

Stabil Durumdaki Orak Hücreli Anemi Hastalarının Plazma ve Hemolizatlarındaki Bakır, Çinko, Demir ve Kalsiyum Düzeylerinin Taşıyıcılarla Karşılaştırılması

[Comparison of Copper, Zinc, Iron and Calcium Levels in Plasma and Hemolysate of Steady State Sickle Cell Anemia Patients with Carriers]

Yeşim Er Öztaş¹,
İlknur Tokgöz²,
Selma Ünal³,
Nuriman Özgüneş⁴

¹Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

²Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Ankara, Türkiye

³Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye

⁴Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Yazışma Adresi

[Correspondence Address]

Prof. Dr. Nuriman Özgüneş

Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Telefon: 3051652-131

Faks: 3245885

e-posta: nozgunes@hacettepe.edu.tr

Kayıt Tarihi : 16 Ekim 2009 ; Kabul Tarihi : 26 Nisan 2010

[Registered : 16 October 2009 ; Accepted : 26 April 2010]

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, genel durumu stabil (son 2 ayda kriz geçirmemiş ve transfüzyon almamış) orak hücreli anemi hastalarının plazma ve hemolizat ortamlarının bazı önemli iyonlar (çinko, bakır, demir, kalsiyum) yönünden taşıyıcılarla karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntemler: Son iki ay içinde genel durumu stabil olan 15 orak hücre hastası ve 13 taşıyıcı çalışmaya dahil edilmiştir. Plazma ve hemolizat olarak ayrılan örneklerde iyon düzeyleri atomik absorpsiyon spektrometrisi tekniğiyle çalışılmıştır.

Bulgular: Çinko düzeyleri, hasta ve taşıyıcı plazmalarında benzer, hemolizatta ise hastalarda taşıyıcılara kıyasla yüksektir ($p=0.011$). Bakır düzeyleri, hasta plazmalarında taşıyıcılara kıyasla yüksek ($p=0.013$), hemolizatta ise taşıyıcılardan düşüktür ($p=0.000$). Demir düzeyleri, hasta plazmalarında taşıyıcılardan düşükken ($p=0.001$), hemolizatta hasta ve taşıyıcılarda benzerdir. Kalsiyum düzeyleri, hastalarda hem plazmada hem de hemolizatta taşıyıcılardan yüksektir ($p=0.013$ ve $p=0.003$).

Sonuç: Bu ön çalışmada stabil durumdaki orak hücreli anemi hastalarının plazma ve eritrosit ortamının (plazma çinkosu hariç) incelenen iyonlar yönünden taşıyıcı ortamından farklı olduğu görülmüştür. Orak hücreli anemideki iyonların durumunun, etkileşimlerinin ve organizmadaki etkilerinin anlaşılması açısından daha geniş sayıda ve farklı klinik tabloları olan orak hücreli anemi hastalarının incelenmesi yararlı olacaktır.

Anahtar kelimeler: Orak Hücreli Anemi, Stabil Durum, Bakır, Çinko, Demir, Kalsiyum

ABSTRACT

Objective: Copper, zinc, iron and calcium levels in the blood samples of sickle cell anemia patients and carriers living in Mersin were analyzed and compared with each other in this study. It was aimed to present the alteration in the ion levels, namely zinc, copper, iron and calcium, in sickle cell anemia.

Material and methods: 15 sickle cell anemia patients with stable clinics within the last two months and 13 carriers were included in the study. Ion levels were analyzed by atomic absorption spectrophotometry in the samples separated as plasma and hemolysate.

Results: Plasma zinc levels were similar between patients and carriers whereas zinc levels in the hemolysate of the patients were higher than carriers ($p=0.011$). Copper levels of patients were higher in the plasmas ($p=0.013$), and lower in the hemolysates ($p=0.000$) compared to the carriers. Iron levels were lower in patients than carriers in the plasma ($p=0.001$) and similar between two groups in the hemolysate. Calcium levels of the patients were higher than the carriers in both the plasma and hemolysate ($p=0.013$ and $p=0.003$).

Conclusion: In this preliminary study it was observed that the plasma and hemolysate medium of sickle cell anemia patients is different from carriers except plasma zinc levels. It will be useful to investigate a larger population of patients with different clinical presentations to understand the situation of the ions, their interactions and impacts on the organism in sickle cell anemia.

