,535-53
171. **Ozden O, Park SH, Kim HS, Jiang H, Coleman MC ve ark.** Acetylation of MnSOD directs enzymatic activity responding to cellular nutrient status or oxidative stress. *Aging (Albany NY).* **2011**, 3(2):102-7. Epub 2011/03/10.
172. **Özkan A, Fışkın K.** Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidant Enzimler. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi.* **2004**, 14:52-60
173. **Ozmen D, Boydak B, Mutaf I, Zoghi M, Kumanlioglu K ve ark.** 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. Epub 1999/10/03.
174. **Oztas Y, Durukan I, Unal S, Ozgunes N.** Plasma protein oxidation is correlated positively with plasma iron levels and negatively with hemolysate zinc levels in sickle-cell anemia patients. **2012**, Apr;34(2):129-35.
175. **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. Epub 2010/12/31.
176. **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. Epub 2010/12/08.
177. **Pauling L, Itano HA, Singer SJ, Weells IC.** Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science* **1949**, 110: 543- 48.
178. **Percival M.** Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights.* **1998**, 98(10): 1-4.
179. **Peskin AV.** Cu,Zn-superoxide dismutase gene dosage and cell resistance to oxidative stress: a review. *Biosci Rep.* **1997**, 17(1):85-9. Epub 1997/02/01.
180. **Placer CA, Cushman LL, Johnson BC. (1990).** Estimation of product of lipid peroxidation (Malondyaldehyde) in biochemical systems. *Anal. Biochem.* 16:259-264.
181. **Platt OS, Dover GJ.** Sickle cell disease. In: Nathan DG, Oski FA Eds. *Hematology of Infancy and Childhood.* 4th ed, Philadelphia, WB Saunders Company, **1993**, s. 732-787.
182. **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. Epub 1993/05/01.
183. **Porter NA. (1984).** Chemistry of lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 105: 273-283.
184. **Ramot R, Fisher S, Remex D.** Hemoglobin O in Arab family. Sickle cell hemoglobin O Arab trait. *British Medical Journal.* **1960**, ii: 1262- 64.

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. Epub 2012/02/02.
186. **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. Epub 2001/07/21.
187. **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. Epub 1991/11/15.
188. **Richard RE.** The management of sickle cell pain. *Curr Pain Headache Rep.* **2009**, 13(4):295-7. Epub 2009/07/10.
189. **Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, Rajkhowa M, Miller D ve ark.** The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* **2012**, 27(10):2908-17. Epub 2012/07/14.
190. **Rodwell W V:** Proteins: Myoglobin and Hemoglobin. In: Harper' ın Biyokimyası, Barış Kitabevi **1996**.
191. **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. Epub 2005/04/07
192. **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. Epub 1988/03/01.
193. **Schallreuter KU, Moore J, Wood JM, Beazley WD, Gaze DC ve ark.** In vivo and in vitro evidence for hydrogen peroxide (H₂O₂) 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. Epub 1999/10/28.
194. **Scheibmeir HD, Christensen K, Whitaker SH, Jegaethesan J, Clancy R ve ark.** A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive Crit Care Nurs* **2005**, 21: 24-28.
195. **Schellhorn HE.** Regulation of hydroperoxidase (catalase) expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* **1995**, 131(2):113-9. Epub 1995/09/01.
196. **Schroeder WA, Kay LM, Wells IC, Gerke C, Moss C.** Amino acid composition of hemoglobins of normal negroes and sickle cell anemics. *Journal of Biological Chemistry* **1950**, 187: 221- 40.
197. **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. Epub 2007/11/28.
198. **Serjeant GR.** Sickle Cell Disease. ed 2. Oxford, *Oxford University Pres*, **1992**.
199. **Sifil A, Çamsarı T.** Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* **1997**, 3-4:92-95.
200. **Simic MG.** DNA markers of oxidative processes in vivo: relevance to carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Cancer Res.* **1994**, 54(7 Suppl):1918s-23s. Epub 1994/04/01.
