

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI



**ORAK HÜCRELİ ANEMİ HASTALARINDA GDF-15
EKSPRESYONUNUN POSTTRANSKRİPSİYONEL
REGÜLASYONUNDA miRNA' LARIN ROLÜ**

DOKTORA TEZİ
Çiğdem EL

Danışman
Prof. Dr. Abdullah ARPACI

HATAY-2023

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI

**ORAK HÜCRELİ ANEMİ HASTALARINDA GDF-15
EKSPRESYONUNUN POSTTRANSKRİPSİYONEL
REGÜLASYONUNDA miRNA' LARIN ROLÜ**

DOKTORA TEZİ
ÇİĞDEM EL

Danışman

Prof. Dr. Abdullah ARPACI

Bu tez, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından 21.D.014 NO lu BAP projesi olarak desteklenmiştir.

HATAY-2023

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI

**ORAK HÜCRELİ ANEMİ HASTALARINDA GDF-15
EKSPRESYONUNUN POSTTRANSKRİPSİYONEL
REGÜLASYONUNDA miRNA' LARIN ROLÜ**

Doktora Tezi
ÇİĞDEM EL

Bu tez, aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 03/08/2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavında oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri başkanı: Prof. Dr. Abdullah Arpacı

Üye: Prof. Dr. Yusuf Önlen

Üye: Prof. Dr. Sembol Yıldırım

Üye: Prof. Dr. Ali Erdiñç Yalın

Üye: Doç. Dr. Meral Urhan Küçük

Bu tez, Enstitümüz Moleküler Biyokimya ve Genetik (Tıp) Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Tarih

Prof. Dr. İbrahim Halil Çerçi
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tarifsiz özveri ve emekle hazırladığım doktora tezimin tattırdığı muazzam duyguları bu süreçte desteklerini hep yanıbaşında bulduğum hayatım boyunca vefa duyacağım çok kıymetlilerime teşekkür etme fırsatı olarak değerlendireceğim.

Öncelikle sürecin başından itibaren bana inanan, beni yüreklendiren, her fırsatta elinden gelenden fazlasını sunan, birçok alandaki mentorluğu ile danışman hoca statüsünü hakkıyla yerine getiren çok kıymetli hocam Prof. Dr. Sayın Abdullah ARPACI'ya teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Doktora süresince yardımlarını esirgemeyen, ciddi sabır ve emek gerektiren bu süreçte sınırsızca desteğini hissettiğim hocam Doç.Dr. Sayın Meral URHAN KÜÇÜK'e, Tezimin şekillenmesinde desteklerini esirgemeyen Tıbbi Biyoistatistik bölümünden Dr.Öğr.Üyesi Emre DİRİCAN'a, yoğun mesailerinden zaman ayırıp Tez izleme komitemde yer alarak kıymetli öneri ve görüşleri ile çalışmamın şekillenmesine katkı sağlayan jüri hocalarıma, Doktora eğitimi sürecimin başlangıcından itibaren her aşamada desteğini hissettiğim çok kıymetli ve çok başarılı meslektaşım Dr.Server BOZDOĞAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Hatay Eğitim ve Araştırma Hastanesi Talasemi Merkezi sorumlu hekimi Dr.Gönül OKTAY ve Çocuk hematolojisi ve onkolojisi Bölüm şefi Dr. Mustafa CEMALOĞLU ile değerli sağlık personellerine, HMKÜ Sağlık bilimleri Enstitüsünün değerli üyelerine eğitimime destek sağladıkları için ve ayrıca HMKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, Türk Pediatri Kurumu Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı' nca tezimin deneysel çalışmaları için gerekli olan malzemeleri temin edebilmem için sağlamış oldukları bütçe desteklerinden dolayı Türk Pediatri Kurumu Derneği' ne teşekkür ederim.

Akademik tüm deneyimleri ve dostluğu ile desteğini sürecin tamamında hissettiğim çok kıymetli meslektaşlarım Doç. Dr. Sn. Mehmet Emin ÇELİKKAYA ve Dr. Sn. Jülide OĞUZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamım süresince sabır, özveri ve sevgileriyle bugünlere gelebilmemin pelerinsiz kahramanları olan ailem.; annem Suat EL ve babam Galip EL'e, dayım Halim ÖZTAŞ ve kıymetli eşi Nesli ÖZTAŞ'a, ablam Nigar ULUCAY UÇARER'e, bana kardeşten çok öte olan Canan EL, Aysel EL, Selda ÖZTAŞ ve Sema ÖZTAŞ'a en kalbi duygularla şükranlarımı sunarım. Haklarını asla ödeyemeyeceğim...

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ÖZET	X
ABSTRACT.....	XIII
KISALTMALAR.....	VIII
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Hemoglobin	4
2.1.1. Hemoglobinin sentezi, yapısı ve fonksiyonları	4
2.1.2. Hem yapısı.....	8
2.1.3. Globin yapısı	8
2.2. Hemoglobinopatiler	9
2.2.1. Talasemiler	10
2.2.2. Orak Hücreli Anemi	11
2.3. MikroRNA(miRNA)	22
2.3.1. Eritrosit miRNA'ları ve orak hücre patogenezi.....	26
2.3.2. Plazma ve eksozomal miRNA'lar	27
2.4. İnefektif eritropoez ve OHA.....	28
2.5. GDF-15 ve Hepsidin.....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1 Giriş.....	35

3.2. Örneklerin Toplanması.....	35
3.3 Kullanılan Cihaz ve Kimyasal Malzemeler	35
3.4 Örneklerin çalışılması	37
3.4.1 Tam Kan Sayımı Ölçümü	37
3.4.2 Hemoglobin Varyant Analizi	38
3.4.2.1 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	38
3.4.3 Elisa yöntemi.....	38
3.4.4 RNA izolasyonu	40
3.4.5 cDNA elde edilmesi	41
3.4.6 miRNA analizi.....	42
3.4.7 Gen ekspresyon analizi.....	50
Reaksiyon Karışımını Birleştirme	51
Isı Döngüsü.....	48
4. BULGULAR.....	54
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ	75
7. KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	86

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hemoglobin yapısı (Saxena ve ark. 2017).....	5
Şekil 2.2: a. Hemoglobinin kristal yapısı. Sırasıyla gri ve ten renginde iki α zinciri ve β zinciri ile Hb'nin genel dörtlü yapısı. b. Oksijenli (R durumu) Hb'nin yapısı, oksijensiz (T durumu) Hb'nin (mavi) yapısı üzerine bindirilmiştir. T yapısındaki daha büyük merkezi su boşluğu dikkat çekici (Ahmed ve ark. 2020)	6
Şekil 2.3. Hb'nin oksijen denge eğrisi. Normal P50 değeri kesikli çizgilerle gösterilir. Eğrilerdeki sola kaydırma ve sağa kaydırma sırasıyla kırmızı ve mavi renktedir (Ahmed ve ark. 2020).....	7
Şekil 2.4. Globin gen ailesi (Clark ve Thein 2004)	8
Şekil 2.5. Globin zincir sentezinin evreleri ve sentez bölgeleri (Thompson ve ark. 1991, Genç 2005)	9
Şekil 2.6: Hemoglobinopatilerin Türkiye ve dünyadaki dağılımı (Altan 2019).....	12
Şekil 2.7. Deoksijene HbS ve orak şeklini almış eritrosit (İnal ve Arpacı 2021).....	13
Şekil 2.8. Kan dokusunda görülen orak hücre şekillerine örnekler (Albayrak ve ark. 2018).....	14
Şekil 2.9. OHA'nın patofizyolojisi (İnal ve Arpacı 2021)	14
Şekil 2.10. Hemoglobinopati tanısında algoritma (Old 2007).....	19
Şekil 2.11. miRNA biogenezi (Joshi ve ark. 2011).....	25
Şekil 2.12. β -talasemi ve orak hücre hastalığında mikroRNA ekspresyonunun disregülasyonu. Bu miR'lerin up-down regülasyonuna göre eritrosit kaderi belirlenir. Bunlardan bazıları, bu soyun farklılaşması sırasında ekspresyonu artan mir-451 gibi eritrositlere özgü mikroRNA'lardır (Saki ve ark. 2016).	27
Şekil 2.13. Şematize bir hepatositte gösterilen, hepsidin ekspresyonuna yol açan çeşitli yolaklar (Bartnikas ve Fleming 2010)	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasallar.....	36
Çizelge 3.2.Cihazlar ve ticari isimleri	37
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan ticari kitler.....	37
Çizelge 4.1. Çalışma gruplarının demografik verilerinin karşılaştırılması.....	54
Çizelge 4.2. Çalışma grupları arasında hemogram ve HbF değerlerinin karşılaştırılması.....	54
Çizelge 4.3. Çalışma grupları arasında ferritin değerlerinin karşılaştırılması	55
Çizelge 4.4. Çalışma grupları arasında HGB ve ferritin düzeylerinin korelasyonunun karşılaştırılması.....	55
Çizelge 4.5. Çalışma grupları arasında CRP değerlerinin karşılaştırılması.....	36
Çizelge 4.6. Çalışma grupları arasında hepsidin ve GDF-15 protein ve gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	37
Çizelge 4.7. Çalışma grupları arasında GDF-15 ve Hepsidin protein düzeylerinin korelasyonunun karşılaştırılması.	37
Çizelge 4.8. Çalışma grupları arasında GDF-15 ve Hepsidin protein düzeylerinin ferritin düzeyleri ile korelasyonunun karşılaştırılması	54
Çizelge 4.9. Çalışma grupları arasında miRNA düzeylerinin karşılaştırılması	38