Key Words: Sickle Cell Anemia, Stable State, Copper, Zinc, Iron, Calcium

Giriş

Hemoglobin genindeki bir nokta mutasyona bağlı ortaya çıkan orak hücreli anemi (OHA), literatüre ilk moleküler hastalık olarak girmiştir. Orak hemoglobin oksijensizlik, asidoz gibi durumlarda eritrosit içinde polimerleşirken, eritrositte methemoglobin, hemikrom, hemin ve hem oluşumu artmıştır [1-2]. Ayrıca kronik hemoliz sonucu açığa çıkan hücre içeriği de plazmanın kimyasal bileşimini değiştirmekte ve inflamatuvar bir ortam hazırlamaktadır [3]. Bir nokta mutasyona bağlı ortaya çıkan OHA 'daki bu karmaşık sürecin anlaşılmasında, metabolik olayların akışında kilit rolleri olan iyonlar önem kazanmıştır.

OHA hastalarında antioksidan özellikleri iyi bilinen çinko iyonunun, plazma, eritrosit, saç gibi dokularda eksildiği bildirilmiş [4-5], yine idrarla çinko kaybedildiği gösterilmiştir [6]. Bir çalışmada çocukluk çağı OHA hastalarının % 44'ünde çinko eksikliği saptanmıştır [7]. Ancak OHA hastalarının kontrolle benzer çinko düzeylerine sahip olduğunu bildiren çalışmalar da vardır [8]. Çinko düzeylerindeki değişim sıklıkla bakır dengesini de etkilemektedir [9,10]. Çinko eksikliği görülen dokularda bakır düzeylerinin arttığı gösterilmiştir [11]. OHA hastalarında plazma bakır düzeylerini artmış [12,13] veya benzer bulan çalışmalar vardır [5,14].

OHA' daki bir diğer önemli iyon da hemoglobin yapısında yer alan demirdir. OHA hastalarında kronik hemoliz nedeniyle idrarla demir kaybı artmakta [15] ancak tedavi amaçlı uygulanan transfüzyonlar neticesinde demir birikimi de gözlemlenmektedir [16]. Demir bakır birlikte oksidasyonu tetiklemesi bakımından önemlidir. Orak eritrositlerde demir miktarının kontrole kıyasla arttığı [17], aynı kaldığı veya azaldığı rapor edilmiştir [18].

Orak eritrositlerde özellikle oksijensizlik sırasında kalsiyum iyonu derişiminin arttığı gösterilmiştir [19]. Kalsiyum hücre içinde birçok metabolik olayı başlatabilmektedir [20]. OHA hastalarında plazma kalsiyum düzeyleriyle ilgili az sayıda çalışma vardır [21-23].

Ülkemizde OHA hastalarında çinko, bakır ve demir iyonlarının durumuyla ilgili iyon düzeylerini araştıran çalışmalardan çeşitli sonuçlar elde edilmiştir [24-26]. Kalsiyum düzeyleriyle ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Çeşitli çalışmalarda, hastaların klinik durumuna bağlı olarak farklı sonuçlar alınmış olabilir. Pek çok makalede hasta seçiminin ne şekilde yapıldığının açık olmaması, kıyaslama yapmayı zorlaştırmaktadır. Bu ön çalışmada özellikle son iki aydır krize girmemiş ve transfüzyon almamış hastalar seçilerek, eritrosit ve plazmalarındaki iyonik ortamın taşıyıcılarla karşılaştırılması amaçlanmıştır. İleriki çalışmalarımızda daha fazla sayıda denekle ve farklı klinik tabloları olan hasta gruplarıyla çalışılarak, stabil durumdaki ortamın sağlıklı ortam ve kriz ortamından farkının ve tedavi ile sağlıklı ortama ne derece yaklaşabildiğinin anlaşılması amaçlanmaktadır.

Gereç ve Yöntem

Hastalar

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden etik kurul izni alınarak, Çocuk Hematolojisi bölümünde takip ve tedavi edilen orak hücreli anemi hastalarından, son iki ay içinde vazooklüzif kriz geçirmemiş, transfüzyon almamış ve hastaneye yatmamış, genel durumu stabil olan çocuklar çalışmaya dahil edilmiştir (N=15). OHA ve taşıyıcılık tanısı elektroforez, HPLC ve β globin geni mutasyon analizi ile konulmuştur. 15 OHA hastasının 9 tanesi SS ve 6 tanesi S β genotipindedir. Hastaların 4 tanesi çinko, 12 tanesi hidroksiüre tedavisi almaktadır. Taşıyıcı çocuklar hastaların kardeş veya akrabalarından seçilmiştir (N=13).

