Dedication

To my parents.
To my beloved wife.
To my teachers

To my brothers

To my sisters

To my children

To my friends.

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to thank my supervisor Dr. Ahmed Abd Almalik Daak, for his help, advice, guidance and unlimited support throughout this work. I would like also to thank my co-supervisor Dr.Nazik Elmalaika O.S. Husain for her help, support and encouragements throughout this study. Thanks to my colleagues and friends in Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Khartoum, for their assistance.

My thanks are extended to all staff of Biochemistry Laboratory in Khartoum University for their help.

Abstract

Chronic prothrombotic state is thought to be one of the factors that contribute to the episodic vaso-occlusive crisis that characterizes sickle cell disease (SCD).The fish oil derived omega-3 fatty acids, like eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexanoic acid (DHA), claim a plethora of health benefits which affect coagulation and blood count cascade.

The present study aimed to assess the effect of long term supplementation with omega -3 fatty acids on the coagulation parameters and blood counts in patients with homozygous sickle cell disease.

This case-control study included 156 participants, divided into homozygous sickle cell disease patients (HbSS) with omega-3 supplemented omega-3 for two years (n=44); non-supplemented group (n=52);homozygous sickle cell disease (HbSS) patients treated with hydroxyurea (n=8)and healthy controls(HbAA) (n=52). Patients and controls were matched for age, gender, ethnicity and socioeconomic background. Coagulation parameters and blood counts were assessed using automated analyzers. Data were analyzed using SPSS version 19 with P. value <0.05 considered significant.

The age of the study participants ranged from 4-20 years old.

Omega-3 supplemented group had significant differences compared with non-supplemented in plasma PT (17.2±1.8 versus 31.3±11.1 sec, p<0.001), plasma APTT (38.3±4.2 versus 57.0±11.3sec, p< 0.001), INR (1.2±0.14 versus 2.3±0.9, p<0.001) and PLTs count (489.5±121.1versus 533.6±98.7×10^3/µL, p=0.031). However, there was no significant difference between omega-3 treated patients compared with healthy controls in these parameters. The hydroxyurea treated group and non-supplemented group had significantly lower levels of plasma PT (18.5±1.8 versus 31.3±11.1 sec, p< 0.001), plasma APTT (42.8±2.7

versus 57.0±11.3 sec, p< 0.001), INR (1.3±0.12 versus 2.3±0.9, p<0.001) and PLTs count (414.5±109.9 versus 533.6±98.7×10³/µL, p=0.002). Nevertheless, there were no significant differences between the hydroxyurea treated patients compared with healthy controls in the same parameters.

Omega-3 supplemented group and non-supplemented group had insignificant comparable levels of complete blood counts. However, a significant decrease was found when omega-3 supplemented group compared with healthy controls in Hb (7.56±1.62 versus 12.60±1.09 g/l, p< 0.001), HCT (22.9±4.7 versus 38.0±3.5 %, p< 0.001), RBCs count (2.8±0.7 versus 4.6±0.5×10^6/µL, p< 0.001) and increase in WBCs count (12.4±4.3 versus 6.3±1.3×10³/µL, p< 0.001). Moreover, there was no significant difference between the two groups for mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin (MCH) and mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC).

The healthy control subjects had a lower level of plasma D-dimer concentration than the n-3 fatty acid treated, HU-treated and un-treated patients, (p<0.001). The n-3 fatty acid treated group compared with the HU treated (Median =1.14 (Inter Quartile Range =0.74) µg/mL versus Median= 2.33 (IQR=3.17) µg/mL, (p<0.001)) and untreated (Median =1.14 (IQR=0.74) µg/mL versus Median= 1.75(IQR=1.16) µg/mL, (p<0.001)). Omega-3 treated patients had a lower plasma D-dimer level. Patients treated with HU had a higher levels of plasma D-dimer compared to HbSS untreated (p=0.002).

No significant differences foundin protein- C and protein S plasma levels between HbSS omega-3 fatty acids-treated and HbSS HU-treated patients.

The bulk of evidence demonstrates that (PT,PTT,INR and PLT) are reduced in omega-3 treated and hydroxyurea treated patients compared

with untreated HSS patients. Furthermore, the haematological parameters (Hb, HCT, RBC) do not vary significantly but still reduced in omega-3 treated, hydroxyurea treated and untreated HSS patients compared with healthy controls. Additionally, D-dimer is significantly reduced in omega-3 treated compared with untreated HSS patients but still increased compared with healthy controls.