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

RNA	:Ribo nükleik asit
Hsa-miRNA	:Homosapiens mikro ribonükleik asit
DNA	:Deoksiribo nükleik asit
cDNA	:Tamamlayıcı DNA
HPLC	:Yüksek basınçlı sıvı kromatografi (high performance liquid chromatography)
MCV	:Mean corpuscular volume (Ortalama eritrosit hacmi)
mg/dL	:miligram/desilitre
MR	:Manyetik Rezonans
ng/mL	:Nanogram/mililitre
RBC	:Kırmızı kan hücresi
RDW	:Eritrosit dağılım hacmi
GDF-15	:Growth differensiasyon faktörü 15
ROS	:Reaktif oksijen türleri
WBC	:Lökosit sayısı
OHA	:Orak Hücreli anemi
O ₂	:Oksijen
CO ₂	:Karbondioksit
2,3DPG	:2,3-difosfogliserat
HGB	:Hemoglobin
HBP	:Hemoglobinopati
HbS	: Hemoglobin S (Orak formu)
HbF	: Hemoglobin F (Fetal hemoglobin)
NO	:Nitrik oksite
VOC	:Vazooklusiv kriz
ACS	:Akut göğüs Sendromu

PHTN	:Pulmoner Hipertansiyon
CVA	:Serebrovasküler patoloji
SCI	:Serebral enfarktüsler
PE	:Pulmoner Emboli
CBC	:Tam kan sayımı
TCD	:Transkraniyal Doppler
PCA	:Hasta kontrollü analjezi
İYE	:İdrar yolu enfeksiyonu
ncRNA	:non-coding RNA
rRNA	:ribozomal RNA
tRNA	:transfer RNA
snoRNP	:küçük nükleolar ribonükleoprotein
lncRNA	:uzun kodlamayan RNA
3'-UTR	:3'-untranslated region
MRE	:miRNA recognition element
TFR1	:transferrin reseptörü 1
NRF2	:nükleer faktör eritroid-2
EC	:Endotelyal hücre
BMP6	:Kemik morfogenetik protein 6
SMAD	:Small mothers against decapentaplegic
HJV	:Hemojuvelin
STAT3	:Signal transducers and activators of transcription 3
EtOH	:Etanol
HU	:Hidroksiüre

ÖZET

ORAK HÜCRELİ ANEMİ HASTALARINDA GDF-15 EKSPRESYONUNUN POSTTRANSKRİPSİYONEL REGÜLASYONUNDA miRNA' LARIN ROLÜ

Bu çalışmada orak hücreli anemili hastalarda hepsidinin ekspresyonunu baskılayarak demir birikimine katkıda bulunabilen GDF-15'in artmış ekspresyonunu aydınlayabilecek moleküler olaylardan GDF-15'in posttranskripsiyonel regülasyonunda miRNA'ların rolü araştırılmıştır.

Çalışmamızda yaş ve cinsiyet açısından benzer 33 orak hücreli anemi hastası ile 30 sağlıklı kontrol grubu arasında tam kan sayımı parametreleri, HbF, ferritin düzeyleri ayrıca GDF-15 ve hepsidinin protein ve gen ekspresyon düzeyleri ile çoklu miRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır.

Tüm grup-1 ve grup-2 hastalarından onam aldıktan sonra toplam iki (2) tüp venöz kan örnekleri alınıp EDTA'lı tüplere konuldu. Tüplerden birinden tam kan sayımı ve HPLC ile hemoglobin tiplendirilmesi yapıldı. İkincisinden RNA izolasyonu yapılarak cDNA elde edildi. Bu cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak miRNA ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemi ile saptanmıştır.

Tam kan sayımı parametreleri ve HbF seviyeleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulundu ($p<0,001$). Ferritin düzeyleri hasta grubunda daha yüksekti($p<0,001$). CRP düzeyleri her iki grup da normal aralıktaydı ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi. Hepsidin protein düzeyi kontrol grubunda daha yüksekti ($p<0,001$). Hepsidin gen ekspresyon düzeyi hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla daha düşüktü($p=0,021$). GDF-15 protein düzeyi hasta grubunda anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü. GDF-15 gen ekspresyon düzeyi hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla daha yüksekti ($p=0,023$). Hasta grubunda GDF-15 ile hepsidin protein düzeyleri arasında negatif ($p=0,002$, $r:-0,641$), GDF-15 protein düzeyi ile Ferritin düzeyi arasında pozitif ($p=0,001$, $r:0,602$), hepsidin protein düzeyi ile ferritin düzeyi arasında negatif korelasyon gözlendi ($p=0,001$, $r:-0,628$). Karşılaştırdığımız miRNA'lerden 10 (hsa-miR-144-3p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-210-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-20a-5p, hsa-let-

7b-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-let-7i-5p) tanesinin OHA'li hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük eksprese olduğu ($p<0,005$) ve bir tanesinin de (hsa-miR-125b-5p) daha fazla eksprese olduğu gözlemlendi ($p<0.001$).

Bu veriler bize; OHA'li hastalarda düşük eksprese edilen miRNA'ların bu hastalarda GDF-15'in postranskripsiyonel olarak daha fazla translase olmasına bu yolla düşük hepsidin düzeylerine dolayısıyla artmış demir yüküne sebep olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler: Orak hücreli anemi, GDF-15, miRNA, Hepsidin



ABSTRACT

ROLE OF miRNAs IN POSTTRANSCRIPTIONAL REGULATION OF GDF-15 EXPRESSION IN SICKLE CELL ANEMIA PATIENTS

In this study, we investigated the role of miRNAs in the posttranscriptional regulation of GDF-15, one of the molecular events that may elucidate the increased expression of GDF-15, which may contribute to iron accumulation by suppressing hepcidine expression in patients with sickle cell anaemia.

In our study, complete blood count parameters, HbF, ferritin levels, protein and gene expression levels of GDF-15 and hepcidin, and multiple miRNA expression levels were compared age- and sex-matched between 33 sickle cell anaemia patients and 30 healthy control groups.

After obtaining consent from all group-1 and group-2 patients, a total of two (2) tubes of venous blood samples were collected and placed in EDTA tubes. Complete blood count and haemoglobin typing by HPLC were performed from one of the tubes. RNA was isolated from the second tube and cDNA was obtained. Using these cDNAs as moulds, miRNA expression levels were determined by RT-PCR method.