Kan Örnekleri

EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri 2500 devir/dk'da 10 dk santrifüj edilmiş, plazmalar ayrılmıştır. Eritrosit paketi soğuk %0.9 NaCl ile üç kez yıkanmıştır. Plazma ve eritrosit örnekleri çalışma gününe kadar -20°C'de saklanmıştır.

İyon Düzeyleri Ölçümü

Plazma ve hemolizatta bakır, demir, çinko ve kalsiyum düzeyleri alev atomizörlü ve döteryum lambalı Atomik Absorpsiyon Spektrofotometri (AAS) cihazıyla (Analyst-800, Perkin Elmer, ABD) ölçülmüştür. Kullanılan pipetler ve diğer cam malzeme en az 1 saat sülfokromik asit karışımında (konsantre sülfirik asit çözeltisinde doyurulmuş potasyum dikromat) bekletilerek deiyonize su (Barnstead, 18.2 M Ω cm) ile yıkanmıştır. Tüm ölçümlerde analitik ölçütteki reaktifler ve deiyonize su (Barnstead, 18.2 MW cm) kullanılmıştır. Stok standart çözeltiler elementlerin nitrat tuzları, Cu(NO₃)₂·3H₂O (Merck, Darmstadt, Almanya), Zn(NO₃)₂·6H₂O (BHD, Poole, İngiltere), Fe(NO₃)₃·9H₂O (Merck, Darmstadt, Almanya) ve deiyonize su ile 1000 mg/L olacak şekilde hazırlanmıştır. Kalsiyum için standart çözelti Perkin Elmer Pure, Atomic Spectroscopy Standard, (1000 μ g L⁻¹) kullanılarak hazırlanmıştır. Plazma ölçümlerinde 15 kez seyreltme, sadece kalsiyum için 30 kat seyreltme uygulanmıştır. Hemolizat ölçümlerinde ise 10 kez seyreltme, sadece demir için 70 kez seyreltme uygulanmıştır. AAS cihazında; bakır (II) için 324.8 nm, kalsiyum (II) için 422.7 nm, çinko (II) için 213.9 nm ve Fe (III) için 248.3 nm dalga boyları ile ölçüm yapılmıştır. Plazmada kalsiyum düzeyi, hemolizatta ise demir düzeyi mg/dl olarak, diğer tüm iyon düzeyleri ise μ g/dl olarak ifade edilmiştir.

İstatistiksel Değerlendirme

SPSS paket programı (Sürüm 15) kullanılmış, grup ortalamaları Mann-Whitney U testi ile kıyaslanmıştır. P değerlerinde Bonferonni düzeltmesi yapılmıştır.

Bulgular

Hastaların genel özellikleri

Hastalarda ortalama yaş 8.5 ± 4.2 ve taşıyıcılarda 7.7 ± 3.9 olup aralarında anlamlı fark yoktur. Hasta ve taşıyıcılar cinsiyet bakımından benzerdir.

İyon Düzeyleri

Hasta ve taşıyıcılara ait ortalama çinko, bakır, demir ve kalsiyum iyonlarının plazma ve hemolizat düzeyleri Tablo-1'de özetlenmiştir. Literatürde sağlıklı çocuklardaki plazma iyon referans aralığı [27] da aynı tablo da verilmiştir.

Çinko düzeyleri, plazmada hastanın çinko kullanımından etkilenmezken, hemolizat çinko düzeyleri çinko kullanan hastalarda yüksektir ($p=0.004$). Hastaların hemolizat çinko düzeyleri taşıyıcılardan yüksek bulundursa da ($p<0.05$), çinko kullanan hastalar analiz dışı tutulduğunda hasta ve taşıyıcılara ait hemolizat çinko düzeyleri benzer bulunmaktadır (Tablo 1).

Bakır düzeyleri, hasta plazmalarında taşıyıcılara kıyasla yüksek ($p=0.013$), hemolizatta ise taşıyıcılardan düşüktür ($p=0.000$) (Tablo 1).

Demir düzeyleri, hasta plazmalarında taşıyıcılardan düşükken ($p=0.001$), hemolizatta hasta ve taşıyıcılarda benzerdir (Tablo 1).