المستخلص

أن حالات التخثر المزمنة هي واحدة من العوامل التي تسهم في أزمة انسداد الاوعية الدمويه العرضى التي تميز به مرض فقر الدم المنجلي. الأحماض الدهنية أوميغا-3 المستمدة من زيت السمك، مثل حمض ايكوسبا نتونك وحمض الدوكوساهيكسانويك، توفر عدد كبير من الفوائد الصحية التي تؤثر على تخثر الدم.

لتقييم تأثير المكملات على المدى الطويل مثل أحماض أوميغا-3 الدهنية على عوامل تخثر وتعداد الدم في المرضى الذين يعانون من مرض فقر الدم المنجلي المتماثل.

شملت هذه الدراسة البحثية 156 مشاركا وقسمت الى مجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين يتعاطون مكملات أوميغا-٣ لمدة سنتين كحالات (ن = 44)، ومجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين لا يتعاطون مكملات أوميغا-٣ كضوابط (ن =52)، ومجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين يتعالجون بالهيدروكسيوريا كحالات (ن = 8) ومجموعة الاصحاء الذين لا يعانون من فقر الدم المنجلى كضوابط (ن = 52) وتمت مطابقة الحالات والضوابط بالنسبة للعمر والجنس والعرق والخلفية الاجتماعية والاقتصادية. تم تقييم تجلط الدم وقياسات الدم باستخدام التحليل الآلي. وقد تم تحليل البيانات باستخدام برنامج الحزمة الإحصائية للعلوم الاجتماعية النسخة 19 واعتبرت القيمة الاحتمالية ذات دلالة احصائية اذا كانت اقل من .0.05

يتراوح عمر المشاركين في الدراسة 4-20سنة. اظهرت مجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين يتعاطون مكملات أوميغا-3 فوارق كبيرة ذات دلالة إحصائية في مستويات البلازما لزمن البروثرومبين مقارنة مع مجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين لا يتعاطون مكملات أوميغا -3 (17.2±1.8مقابل 31.3±11.1 ثانية، مع قيمة احتمالية <0.001) ومستويات البلازما لزمن الثرومبوبلاستين الجزئي (38.3 ± 4.2مقابل 57.0 ±11.3 ثانية، مع قيمة احتمالية <0.001)، ومستويات النسبة المعيارية الدولية (1.2± 0.14 مقابل2.3± 0.9%، مع قيمة احتمالية <0.001)، وعدد الصفائح الدموية (489.5±121.1 مقابل 533.6 ± 98.7 × 10^3 / ميكرولتر، مع قيمة احتمالية <0.031). ومع ذلك، لم يكن هناك فروق ذات دلالة إحصائية في مستويات البلازما بين مجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين يتعاطون مكملات أوميغا-3 مقارنة مع مجموعة الاصحاء في هذه الاختبارات.

اظهرت مجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين يتعالجون بالهيدروكسيوريا فوارق ذات دلالة إحصائية في مستويات البلازما لزمن البروثرومبين مقارنة مع مجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين لا يتعاطون مكملات أوميغا-٣ (18.5±1.8مقابل31.3±11.1 ثانية،

مع قيمة احتمالية <0.001)، ومستويات البلازما لزمن الثرومبوبلاستين الجزئي (42.8 ± 2.7 مقابل 57.0 ± 11.3 ثانية، مع قيمة احتمالية <0.001)، ومستويات النسبة المعيارية الدولية (1.3±0.12 مقابل 2.3±0.9 %، مع قيمة احتمالية <0.001) وعدد الصفائح الدموية (414.5 ± 109.9 مقابل 533.6 ± 98.7 × 10^3 / ميكرولتر، مع قيمة احتمالية <0.002). ومع ذلك، لم تكن هناك فروق ذات دلالة إحصائية بين مجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين يتعالجون بالهيدروكسيوريا مقارنة مع مجموعة الاصحاء في نفس الاختبارات.