201. **Skrzycki M, Czeczot H.** [Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD)--structure, properties and functions]. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* **2004**, 58:301-11. Epub 2004/07/29. Zewnatzkomorkowa dysmutaza ponadtlenkowa (EC-SOD)--budowa, wlasciwosci i funkcje.
202. **Slater TF. (1984).** Free radical mechanism in tissue injury. *Biochem. J.* 222:1-15.
203. **Sonntag DM, De Boer J, Medvedovic M, Baxter CS, LeMasters G ve ark.** 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. Epub 2004/05/12.
204. **Spector A, Yang Y, Ho YS, Magnenat JL, Wang RR ve ark.** Variation in cellular glutathione peroxidase activity in lens epithelial cells, transgenics and knockouts does not significantly change the response to H₂O₂ stress. *Exp Eye Res.* **1996**, 62(5):521-40. Epub 1996/05/01.
205. **Stadtman ER, Levine RL. (2003)** Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25, 207-218.
206. **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. Epub 1993/01/01.
207. **Stadtman ER. (1998)** Protein modification in aging. *J Gerontol* 43, 112-120.

208. **Stammatoyannopoulos G, Fessas P.** Observation on hemoglobin „Pylos“ . The hemoglobin Pylos hemoglobin S combination. *Journal of laboratory and clinical medicine.* **1963**, 62: 193- 200.
209. **Stapczynski JS, Martin GA.** Hematologic Emergencies. In: Stone CK, Humphries RL Eds. Current Emergency&Treatment. 5th Ed, USA, McGraw Hill Companies Inc, **2004**, s. 788-823.
210. **Steinberg MH.** In the clinic. Sickle cell disease. *Ann Intern Med.* **2011**, 155(5):ITC31-15; quiz ITC316. Epub 2011/09/07.
211. **Şişli N:** İnsan Biyokimyası. Palme Yayıncılık, Ankara **2002**.
212. **Tadmouri GO, Başak AN.** B–thalassemia. in Turkey; A review of the clinical epidemiological molecular and evoluinory aspects. *Hemoglobin.* **2001**, 25(2):227-239.
213. **Thomas CE, Aust SD.** Free radicals and environmental toxins. *Ann Emerg Med.* **1986**, 15(9):1075-83. Epub 1986/09/01.
214. **Thomson M, Mcinnes RR, Willard HF.** Genetics in Medicine.5th ed,Philadelphia, B.Saunders Copany **1991**.
215. **Ulutaş KT.** Orak Hücre Anemili Hastalarda Ferrutin-A, Enflamatuvar Marker ve Oksidatif Stres İlişkisinin Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Hatay, **2013**.
216. **Uzun B.** Ağrılı kriz nedeniyle acil servise başvuran orak hücre hastalarında tramadol ile meperidinin etkinliğinin araştırılması.Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp Anabilim Dalı, Adana, **2006**
217. **Ünal B.** B Talasemi ve G6PD Enzim Eksikliğinde MDA Düzeyi. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı,Adana, **1999**.
218. **Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M ve ark.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **2007**, 39: 44-84.
219. **Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M ve ark.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* **2007**, 39(1):44-84. Epub 2006/09/19.
220. **Vladimirov Iu A.** [Free radical lipid oxidation and physical properties of lipid layer of biological membranes]. *Biofizika.* **1987**, 32(5):830-44. Epub 1987/09/01. Svobodnoradikal'noe okislenie lipidov i fizicheskie svoistva lipidnogo sloia biologicheskikh membran.
221. **Von Sonntag C.** Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair. Springer- Verlag Berlin Heidelberg New York, **2006**.
222. **Wada Y.** Advanced analytical methods for hemoglobin variants. *J Chromatogr* **2002**, 781:291-301.
223. **Walter PB, Fung EB, Killilea DW, Jiang Q, Hudes M ve ark.** Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with beta-thalassaemia or sickle cell disease. *Br J Haematol.* **2006**, 135(2):254-63. Epub 2006/10/03.