Kalsiyum düzeyleri, hastalarda hem plazmada hem de hemolizatta taşıyıcılardan yüksektir ($p=0.013$ ve $p=0.003$) (Tablo 1).

Tartışma

Bu çalışmada, genel durumu stabil (son 2 ayda kriz geçirmemiş ve transfüzyon almamış) orak hücreli anemi hastalarının plazma ve hemolizat ortamlarının bazı

önemli iyonlar (çinko, bakır, demir, kalsiyum) yönünden taşıyıcılarla karşılaştırılması amaçlanmıştır. Araştırma için aynı merkezde, düzenli takip edilen ve son iki ay içinde klinik durumu stabil olan hastalar seçilmiştir. Kontrol grubu ise çoğunlukla kardeş ve akraba olan taşıyıcılardan oluşturulmuştur. Böylece sosyoekonomik durum ve beslenme alışkanlıkları gibi faktörler benzer tutulmuştur.

Çeşitli çalışmalarda OHA hastalarında plazma veya serum çinko düzeylerinin kontrole göre düşük olduğu bildirilmiştir [28-30]. Diğer yandan OHA hastalarının plazmalarında normale benzer çinko düzeyleri bildiren çalışmalar da vardır [31,32]. Ülkemizde OHA hastalarında plazma çinko düzeylerini taşıyıcı ve sağlıklılardan düşük veya benzer olarak bildirilmiştir [25,26]. Bizim çalışmamızda plazma çinko düzeyleri hasta ve taşıyıcılar arasında anlamlı fark göstermemiştir. Hastaların 4 tanesi çinko tedavisi almakla beraber plazma çinko düzeyleri, tedavi almayan hastalarla benzerdir.

OHA' da eritrosit çinko düzeylerini, hasta ve kontrol grubunda benzer [5,31] veya hastalarda daha düşük bulunan çalışmalar vardır [33]. Ülkemizde yapılan bir çalışmada hastaların hem plazmasında hem de eritrositlerinde çinko düzeylerinin düşük olduğu bildirilmiştir [26]. Bir başka çalışmada ise plazma çinko düzeyleri kontrole benzer olan hastalarda, eritrosit ve saçta da çinko eksikliğine rastlanmamıştır [25]. Bizim bulgularımıza göre; çinko kullanımının eritrosit ortamında çinko düzeylerini taşıyıcılara kıyasla yükselttiği, ancak plazmada böyle bir değişime yol açmadığı görülmektedir. Ancak bu bulgunun daha fazla sayıda denekle doğrulanması gerekir.

Hastalarımızın plazma bakır düzeyleri taşıyıcılara göre yüksek bulunmuştur. Literatürde de OHA'lı hastalar-

Tablo 1. Orak Hücreli Anemi hastası ve taşıyıcısı çocuklarda plazma ve hemolizat çinko, bakır, demir ve kalsiyum düzeyleri (ortalama \pm standart sapma)

	Hasta (N=15)	Taşıyıcı (N=13)	Sağlam Referans Aralığı (27)
Plazma			
Çinko ($\mu\text{mol/L}$)	20.26 \pm 5.83	17.56 \pm 5.37	10.7-18.4
Bakır ($\mu\text{mol/L}$)	19.32 \pm 4.51 *	14.24 \pm 4.03	12.56-25.12
Demir ($\mu\text{mol/L}$)	17.91 \pm 1.30 †	21.07 \pm 2.70	9.0-21.5
Kalsiyum (mmol/L)	2.62 \pm 0.43 †	2.21 \pm 0.41	2.20-2.70
Hemolizat			
Çinko ($\mu\text{mol/L}$)	11.40 \pm 3.01 *	9.56 \pm 1.79	
Bakır ($\mu\text{mol/L}$)	1.81 \pm 0.30 †	3.05 \pm 0.41	
Demir (mmol/L)	1.22 \pm 0.25	1.35 \pm 0.19	
Kalsiyum ($\mu\text{mol/L}$)	10.26 \pm 6.41 †	9.65 \pm 5.49	

* $p<0.05$, † $p<0.005$, ‡ $p<0.001$

Hasta plazmalarında bakır ve kalsiyum düzeyleri taşıyıcılardan yüksek, demir düzeyleri ise düşüktür. Hasta hemolizatlarında çinko ve kalsiyum düzeyleri taşıyıcılardan yüksek, bakır düzeyleri ise düşüktür.