Complete blood count parameters and HbF levels were found to be statistically significantly different between the groups ($p < 0,001$). Ferritin levels were higher in the patient group ($p < 0,001$). CRP levels were in the normal range in both groups and no statistically significant difference was observed. Hepcidin protein level was higher in the control group ($p < 0,001$). Hepcidin gene expression level was lower in the patient group compared to the control group ($p = 0,021$). GDF-15 protein level was significantly higher in the patient group. GDF-15 gene expression level was higher in the patient group compared to the control group ($p = 0,023$). In the patient group, negative correlation was observed between GDF-15 and hepcidin protein levels ($p = 0,002$, $r = -0,641$), positive correlation between GDF-15 protein level and ferritin level ($p = 0,001$, $r = 0,602$), negative correlation between hepcidin protein level and ferritin level ($p = 0,001$, $r = -0,628$). It was observed that 10

of the miRNAs (hsa-miR-144-3p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-210-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-20a-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-let-7i-5p) we compared were expressed lower and 1 of the miRNAs de (hsa-miR-125b-5p) was expressed higher in patients with OHA compared to the healthy control group($p<0.001$).

These data suggest that miRNAs that are under-expressed in patients with OHA may cause GDF-15 to be translated posttranscriptionally more in these patients, thus leading to low hepcidin levels and thus increased iron load.

Keywords: Sickle Cell Anemia, GDF-15, miRNA, Hepcidin



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Proteinlerin sentezlenmesi canlılığın devamının merkezinde rol oynamaktadır. İnsan organizmasının genomunda yer alan protein sentezinde görevli kodlayıcı genleri regüle eden mikro RNA (miRNA) adı verilen küçük nükleotid dizilerinin önemli görevleri vardır. miRNA lar insan genomunda yer alan ancak proteinlerin kodlanma bölgesindeki RNA genleri yanısıra protein kodlamasının gerçekleştiği ekzon ya da intron bölgelerinden transkripte edilen fakat translase edilmeyen, fonksiyonel açıdan gen ekspresyonu regülasyonunda görev alan ortalama 22 nükleotitten meydana gelen ve tek sarmallı işlevsel RNA molekülleridir (Byon ve Papayannopoulou 2012, Zhang ve ark. 2012). miRNA'lar, proliferasyon, hücresel büyüme, farklılaşma, apoptoz, yaşlanma, immünite ve metabolizma gibi birçok işlevi denetlerler. miRNA; hedef mRNA'ya bağlanarak, ilgili genin transkripsiyon sonrası fonksiyonlarının dolayısıyla da genetik aktivitesinin durdurulmasını sağlar. Eritroid öncül hücrelerin olgunlaşması, proliferasyonu, enekülasyonu ve fetal γ -globin genlerinin ekspresyonunda etkili miR'ler tanımlanmıştır. MiR-15a, miR-126, miR-16-1, miR-144, miR-210 ve miR-451 tanımlanan eritrosite spesifik miRNA olarak bildirilmektedir (Bianchi ve ark. 2012, Byon ve Papayannopoulou 2012, Kim ve ark. 2015). Karaciğerden salgılanan küçük bir protein olan Hepsidin; demir emiliminin ve dokulara taşınmasının ana düzenleyicisi olarak rol oynar. Plazma demir seviyesi ve eritropoetik aktivite, hepsidin seviyesini düzenler. Demir seviyesindeki artış hepsidin üretimini artırır. Yüksek hepsidin seviyesi diyetle alınan demir emilimini ve hücre içinde demir kullanımını azaltır; bu nedenle hepsidin dokularda demir birikimini engeller. Yüksek eritropoetik aktivite, hepsidini baskılar (Nemeth ve Ganz 2009, Subha Palaneeswari ve ark. 2013, Arezes ve Nemeth 2015). Hepsidin transkripsiyonu, artmış eritropoetik aktivite ve anemi durumunda baskılanırken, aşırı demir yükü durumunda indüklenir (Subha Palaneeswari ve ark. 2013, Chang ve ark. 2019). Olgun eritroblastlardan eksprese edilen multifaktöryel bir sitokin olan GDF-15 (Growth differentiation factor) 'hepsidin baskılama faktörü' olarak tanımlanmaktadır. İnefektif eritropoezin görüldüğü hemoglobinopati durumlarında GDF-15 ekspresyonu arttığı yayınlanmıştır. Bu artış hepsidin ekspresyonunu baskılayarak demir emilimini artmasına ve dokularda aşırı demir yüklenmesine katkıda bulunur. Hücresel stres, hasar ve apoptoz ile ilişkili olan GDF-15' in yüksek gen ekspresyonu inefektif eritropoez ile ilişkilidir. Literatürde, inefektif eritropoezin olduğu orak hücreli anemi de GDF-15'in

hepsidin salınımı düzenlemesindeki rolünü gösteren az sayıda çalışma vardır (Chang ve ark. 2019). GDF-15 hemoglobinopatilerde hepsidin düzenlenmesinde etkilidir ve GDF-15' in artmış ekspresyonu hepsidin ekspresyonunu inhibe ederek hemoglobinopati sendromlarında demir birikimine katkıda bulunabilir (Tanno ve ark. 2010). Ayrıca az transfüzyon alan hastalardaki demir birikimi de yüksek GDF-15' in hepsidin ekspresyonunu uygunsuz baskılamasından kaynaklanabilir (Mariani ve ark. 2009). Ülkemizin yanı sıra tüm dünyada hem gözlenme sıklığı hem de taşıyıcılık oranı yüksek düzeyde olan hemoglobinopatiler aynı zamanda en sık görülen tek gen bozukluklarıdır. Bunlar içinde otozomal resesif kalıtılan Orak Hücreli Anemi, hemoglobin molekülü içindeki proteininin hasarlı üretimi neticesinde meydana gelen, kronik hemolitik anemi ile karakterize kalıtsal bir çeşit kan hastalığıdır (Williams ve Thein 2018). Orak şeklini alan eritrositlerin ömürleri kısalmış olup dalak tarafından normal kan hücrelerine kıyasla daha hızlı yıkılırlar. OHA hastalarında eritrositlerin normalden daha kısa ömre sahip olmasının sebebi budur ve bu durum hemolitik krizinin ciddiyetiyle doğrudan ilişkilidir. OHA' de uygulanan tekrarlayan kan transfüzyonları, hasta bireylerin doku ve organlarında demir birikimine bağlı olarak organ hasarlarına ve fonksiyon bozukluklarına yol açmaktadır. Aşırı demir birikimi OHA'li hastalarda görülen organ hasarları ve yetmezliklerinin başlıca nedenini oluşturmaktadır (Jiang 2020, Sun ve ark. 2020). Demir, oksijen taşınması, hücresel enerji metabolizması, enzimlerin bir bileşeni olarak ve birçok enzimatik reaksiyon için gerekli bir mikro besindir (Toxqui ve ark. 2010). Demir fazlalığı ve demir eksikliği patolojik durumlarla ilişkilidir. Bir yandan Demir eksikliği anemisi, dünya nüfusunun dörtte birini etkileyen en yaygın beslenme bozukluğu iken diğer yandan aşırı demir yükünün organ hasarından ciddi komplikasyonlara yol açtığı durumlar vardır. En sık olarak kronik hemolitik anemiye bağlı tekrarlayan tansfüzyonların gerektiği hemoglobinopatilerde görülen transfüzyonel demir yüklenmesi karşımıza çıkar. Toksik serbest radikaller oluşturan reaksiyonları katalize etmesi nedeniyle demir metabolizması posttranskripsiyonel seviyede demir düzenleyici proteinler tarafından sıkı kontrol altında tutulur (Wang ve Babitt 2019). Demir yüklenmesi hemolitik anemili hastalarda morbidite ve mortalitenin nedenlerinden biridir. Aşırı demir yükü, özellikle inefektif eritropoezli kronik hemolitik anemi ile karakterize kalıtsal kan hastalığı olan orak hücreli aenmi (OHA) olmak üzere tekrarlayan kan transfüzyonunun gerektiği hemolitik hastalıkların tedavisinde temel bir sorundur. Hepsidin, demir metabolizmasının düzenlenmesinde anahtar rol oynar. Anemiye yanıt olarak artan eritropoietin sekresyonu,

demir metabolizmasının eritropoez kaynaklı bir düzenleyicisi olan büyüme farklılaşma faktörü 15 sekresyonunu indükler ve GDF-15 de hücrel demir depolarından (karaciğer, dalak) demir mobilizasyonun ve demirin emilimini artırmak için demir düzenleyici hepsidin sekresyonunu inhibe ederek baskılar. Bu mekanizmada GDF-15'in aşırı ekspresyonu hemolitik anemilerde aşırı demir yüklenmesine katkıda bulunabilir (Kautz ve ark. 2014, Arezes ve ark. 2018).