اظهرت مجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين يتعاطون مكملات أوميغا-3 فوارق ليست ذات دلالة إحصائية مقارنة مع مجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين لا يتعاطون مكملات أوميغا-3 فى اختبارات صورة الدم الكاملة. ومع ذلك، تم العثور على فوارق ذات دلالة إحصائية عند مقارنة مجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين يتعاطون مكملات أوميغا -3 مع مجموعة الاصحاء في خضاب الدم (الهيموغلوبين) (7.56± 1.62مقابل 12.6± 1.09 جم / لتر، مع قيمة احتمالية <0.001)، وفى حجم الخلايا الحمراء المكدسة (22.9 ± 4.7 مقابل 38.0 ± 3.5%، مع قيمة احتمالية <0.001)،وتعداد خلايا الدم الحمراء (2.8±0.7 مقابل 4.6± 0.5 ×10^6 / ميكرولتر، مع قيمة احتمالية <0.001)، وعدد خلايا الدم البيضاء (12.4± 4.3 مقابل 6.3± 1.3 × 10^3 / ميكرولتر، مع قيمة احتمالية <0.001). وعلاوة على ذلك، لم يكن هناك فوارق ذات دلالة إحصائية بين المجموعتين فى متوسط حجم خلايا كريات الدم الحمراء وكمية الهيموغلوبين الوسطي الكرية ومتوسط تركيز الهيموغلوبين الوسطي للكرية.

مجموعة الاصحاء لديها انخفاض فى تركيز الدى دايمر فى البلازما اكثر من مجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين يتعاطون مكملات أوميغا -3 ومجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين لا يتعاطون مكملات أوميغا-3 ومجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين يتعالجون بالهيدروكسيوريا مع قيمة احتمالية <0.001) .مجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين يتعاطون مكملات أوميغا-3عند مقارنتها معمجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين يتعالجون بالهيدروكسيوريا نجد ان (الوسيط =1.14 (الانحراف الربيعى =0.74)) مقابل (الوسيط =2.33 (الانحراف الربيعى =3.17)) مايكروغ/مل (مع قيمة احتمالية <0.001) وعند مقارنتها معمجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين لا يتعاطون مكملات أوميغا-3 نجد ان (الوسيط =1.14 (الانحراف الربيعى =0.74)) مقابل (الوسيط =1.75 (الانحراف الربيعى =1.16))مايكروغ/مل (مع قيمة احتمالية <0.002) . مجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين يتعاطون مكملات أوميغا-3 لديها اقل مستوى

من الدى دايمر فى البلازما ومجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين يتعالجون بالهيدروكسيوريالديها اعلى مستوى من الدى دايمر فى البلازما عند مقارنتها مع مجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين لا يتعاطون مكملات أوميغا-3 .ولا توجد فروق ذات دلالة إحصائية فى مستويات البلازما لبروتين الاوتوبروثرومبين والبروتين اس وبين مجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين يتعالجون بالهيدروكسيوريا مقابل مجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين يتعاطون مكملات أوميغا-3.

الجزء الأكبر من الأدلة تثبت أن (زمن الثرومبين، زمن الثرومبوبلاستين الجزئى، مستويات النسبة المعيارية الدولية وعدد الصفائح الدموية في الدم) فى انخفاض في مجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين يتعاطون مكملات أوميغا-3 ومجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين يتعالجون بالهيدروكسيوريا مقارنة مع مجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين لا يتعاطون مكملات أوميغا -3. وعلاوة على ذلك، فإن قياسات الدم (الهيموغلوبين، حجم الخلايا الحمراء المكدسة، تعداد خلايا الدم الحمراء وعدد خلايا الدم البيضاء) لا توجد فيها فوارق ذات دلالة إحصائية بين المجموعات الثلاثة ولكن لا تزال هناك انخفاض في هذه الاختبارات بين مجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين يتعاطون مكملات أوميغا-3 ومجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين يتعالجون بالهيدروكسيوريا مقارنة مع مجموعة الاصحاء. بالإضافة إلى ذلك، مستوى الدى دايمر في انخفاض فى مجموعة مرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين يتعاطون مكملات أوميغا-3 مقارنة مع مجموعةمرضى فقر الدم المنجلي المتماثل الذين لا يتعاطون مكملات أوميغا-3 ولكن لا يزال مستوى الدى دايمر في زيادة عند مقارنته مع مجموعة الاصحاء.