da benzer şekilde yüksek bakır düzeyleri bildiren çalışmalar vardır [13,28,29]. Ancak hasta ve kontrollerin benzer bakır düzeyine sahip olduğu da bildirilmiştir [5,34]. Türkiye’de yapılan bir çalışmada OHA hastalarının plazmasında düşük bakır düzeyleri tespit edilmiştir [26]. OHA’ da plazma bakır düzeylerinin yükselmesi, çinko metabolizması ile etkileşimin yanı sıra bakır bağlayıcı bir protein olan serüloplazmin düzeyindeki artışla da ilgili olabilir [35]. Stabil durumdaki OHA hastalarında, subklinik vazooklüzyona bağlı inflamasyon devam ettiği için serüloplazmin düzeylerinin normalden yüksek olabildiği bildirilmiştir [36]. Literatürdeki OHA hastalarının plazma bakır düzeyleriyle ilgili farklı sonuçların yer alması, çalışmaya alınan hastaların klinik durumlarının farklılığından kaynaklanabilir. Hastaların klinik durumlarının daha açık olarak belirtilmesi halinde bu farklılıkların nedenleri daha iyi anlaşılabilir. Bu çalışmada hastalarımızın eritrosit bakır düzeyleri düşük bulunmuştur, bu sonuç ülkemizden yapılmış bir çalışmayla uyumaktadır [26]. Literatürde OHA hastalarında eritrosit bakır düzeylerini kontrolle benzer bulan bir çalışma vardır [5].

Çalışmamızda hastalara ait plazma demir düzeyleri taşıyıcılardan düşük bulunmuştur. Literatürde hem çocuk hem de erişkin orak hücreli anemi hastalarında plazma demir düzeylerini düşük bulan çalışmalar vardır [37,38]. OHA’da kronik intravasküler hemolize bağlı plazma demir düzeylerinde geçici yükselme ve takip eden idrarla kayıp neticesinde de demir eksikliği görülebilir. Hastalarımızın eritrosit demir içeriği taşıyıcılardan düşüktür. Bu durum OHA hastalarında sürekli Hb yapımının uyarılmış halde olması ve demir depolarının yetersiz kalmasıyla ilgili olabilir.

Bu çalışmada hastaların plazma total kalsiyum düzeyleri taşıyıcılara göre yüksek bulunmuştur. Literatürde OHA hastalarında plazma ve serum kalsiyum düzeylerini kontrole göre düşük [21,22] veya benzer [39] bulan çalışmalar vardır. Çalışmamızda hemolizat kalsiyum düzeyleri ise hastalarda taşıyıcılardan yüksek bulunmuştur. Orak eritrositlerde özellikle oksijensizlik sırasında kalsiyum iyonu derişiminin arttığı gösterilmiştir [19]. Oksijensiz in vitro ortamla ve kriz dönemi hastalarına ait örneklerle çalışmak konunun daha iyi aydınlatılmasını sağlayabilir.

Sonuç olarak OHA’da iyon düzeyleriyle ilgili çalışmalardan çok farklı sonuçların elde edilmesi, seçilen hastaların klinik durumu ve hastalığın seyriyle ve fenotipik çeşitliliğiyle [40] veya ölçümde kullanılan metotların farklılığıyla ilgili olabilir. Bu çalışmada, stabil durumdaki orak hücreli anemi hastalarının plazma ve eritrosit ortamının, incelenen iyonlar yönünden (plazma çinko hariç) taşıyıcı ortamından farklı olduğu görülmüştür. Bu durumda stabil (semptomsuz) dönemde iyon ortamının, hastalık belirtisi göstermeyen taşıyıcı ortamından farklılığını koruduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca bulgularımıza göre çinko kullanımının plazmada diğer iyon düzeylerini etkilemediği, eritrositte ise çinko düzeylerini

artırdığı, demir düzeylerini ise taşıyıcılarda benzer düzeye getirdiği gözlenmiştir. Ancak çinko kullanan sadece 4 hastamız olduğu için bu bulguların daha fazla sayıda hasta ile doğrulanması uygundur.

Bu araştırma bir ön çalışmadır ve OHA’ daki iyon durumunun, etkileşimlerinin ve tedavinin hastayı, “oraklaşmayan ortama” ne derece yaklaştırdığının anlaşılabilmesi için daha geniş sayıda ve farklı klinik tabloları olan (stabil durumda veya krizde) hastaların incelenmesi ve karşılaştırılması yararlı olacaktır.

Teşekkür

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi’nce desteklenmiştir (07D091010).