224. **Wang W, Lukens JN.** Sickle cell anemia and other sickling syndromes. In: Lee RG, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM, Eds. *Wintrobe's Clinical Hematology.* 10th Ed, Middle East Edition, Baltimore: Williams and Wilkins Company, **1999**, 1347-1397.
225. **Ward PA.** Role of toxic oxygen products from phagocytic cells in tissue injury. *Adv Shock Res.* **1983**, 10:27-34. Epub 1983/01/01.
226. **Weatheral DJ, Clegg JB, Higgs DR, Wood WG.** The Thalassemias. In; Scriver CR, Arthur AL, Sly WS, Valle D. Eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th Ed., New York: McGraw Hill Publishing Division, **2001**, 4571-4636.
227. **Weatheral DJ.** The Thalassemias. Eds; Beutler E, Coller BS, Lichtman MA, Kipps TJ, Seligsohn U. In. *Williams Hematology*, 6th Ed., New York: Mc Graw Hill Publishing Co, **2001**, 547-580.
228. **Winterbourn CC.** Hydroxyl radical production in body fluids. Roles of metal ions, ascorbate and superoxide. *Biochem J.* **1981**, 198(1):125-31. Epub 1981/07/15.
229. **Wood KC, Granger DN.** Sickle cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **2007**, 34(9):926-32. Epub 2007/07/25.

230. **Wood KC, Hsu LL, Gladwin MT.** Sick cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. *Free Radic Biol Med.* **2008**, 44(8):1506-28. Epub 2008/02/12.
231. **Word RJ, Peters TJ.** Free radicals. Kaplan LA, Pesce AJ editors. *Clinical chemistry.* 3th Ed. Mosby Year Book, Inc. **1996**, 765-777.
232. **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. Epub 2006/06/20.
233. **Xia L, Björnstedt M, Nordman T, Eriksson LC, Olsson JM.** Reduction of ubiquinone by lipoamide dehydrogenase. An antioxidant regenerating pathway. *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268:1486– 1490
234. **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. Epub 1996/06/25.
235. **Yalçın S.** Kronik Alkol Kullanımında Protein Karbonil Düzeylerinin Belirlenmesi ve Diğer Biyogöstergelerle Birlikte Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, **2006**.
236. **Yamazoe K, Inaba T, Bonkobara M, Matsuki N, Ono K ve ark.** 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. Epub 1998/03/10.
237. **Yeum KJ, Russell MR, Krinsky IN, Adlini G.** Biomarkers of antioxidant capacity in hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2004**, 430: 97-103.
238. **Yeum KJ, Russell MR, Krinsky IN, Adlini G.** Biomarkers of antioxidant capacity in hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2004**, 430: 97-103.
239. **Yoshida M, Fukuda A, Hara M, Terada A, Kitanaka Y ve ark.** 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. Epub 2003/02/01.
240. **Young IS, Woodside JV.** Antioxidants in health and disease, *J Clin Pathol*, **2001**, 54:176-186
241. **Yüregir GT.** Hemoglobin Yapısı ve Özellikleri. *Klinik Biyokimya* **1990**, 1:132-143.
242. **Zhang ZH, Yu SZ, Wang ZT, Zhao BL, Hou JW ve ark.** Scavenging effects of tetramethylpyrazine on active oxygen free radicals. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* **1994**, 15(3):229-31. Epub 1994/05/01.
243. **Zwart De LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE.** Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicin.* **1999**, 26: 202-226

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Hatay'ın İskenderun ilçesinde doğdu. İlkokulu Mithat Paşa İlköğretim, İssime İlköğretim ve Mehmet-Belkıs Büyükvelioğlu İlkokulu'nda tamamladı. Orta ve lise öğrenimini Reyhanlı İsmet-Ayşe Behzatoğlu Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2005 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji bölümünde lisans eğitimine başladı. 2009 yılında mezun oldu. 2011 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde Yüksek Lisans eğitimine başladı.