Orak Hücreli Anemi (OHA) hastalarında posttranskripsiyonel yolak üzerinden hepsidin gen ekspresyonunu engelleyen miRNA'ların tespiti hem hepsidin moleküler düzenlenmesinin aydınlatılmasına katkı sağlayabilir hem de aşırı demir yükünün bir göstergesi olabileceğinden yeni tedavi yaklaşımlarına öncülük edebilir. Ayrıca; antihepsidin etkili GDF-15' in ilişkili olabileceği miRNA ların tespit edilmesi orak hücre hastalığında tekrarlayan hemolitik kriz ve tranfüzyona bağlı komplikasyonların yönetiminde aşırı demir yükünü saptamak ve hastaların şelatör kullanımını değerlendirmek için kullanılacak bir tanısal belirteç olabilir. Bu çalışmada; OHA hastalarında GDF-15 ekspresyonunun düzenlenmesinde miRNA' ların rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hemoglobin

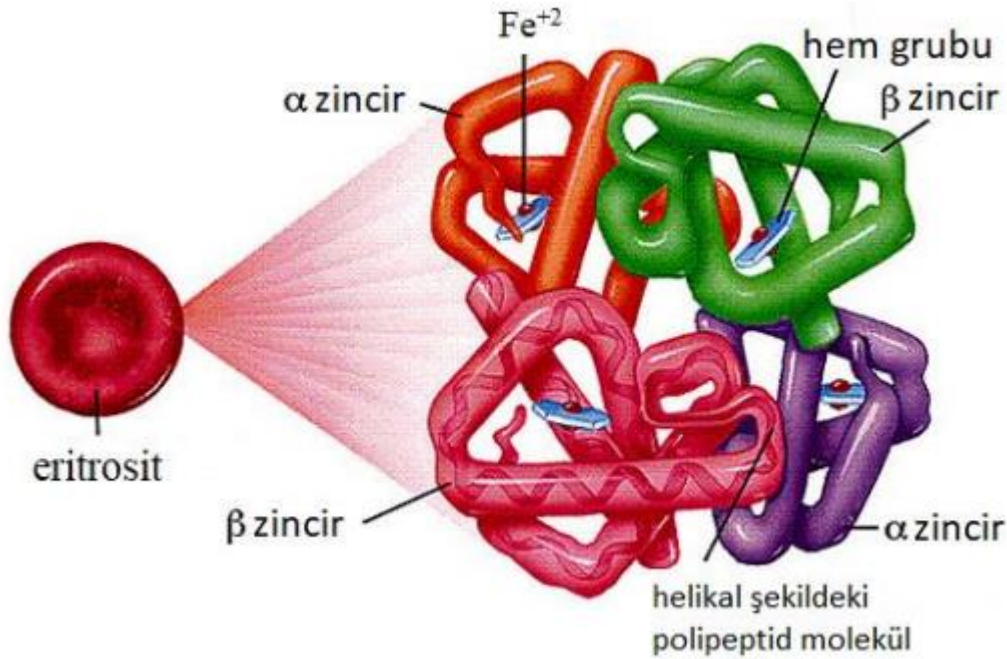
Hemoglobin (Hb), her biri demir taşıyan bir hem prostetik grubuna bağlı, protein yapıdaki alfa ve beta globin alt birimlerinden oluşur. Heterotetramer yapıdaki Hb'nin yapısında 4 adet hem molekülü ve 4 adet globin molekülü bulunur (Gell 2018).

2.1.1. Hemoglobinin sentezi, yapısı ve fonksiyonları

Hb'nin başlıca işlevleri oksijeni (O_2) akciğerlerden periferik dokulara ve karbondioksiti (CO_2) dokulardan akciğerlere taşımaktır. Hb- O_2 bağlanma ve ayrılma kinetiği, oldukça hassas ayarlıdır ve metabolik bozukluklara göre adapte olabilen biyokimyasal reaksiyonlarla düzenlenir. Nitekim hücresel hasara sebep olabilen demir ve serbest O_2 'nin neden olduğu reaktif O_2^- moleküllerinin üretimini de sınırlandırır (Champe ve ark. 1997, Gell 2018). HGB yapısının bu kritik işlevleri nasıl yaptığını anlama çabaları 50 yılı aşkın süredir devam etmektedir. Bu nedenle HGB dizilenecek ilk proteinlerden biriydi ve globin genleri de klonlanacak ilk genler arasındaydı. 1950'lerin sonlarında, Perutz ve arkadaşları X-ışını kristalografisi yoluyla HGB'nin üç boyutlu yapısını belirlediler. Güncel çalışmalar, bu yapıyı yüksek çözünürlükte rafine etti. Globin polipeptitleri, sırasıyla insan kromozomları 16 ve 11 üzerinde bulunan ayrı alfa ve beta globin gen kümelerinden sentezlenir (Thom ve ark. 2013). Yeni oluşan globin zincirleri, doğal katlanmalarını A-H adlı yedi veya sekiz alfa sarmalından oluşan ve küresel bir yapı halinde katlanan HGB alt birimlerine stabilize eden heme'yi hızla birleştirir. HGB alt birimleri, O_2 'yi ve diğer ligandları, HbA tetramerlerinin dışına bakan, evrimsel olarak korunmuş bir hidrofobik cep içinde gömülü hem demiri yoluyla bağlar. Heme demiri, "proksimal" histidin olarak adlandırılan değişmez bir histidin kalıntısı tarafından globin proteinlerine aksiyal olarak koordine edilir. O_2 ile bağlanmış karşı aksiyel pozisyon, helix içerisinde distal histidine ile etkileşerek stabilize hale gelir. Globin proteinleri içindeki multipl aminoasitler, non kovalent etkileşimler yoluyla hem yapısının bağlanmasını stabilize ederler. Hb'nin O_2 'yi bağlayabilmesi için demirin indirgenmiş (ferröz, Fe^{2+}) durumunda olması gerekir. Oksitlenmiş HGB (ferrik, Fe^{3+}) O_2 'yi bağlayamaz ve nispeten unstabildir ve böylece denatüre olmaya eğilimlidir. Eritrositler, çeşitli mekanizmalar ile Hb'yi indirgenmiş

durumunda tutmaya çalışırlar. Örneğin, methemoglobin redüktaz sistemi methemoglobini (metHb) indirgenmiş formuna dönüştürür (Thom ve 2013, Voskou ve ark. 2015, Ghosh ve ark. 2020).