TABLE OF CONTENTS

الآية		I
Dedication		II
Acknowledgements		III
Abstract (English)		IV
Abstract (Arabic)		VII
Tables of contents		X
List of tables		XIII
List of figures		XIV
Abbreviations		XV
Chapter One Introduction and Literature Review		
1.1	Haemoglobin	1
1.1.1	HbS structure	1
1.2	Sickle cell disease (SCD)	1
1.2.1	Clinical manifestation and complication of SCD	2
1.2.2	Genetics of SCD	3
1.2.3	Epidemiology of SCD	4
1.2.4	Pathphysiology of SCD	5
1.3	Role of platelet in vaso-occlusion and hyper coagulability in SCD	5
1.4	Blood cell membrane fatty acids and SCD	6
1.5	Biomedical importance of n-6 arachidonic acid	7
1.6	Biomedical importance of EPA and DHAn-3 fatty acids	7
1.7	Coagulation	7
1.7.1	Platelet activation	10
1.7.2	Tissue factor pathway (extrinsic)	10

1.7.3	Contact activation pathway (intrinsic)	11
1.7.4	Final common pathway	12
1.7.5	Coagulation cascade cofactors	12
1.7.6	Protein S	15
1.7.7	Protein C	16
1.7.8	D-dimer	17
1.7.8.1	Principles of D-dimer testing	19
1.8	Rationale	20
1.9	Objectives	21
1.9.1	General objective	21
1.9.2	Specific objective	21
1.10	Hypothesis	21
1.11	Null hypothesis	21
Chapter Two Materials and methods		
2.1	Study design	22
2.2	Study population	22
2.3	Inclusion criteria	22
2.4	Exclusion criteria	23
2.5	Sample size calculation	23
2.6	Data collection tools	23
2.7	Blood Sample collection	23
2.8	Biochemical measurements	24
2.9	Methodology	24
2.9.1	Complete blood counts	24
2.9.2	The Coagulometer	24

2.9.2.1	Prothrombin time (PT)	25
2.9.2.2	Activate partial thromboplastin time (APTT)	26
2.9.3	Protein C and S were measured by Elisa	27
2.9.4	IChroma Reader for estimation of D-Dimer	28
2.10	Data analysis and presentation	30
2.11	Ethical consideration	30
Chapter three Results		
3.1	Demographic data	31
3.2	Comparison of coagulation parameters in study groups	31
3.3	Comparison of blood count in study groups	32
3.4	Comparison of D-dimer level in study groups	33
3.5	Comparison of Protein-S level in study groups	33
3.6	Comparison of Protein-C level in study groups	34
Chapter four Discussion		
4.1	Discussion	41
4.2	Conclusion	47
4.3	Recommendation	47
References		48
Appendixes		59

List of Tables

3.1	Demographic characteristics of the patients and healthy controls	35
3.2	Comparison of coagulation parameters in study groups	36
3.3	Comparison of blood count in study groups	37

List of Figures

Figure 1.1	Blood coagulation pathways in vivo showing the central role played by thrombin	9
Figure 1.2	Coagulation with arrows for negative and positive feedback	14
Figure 1.3	Principles of D-dimer testing	18
Figure 3.1	Comparison of D-dimer level in study groups	38
Figure 3.2	Comparison of Protein-S level in study groups	39
Figure 3.3	Comparison of Protein-C level in study groups	40

Abbreviations

APTT	Activate partial thromboplastin time
APC	Activated protein C
AA	Arachidonic acid
DHA	Docosahexanoic acid
EPD	Eicosapentaeoic acid
FDP	Fibrin degradation product
GAG	Glutamate
GLA	Glutamate
HCT	Heamatochrit
H U	Hydroxy urea
INR	International normalized ratio
MCH	Mean corpuscular hemoglobin
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV	Mean corpuscular volume
NFKB	Nuclear factor – kappa B
PLT	Platelets
PT	Prothrombin time
RCT	Randomized control trial
RBCs	Red blood cells count
SCD	Sickle cell disease
SNP	Single nucleotide polymorphism
VKORC	Vitamin K epoxide reductase
VWF	von Willebrand's Factor
WBCs	White blood cells count