Kaynaklar

- [1] Hebbel RP, Eaton JW, Balasingam M, Steinberg MH. (1982) Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. The Journal of clinical investigation. 70:1253-9.
- [2] Liu SC, Zhai S, Palek J. (1988) Detection of hemin release during hemoglobin s denaturation. Blood. 71:1755-8.
- [3] Platt OS. (2000) Sickle cell anemia as an inflammatory disease. The Journal of clinical investigation. 106:337-8.
- [4] Prasad AS SE, Ortega J, Brewer GJ, Oberleas D, Oelshlegel FJ Jr. Zinc deficiency in sickle cell disease. (1975) Clin Chem. 21:582-87.
- [5] Muskiet FD MF. (1984) Lipids, fatty acids and trace elements in plasma and erythrocytes of pediatric patients with homozygous sickle cell disease. Clinica Chimica Acta. 142:1-10.
- [6] Prasad A, Schoomaker, EB, Ortega, J, Brewer, GJ, Oberleas, D, Oelshlegel, FJ Jr. . (1975) Zinc deficiency in sickle cell disease. Clin Chem. 21:582-87.
- [7] Leonard MB, Zemel BS, Kawchak DA, Ohene-Frempong K, Stallings VA. (1998) Plasma zinc status, growth, and maturation in children with sickle cell disease. The Journal of pediatrics. 132:467-71.
- [8] Kuvibidila SR, Sandoval M, Lao J, Velez M, Yu L, Ode D, Gardner R, Lane G, Warrior RP. (2006) Plasma zinc levels inversely correlate with vascular cell adhesion molecule-1 concentration in children with sickle cell disease. Journal of the National Medical Association. 98:1263-72.
- [9] Prasad AS. (1979) Trace elements: Biochemical and clinical effects of zinc and copper. American journal of hematology. 6:77-87.
- [10] Brewer GJ, Hill GM, Dick RD, Prasad AS, Cossack ZT. (1985) Interactions of trace elements: Clinical significance. Journal of the American College of Nutrition. 4:33-8.
- [11] Oluwole AF, Asubiojo OI, Adekile AD, Filby RH, Bragg A, Grimm CI. (1990) Trace element distribution in the hair of some sickle cell anemia patients and controls. Biological trace element research. 26-27:479-84.
- [12] Kapu MM, Fleming AF, Ezem BU. (1976) Letter: Plasma-copper in sickle-cell anaemia. Lancet. 2:153.
- [13] Bashir N. (1995) Serum zinc and copper levels in sickle cell anaemia and beta-thalassaemia in north jordan. Ann Trop Paediatr 15:291-3.
- [14] Alayash AI, Dafallah A, Al-Quorain A, Omer AH, Wilson MT. (1987) Zinc and copper status in patients with sickle cell anemia. Acta haematologica. 77:87-9.
- [15] Mohanty D, Mukherjee MB, Colah RB, Wadia M, Ghosh K, Chottray GP, Jain D, Italia Y, Ashokan K, Kaul R, Shukla