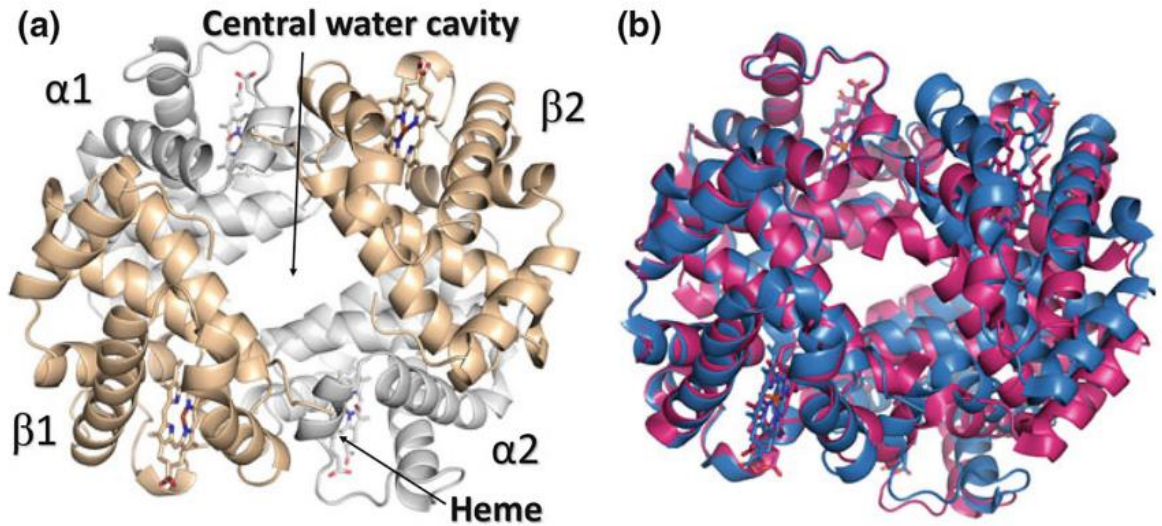
Şaşırtıcı olmayan bir şekilde, ligand cebi içindeki aminoasitleri değiştiren globin mutasyonları, sıklıkla, destabilizasyon, O₂ için afinitenin değişmesi ve artmış metHb oluşumu ile heme kaybı oranları dâhil olmak üzere güçlü fonksiyonel etkiler üretir. Hb, kendine özgü rengini hem grubundan aldığından dolayı hem çevreleyen aminoasitlerdeki, farklı gaz ligandlarındaki veya redoks durumundaki değişiklikler de dâhil olmak üzere hem demirin çevresini etkileyen değişiklikler, görünür ışık absorpsiyonunda hemoglobinde karakteristik değişiklikler üretir. Bu renk değişiklikleri klinik olarak Hb-O₂ doygunluğunu, metHb oluşumunu ve HGB varyantlarının etkilerini değerlendirmek için kullanılır. HGB tetramer içinde, her globin alt birimi, farklı zinciri alfa1beta1 ve alfa2beta2 olarak adlandırılan iki farklı arayüz aracılığıyla bağlar (Şekil 2.1) (Saxena ve ark. 2017)



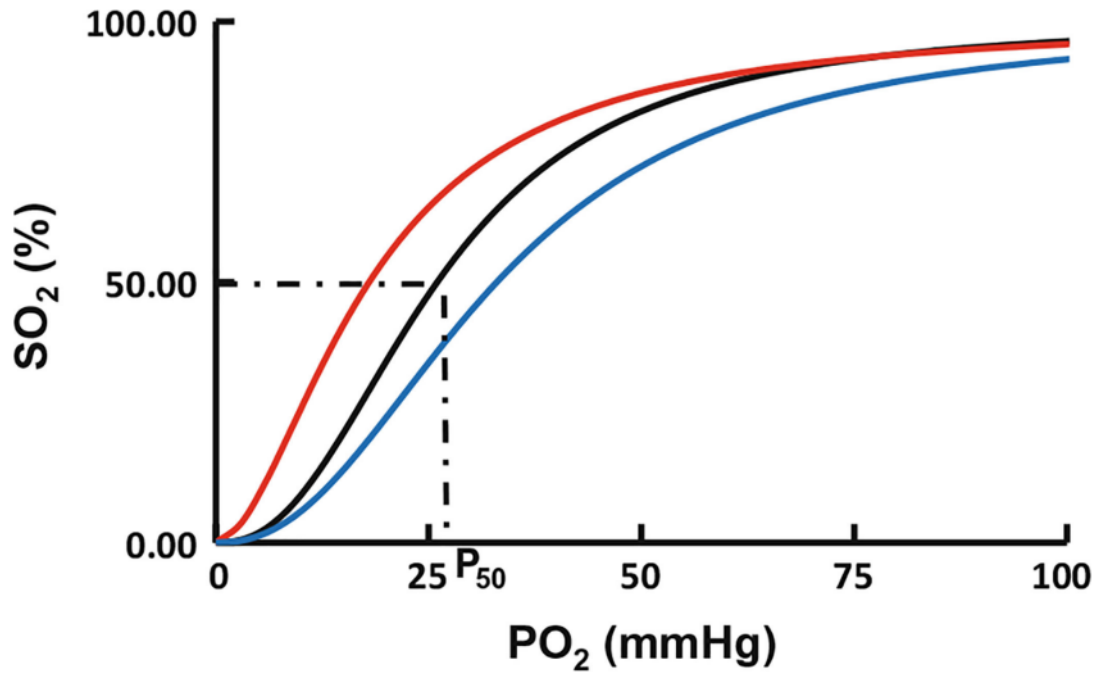
Şekil 2.1. Hemoglobin yapısı (Saxena ve ark. 2017)

Bireysel globin alt birimleri, son derece yüksek afiniteli alfa1beta1 etkileşimi yoluyla dimerler oluşturur. Globin zincir monomerleri, eritrositlere zarar veren ve hemolitik anemiye neden olan hücre içi çökeltiler oluşturma eğilimi ile dimerlere kıyasla nispeten kararsızdır.

Bu nedenle, $\alpha\beta 1$ etkileşimini bozan mutasyonlar, monomerik alt birimlerin birikmesini destekleyerek eritrotoksisiteye neden olabilir. Düşük afiniteli $\alpha\beta 2$ etkileşimi tetramerizasyona aracılık eder. Oksijen bağlanması, $\alpha\beta 2$ etkileşimini kararsız hale getirir ve kuaterner yapının “T”den (gergin, düşük afiniteli, oksijensiz) “R” (gevşemiş, yüksek afiniteli, oksijenli) durumuna geçişi ile sonuçlanır, bu da O_2 ’nin ek alt birimlere bağlanmasını kolaylaştırır (Aksoy ve ark. 1958, Beutler 2006, Mangla ve ark. 2021). (Şekil 2.2). Bu süreç, Hb- O_2 denge eğrisinin karakteristik sigmoidal şekli ile gösterilen kooperasyonuna dayalı O_2 bağlanmasına neden olur (Şekil 2.3). Bu işbirliği, O_2 gerilimindeki nispeten küçük düşüşler üzerinden maksimum O_2 salınımına izin verir. $\alpha\beta 2$ etkileşim bölgesi içindeki mutasyonlar, esas olarak O_2 -bağlanma özelliklerini bozarak Hb’nin fonksiyonel özelliklerini değiştirebilir. İşbirliği, allosterik düzenleme olarak adlandırılan genel bir fenomeni temsil eder; burada efektör moleküller, aktif bölgelerden farklı bölgelere bağlanarak enzimlerin veya diğer proteinlerin özelliklerini kontrol eder. O_2 ’ye ek olarak birkaç allosterik düzenleyici, Hb’nin özelliklerini etkiler. Örneğin Hidrojen, Bohr etkisi olarak adlandırılan bir süreçte O_2 salınımını desteklemek için Hb’ye bağlanır. Periferik dokularda bol miktarda CO_2 kırmızı kan hücreleri tarafından alınır ve karbonik anhidraz tarafından karbonik aside metabolize edilir, bu da Hidrojen üretimi ve bunun sonucunda O_2 salınımı ile sonuçlanır (Serjeant 2001, Yüksel 2014).



Şekil 2.2. a. Hemoglobinin kristal yapısı. Sırasıyla gri ve ten renginde iki α zinciri ve β zinciri ile Hb’nin genel dörtlü yapısı. **b.** Oksijenli (R durumu) Hb’nin yapısı, oksijensiz (T durumu) Hb’nin (mavi) yapısı üzerine bindirilmiştir. T yapısındaki daha büyük merkezi su boşluğu dikkat çekici (Ahmed ve ark. 2020)



Şekil 2.3. Hb'nin oksijen denge eğrisi. Normal P50 değeri kesikli çizgilerle gösterilir. Eğrilerdeki sola kaydırma ve sağa kaydırma sırasıyla kırmızı ve mavi renktedir (Ahmed ve ark. 2020)

Buna karşılık, akciğerdeki nispeten düşük CO₂ ve yüksek pH, Hb'e O₂ bağlanmasını destekler. Ek olarak, CO₂, hem alfa hem de beta globinlerinin amino uçlarıyla karbamino eklentileri oluşturur. Bu etkileşimler, CO₂'nin pH üzerindeki etkisine kıyasla tam kan O₂ afinitesi üzerinde küçük etkiler üretir. Glikolizin bir yan ürünü olarak oluşturulan ve kırmızı kan hücrelerinde nispeten yüksek konsantrasyonlarda bulunan 2,3-difosfoglisarat (2,3DPG) bileşiği, Hb'nin bir başka önemli allosterik düzenleyicisidir. Hidrojen ve 2,3 DPG için hemoglobin bağlama bölgeleri tanımlanmıştır. 2,3 DPG, O₂ salınımını kolaylaştırmak için Hb'nin T formunu bağlar ve stabilize eder. Bu etkileşimler, Hb'nin metabolik aktiviteyi algılamasını ve buna göre O₂ bağlanmasını düzenlemesini sağlar. Bu fonksiyon, Hb'nin allosterik düzenleyicilerine afinitesini etkileyen mutasyonlar tarafından değiştirilebilir (Frenette ve Atweh 2007, Porter 2009, Torkildson ve Agrawal 2012).

En yüksek oranda eritrositlerin yapısının içinde yer alan ve oksijene yüksek afinitesi bulunan HGB molekülü, akciğerlerden dokulara oksijen taşımalarının yanısıra dokulardan da akciğere karbondioksit taşımaktadır. Bir hemoglobin molekülü 64.500 dalton ağırlığındadır (Gell 2018). Globuler bir protein yapısında olup dört alt ünitelerden meydana gelir. Her bir alt

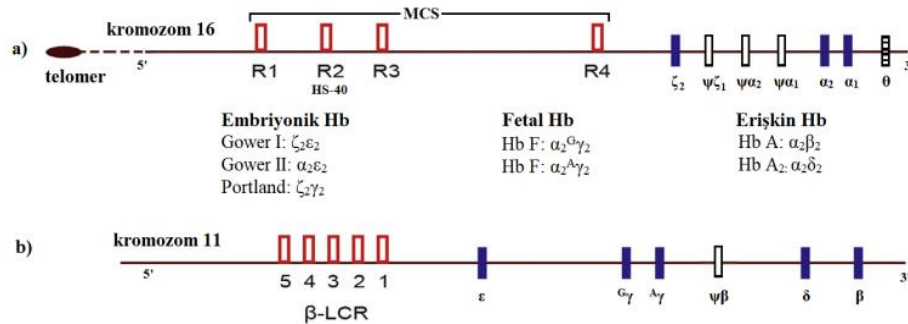
ünite ‘hem’ adı verilen bir prostetik grup ve bu gruba bağlanmış ‘globin’ adı verilen bir polipeptid zincirden oluşmaktadır (Champe ve ark.1997, Gell 2018).

2.1.2. Hem yapısı

Hemoglobinin yapısında mevcut olan her bir globin polipeptit zincirine bir hem denilen prostetik grup bağlanır. Hem yapısı, oksijenin hemoglobine bağlanmasını sağlamasının yanısıra kana da kırmızı rengini vermektedir. Hem grubu, protoporfirin halkalarından meydana gelmektedir ve demir atomunu ferröz (Fe^{+2}) şeklinde taşımaktadır. Hem ve globin zincirleri farklı yollarla sentezlenip birleşerek hemoglobin molekülü oluşmaktadır (Thom ve ark. 2013).

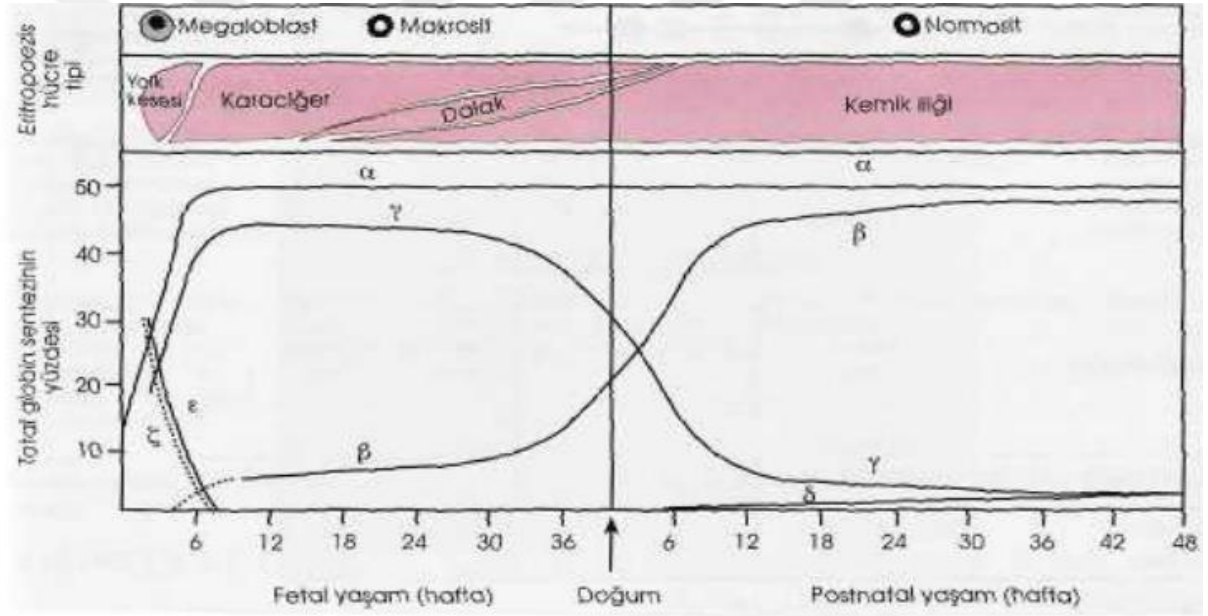
2.1.3. Globin yapısı

Globin yapısında; birbirinden farklı polipeptid zincirler (alfa, beta, gamma, delta, epsilon ve zeta) tanımlanmıştır. Bu zincirlerin sentezi 11. ve 16. kromozomlar tarafından sağlanır. Zeta ve alfa polipeptid zincirlerinin üretilmesinden sorumlu olan genler 16. kromozomda yer alırken epsilon, gamma, delta ve beta-globin polipeptid genleri 11. kromozomda yer alırlar (Thom ve 2013). Erken embriyolojik dönem haricinde alfa zincir mutlaka globin yapısında yer alır. Erişkin hemoglobininin tamamına yakınına meydana getiren HbA, 4 globin (iki alfa ve iki beta ($\alpha_2\beta_2$)) zincirinden meydana gelir. HbA2 ise minör erişkin hemoglobini olup; ikisi alfa ve ikisi de delta ($\alpha_2\delta_2$) polipeptid zincirinden oluşur. HbF ise fetal hemoglobin olup ikisi alfa ve ikisi gamma ($\alpha_2\gamma_2$) zincirinden oluşur. 20. gebelik haftasına kadar embriyonik dönemdeki hemoglobinler HGB Portland ($\zeta_2\gamma_2$), HGB Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$) ve HGB Gower II ($\alpha_2\varepsilon_2$)’dir. Daha sonra eritropoez karaciğerde yapılmaya başlanır ve böylece fetal eritrositler ortaya çıkar (Şekil 2.4) (Huisman 1976).