- DK, Muthuswamy V. (2008) Iron deficiency anaemia in sickle cell disorders in india. *The Indian journal of medical research.* 127:366-9.
- [16] Brown K, Subramony C, May W, Megason G, Liu H, Bishop P, Walker T, Nowicki MJ. (2009) Hepatic iron overload in children with sickle cell anemia on chronic transfusion therapy. *J Pediatr Hematol Oncol.* 31:309-12.
- [17] Repka T SO, Reddy R, Yuan J, Abrahamov A, Rachmilewitz EA, Low PS, Hebbel RP. (1993) Nonrandom association of free iron with membranes of sickle and beta-thalassemic erythrocytes. *Blood.* 82:3204-10.
- [18] Darbari D LM, Gordeuk V, Kark JA, Castro O, Rana S, Apprey V, Kurantsin-Mills J. . (2003) Fluorescence measurements of the labile iron pool of sickle erythrocytes. *Blood.* 102:357-64.
- [19] Ortiz OE LV, Bookchin RM. . (1986) Calcium accumulated by sickle cell anemia red cells does not affect their potassium (86rb+) flux components. *Blood.* 67:710-15.
- [20] Williamson PA KA, Zacowski RA, Devaux PF. *Biochemistry.* (1992) Ca²⁺ induces transbilayer redistribution of all major phospholipids in human erythrocytes. . 31:6355-60.
- [21] Oladipo OO, Temiye EO, Ezeaka VC, Obomanu P. (2005) Serum magnesium, phosphate and calcium in nigerian children with sickle cell disease. *West African journal of medicine.* 24:120-3.
- [22] van der Dijs FP, van der Klis FR, Muskiet FD, Muskiet FA. (1997) Serum calcium and vitamin d status of patients with sickle cell disease in curacao. *Annals of clinical biochemistry.* 34 (Pt 2):170-2.
- [23] Murphy E, Berkowitz LR, Orringer E, Levy L, Gabel SA, London RE. (1987) Cytosolic free calcium levels in sickle red blood cells. *Blood.* 69:1469-74.
- [24] Karayalcin G, Lanzkowsky P, Kazi AB. (1979) Zinc deficiency in children with sickle cell disease. *The American journal of pediatric hematology/oncology.* 1:283-4.
- [25] Kaynak F, Gurkan, E., Urunsak, M., Baslamışli, F., Kocak, R. (2005) Effect of folate supplementation on zinc status in patients with sickle cell disease. *Haematology.* 8:458-61.
- [26] Kilinc Y, Kumi M, Yilmaz B, Tanyeli A. (1991) A comparative study of zinc and copper values in serum, erythrocytes and urine in sickle cell homozygotes and heterozygotes. *Acta paediatrica Scandinavica.* 80:873-4.
- [27] Burtis C, Ashwood ER. (1999) *Tietz Textbook of Clinical Chemistry.* 1799-839. W. B. Saunders Company, Pennsylvania.
- [28] Akenami FO, Aken'Ova YA, Osifo BO. (1999) Serum zinc, copper and magnesium in sickle cell disease at ibadan, south western nigeria. *African journal of medicine and medical sciences.* 28:137-9.
- [29] Hasanato RM. (2006) Zinc and antioxidant vitamin deficiency in patients with severe sickle cell anemia. *Annals of Saudi medicine.* 26:17-21.
- [30] Phebus CK, Maciak BJ, Gloninger MF, Paul HS. (1988) Zinc status of children with sickle cell disease: Relationship to poor growth. *American journal of hematology.* 29:67-73.
- [31] Abshire TC EJ, Githens J H, Hambidge M. (1988) Zinc status in children and young adults with sickle cell disease. *American journal of diseases of children* (1960). 142:1356-9.
- [32] Alayash AI. (1989) Zinc and some zinc dependent enzymes in sickle cell anemia. *International journal for vitamin and nutrition research Internationale Zeitschrift fur Vitamin- und Ernährungsforschung.* 59:388-9.
- [33] Prasad AS, Ortega J, Brewer GJ, Oberleas D, Schoomaker EB. (1976) Trace elements in sickle cell disease. *Jama.* 235:2396-8.
- [34] Arinola OG, Olaniyi JA, Akiibinu MO. (2008) Nigerian sickle cell disease patients with plasmodium parasitaemia. *Pakistan Journal of Nutrition.* 7:766-69.
- [35] Claster S, Wood JC, Noetzli L, Carson SM, Hofstra TC, Khanna R, Coates TD. (2009) Nutritional deficiencies in iron overloaded patients with hemoglobinopathies. *American journal of hematology.* 84:344-8.
- [36] Bourantas KL, Dalekos GN, Makis A, Chaidos A, Tsiara S, Mavridis A. (1998) Acute phase proteins and interleukins in steady state sickle cell disease. *European journal of haematology.* 61:49-54.
- [37] Jeyakumar LH, Akpanyung EO, Akinyemi AA, Emerole GO. (1987) An investigation into the iron status of children with sickle-cell disease in western nigeria. *Journal of tropical pediatrics.* 33:326-8.
- [38] Nagaraj Rao J, Sur AM. (1980) Iron deficiency in sickle cell disease. *Acta paediatrica Scandinavica.* 69:337-40.
- [39] Bayazit AK, Noyan A, Aldudak B, Ozel A, Anarat A, Kilinc Y, Sasmaz, Gali E, Anarat R, Dikmen N. (2002) Renal function in children with sickle cell anemia. *Clinical nephrology.* 57:127-30.
- [40] Ballas SK, Lieff S, Benjamin LJ, Dampier CD, Heeney MM, Hoppe C, Johnson CS, Rogers ZR, Smith-Whitley K, Wang WC, Telen MJ. (2010) Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. *American journal of hematology.* 85:6-13.