Şekil 2.4. Globin gen ailesi (Clark ve Thein 2004)

Eritrositler içerisindeki hemoglobin kompozisyonları, gebeliğin dönemlerine göre farklılık gösterir. Bu farklılıklar alfa ve beta globin zincirlerinin gen kümelerinde meydana gelen çeşitli aktivasyon ve inaktivasyon ile ilişkilidir. Globin zincir genlerinin transkripsiyonları aşamasındaki mekanizma henüz tam anlamıyla anlaşılamamıştır. Gebelik döneminin erken safhalarında HbPortland ($\zeta\gamma_2$), HbGower I ($\zeta_2\varepsilon_2$) ve HbGower II ($\alpha_2\varepsilon_2$) ağırlıklı olan embriyonik hemoglobinlerdir. Fakat eser miktarda HbA ve HbF vardır. 10-11. Gebelik haftalarında dalakta ve karaciğerde eritropoezin başlamasıyla embriyonik hemoglobinler kademeli olarak azalır ve tamamen kaybolur ve HbF yapımı başlar. HbF miktarı doğum sonrası azalırken buna paralel olarak HbA sentezi artmaktadır. HbF yapımı yaşamın birinci yılına gelindiğinde %2 ve yetişkinlik dönemine gelindiğinde de %1'den az olmaktadır (He ve Russell 2001) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Globin zincir sentezinin evreleri ve sentez bölgeleri (Thompson ve ark. 1991, Genç 2005)

2.2. Hemoglobinopatiler

Hemoglobinopatiler (HBP'ler), tüm monogenik otozomal resesif hastalıkların en yaygın olanlarıdır ve en şiddetlileri orak hücre hastalığı ve alfa/beta-talasemi majörü içerir. HBP, hemoglobin proteinini kodlayan globin genlerindeki genetik kusurlardan kaynaklanır. Hemoglobin molekülünün içerisindeki globin zincirlerinin üretimindeki azalma veya yapısında bulunan aminoasitlerin değişmesi ile meydana gelen patolojiler hemoglobinopatiler olarak tanımlanmaktadır (TC Sağlık Bakanlığı Rehberi).

2.2.1. Talasemiler

Globin zincirlerinin üretiminde azalma veya tamamen üretimin durması sonucu ortaya çıkan sendromlara ‘talasemi’ adı verilmiştir. Globin zincir sentezinde meydana gelen dengesizlik talaseminin patofizyolojisini oluşturmaktadır. Sağlıklı insan hemoglobininde iki alfa ve iki beta globin zinciri bulunmaktadır. Erişkin dönem hemoglobini, asıl olarak hemoglobin A ($\alpha_2\beta_2$), eser miktarda hemoglobin F ($\alpha_2\gamma_2$) ve hemoglobin A2 ($\alpha_2\delta_2$)’den oluşmaktadır. Globin genlerinden herhangi birindeki mutasyon o globinin az miktarda sentezlenmesi veya hiç sentezlenememesi olarak netice göstermekte ve diğer globin zincirinin ise relatif olarak artışıyla sonuçlanmaktadır. Yetersiz globin zincirlerine göre yapılan talasemi sınıflandırmasında, alfa zincir üretiminin eksikliği veya tamamen yokluğu ‘ α -talasemi’, aynı şekilde beta zincir sentezinin eksikliği ya da yokluğu ‘ β -talasemi’ olarak isimlendirilir (Ghosh ve ark. 2020). Taşıyıcılar tipik olarak asemptomatik olduklarından ve taşıyıcılık durumlarından habersiz olduklarından, taşıyıcı çiftler genellikle her hamilelikte %25’ lik bir HBP’li çocuk riskiyle karşı karşıya olduklarının farkına varmazlar. Talasemi hastaları globin gen ekspresyonunda kusurlar gösterirken, orak hücreli hastalar değiştirilmiş bir yapıya sahip globin proteinlerini eksprese eder. Her iki durumda da genetik kusurların hastalar için ciddi sonuçları vardır (Howard ve Davies 2007).

Orak hücre hastalığı, morbidite ile sonuçlanabilecek akut ve kronik komplikasyonlara neden olabilen tekrarlayan vazo-oklüziv krizler ile sonuçlanabilir. Orak hücre hastalığının tedavisi profilaktik antibiyotikler, folik asit, analjezikler ve ciddi vakalarda kan transfüzyonu ve hidroksiüreden oluşur. Beta-talasemi, kan transfüzyonu ve demir şelasyon tedavisi ile tedavi edilen ciddi anemi ile sonuçlanır. Orak hücre hastalığı ve beta talasemi için tek küratif tedavi hematopoietik kök hücre naklidir. Ne yazık ki, uyumlu bir kök hücre donörü bulmak kolay değildir ve graft-versus host hastalığı nedeniyle komplike olabilir (Houwing ve ark. 2019).

Gen tedavisi hala deneysel, pahalı ve hastaların çoğu için erişilebilir değildir. HBP’ler geleneksel olarak sıtmanın özellikle Plasmodium falciparum sıtmasının yaygın olduğu ülkelerde endemiktir, çünkü heterozigot taşıyıcı olmak falciparum sıtmasından ölüm üzerinde koruyucu bir etkiye sahiptir (May ve ark. 2007). Göç dünya çapında arttıkça, HBP artık Hollanda gibi sıtma öyküsü olmayan ülkelerde de yaygındır ve günümüzde Hollanda’ da her 10.000 göçmen doğumunda yaklaşık dokuz HBP geni homozigot veya bileşik

heterozigot yenidoğan dünyaya gelmektedir (Kerkhoffs ve ark. 2007). Doğumdan sonraki ilk hafta içinde alınan bir kan örneği olan topuk kan testi ile tarama 2007' den beri uygulanmaktadır. Bu testin bir zayıflığı, doğumdan sonraki ilk 6 ayın ardından hemoglobin A2 yüzdesi saptanabilir şekilde arttığından, beta-talasemi taşıyıcılarından ziyade esas olarak homozigot ve heterozigot orak hücreli alel (HbS) taşıyıcılarını saptamasıdır. Konsepsiyon öncesi taşıyıcı taraması (prekonsepsiyonel tarama) veya erken doğum öncesi tarama, yenidoğan taramasına alternatiftir. Prenatal ve antenatal tanı için seçenekler sunar ve taşıyıcı çiftlerin bilinçli üreme seçimleri yapmasına izin vererek onların beklenmedik bir şekilde HBP' li bir çocukla karşılaşma riskini azaltır (Van Vliet ve ark. 2022).

Avrupa'daki birçok ülke, HBP için erken doğum öncesi tarama programları uygulamaktadır. Bazı Akdeniz ülkelerinde devam eden önleme programları sayesinde, insidanda neredeyse %90' lık bir azalma sağlanmıştır. Hatta güney İtalya ve güney Fransa gibi bazı bölgelerde önleme programları ortaokul yaşlarında başlamaktadır (Giordano ve ark. 2014).

2.2.2. Orak Hücreli Anemi

Hemoglobinin β -globin zincirini etkileyen mutasyonlarla karakterize bir grup kalıtsal hemoglobinopati olan OHA Amerika Birleşik Devletleri'ndeki en yaygın genetik hastalıktır. Hastalığın prevalansı Sahra Altı Afrika, Güney Asya, Orta Doğu ve Akdeniz halkları arasında yüksektir. Amerika Birleşik Devletleri'nde orak hücre hastalığı popülasyonunun yaklaşık 100.000 olduğu ve muhtemelen artacağı tahmin edilmektedir. En yaygın genotip homozigot hemoglobin SS'dir (HbSS) ve yaygın karşılaşılan heterozigot tablolar; hemoglobin orak/ β^0 talasemi, hemoglobin orak/ β^+ talasemi ve hemoglobin orak hücre hastalığıdır (HbSC) (David ve ark. 2018, Arigliani ve ark. 2019). OHA terimi, Hb S'i homozigot olarak taşıyan hastalar için ifade edilirken, diğer hemoglobinlerle beraber HbS'i taşıyan hastalarda gözlenen tabloya oraklaşma sendromları denilmektedir. Orak hücreli anemi en yaygın monogenik bozukluk olup ABD'de yaklaşık 100.000 kişiyi ve dünya çapında 3 milyondan fazla kişiyi etkilemektedir. 500 Afro-Amerikalıdan biri'ini etkiler. Yaklaşık 12 Afro- Amerikalıdan biri otozomal resesif mutasyon taşır ve yılda yaklaşık 300.000 bebek orak hücreli anemi ile doğar (Howard ve 2007, Piel ve ark. 2013) (Şekil 2.6). Hastalığın fenotipik ifadesinin anlaşılması hala sınırlıdır. Ancak soğuk hava ve hava kalitesi,

enfeksiyonlar, fetal hemoglobin düzeyi ve diğer genetik alt tipler gibi çevresel faktörler hastalığın kliniğinin ortaya çıkmasında rol oynamaktadır. Klinik belirtiler değişken olup birden fazla sistemi etkiler ve genellikle daha düşük yaşam beklentisine neden olur. OHA, kronik hemolitik anemi, şiddetli akut ve kronik ağrı ve yaşam boyu meydana gelen uç organ hasarı ile karakterizedir. OHA de, ortalama ölüm yaşı 43 yıl (IQR 31,5–55 yıl) olup erken ölümle ilişkilidir (Huisman 1976). Tedavi için erken tanı, komplikasyonların önlenmesi ve uç organ hasarının yönetimi çok önemlidir.



Şekil 2.6. Hemoglobinopatilerin Türkiye ve dünyadaki dağılımı (Altan 2019)

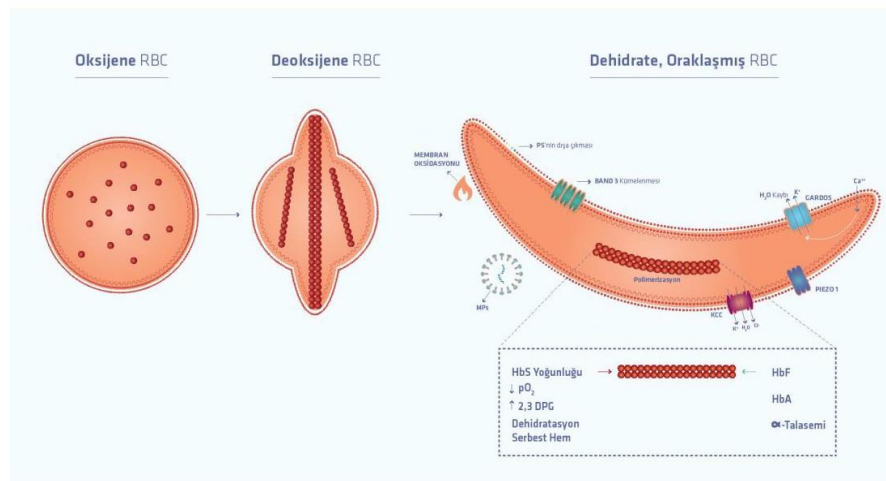
2.2.2.1. Tarihçesi

20. yüzyılda, OHA a odaklanma, tıp bilimi tarihinde bir kilometre taşıydı. Bir ışık mikroskobu kullanarak, James B. Herrick, solunum semptomları olan bir hastadan izole ettiği ‘orak şekilli’ eritrositleri tanımladı. Sonrasında OHA eritrositlerinden izole edilen HGB deki anormallikleri belirleyen daha ileri çalışmalar yapıldı. Ayrıca, normal HGB ile karşılaştırıldığında orak HGB’ deki farklılıkların iyonize olabilen aminoasitlerden kaynaklandığını doğrulayan bulgular vardır. Vernon Ingram tarafından yenilikçi protein dizilimi kullanılarak gerçekleştirilen diğer çalışmalar, β -globin zincirinde altıncı pozisyonda glutamik asit yerine valin aminoasit varlığını tanımladı ($\beta 6$ glutamat $\rightarrow$ valin) (Herrick 2001, Eaton 2002). Max Perutz tarafından gerçekleştirilen daha ileri çalışmalar, HGB allosteri ve orak HGB polimerizasyonu hakkında moleküler bir anlayış sağlayan Hb’nin kristal yapısının devrim niteliğindeki keşiflerine yol açtı. Bu önemli katkılarla OHA ilk moleküler hastalık olarak tanımlandı (Perutz ve ark. 1960).

2.2.2.2.Moleküler temeli ve patofizyolojisi

Hemoglobin S (HbS), hemoglobinin β -globin zincirinin altıncı pozisyonunda glutamik asidin valin ile yer değiştirmesinden kaynaklanır. Şiddetli OHA formları, HbS'nin homozigot kalıtımı nedeniyle oluşan HbSS'yi ve HbS'nin β^0 talasemi mutasyonu ile birlikte kalıtımı nedeniyle S/ β^0 talasemiyi içerir. Diğer formlar arasında HbS'nin HbC, HbD-Los angeles/Punjab veya β^+ talasemi gibi diğer β -globin gen mutasyonları ile birlikte kalıtımı yer alır (Perutz ve ark.1960, Eaton 2002).

Tanımlanan genetik mutasyon, eritrosit şeklini ve deforme olma yeteneğini değiştiren hemoglobin molekülünün polimerizasyonuna neden olur. Fiziksel olarak küçük damar tıkanıklığına ve sonuçta lokal hipoksiye neden olan heterosellüler agregatların oluşumu eritrositlerin artmış adhezyonuna bağlı gelişmektedir. HbS oluşumunu arttıran bu durum inflamatuvar mediatörlerin salınımı ve reperfüzyon hasarına katkıda bulunan serbest radikallerin kısır döngüsünü tetikler. Hemoglobin ayrıca güçlü bir vazodilatör olan nitrik okside (NO) bağlanır ve oksijeni serbest bırakır. Eritrositlerin dehidratasyon varlığında oraklaşma ve rijitleşme olasılığı daha yüksektir (Şekil 2.7 ve 2.8). Bu süreç, büyük ölçüde katyon homeostazındaki değişikliklerden, özellikle potasyum-klorür birlikte taşınması ve Gardos kanallarının (kalsiyuma bağımlı potasyum kanalı) aracılık ettiği artan potasyum ve su akışından kaynaklanır. Diğer ilişkili patolojik olaylar arasında artan nötrofil adhezyonu, NO bağlanması, artan trombosit aktivasyonu ve hiperkoagülasyon bulunur (Perutz ve ark.1960, Hassell 2010).

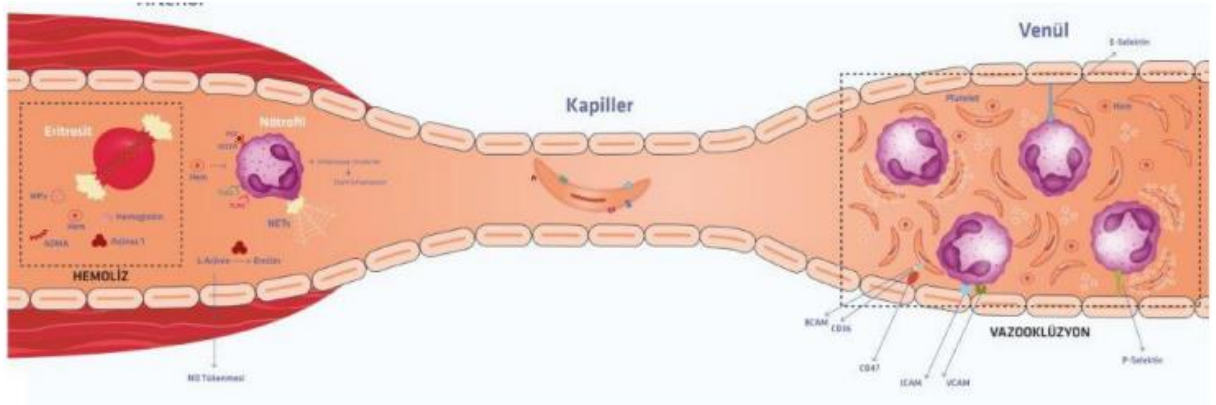


Şekil 2.7. Deoksijene HbS ve orak şeklini almış eritrosit (İnal ve Arpacı 2021)



Şekil 2.8. Kan dokusunda görülen orak hücre şekillerine örnekler (Albayrak ve ark. 2018)

HbS'nin normal hemoglobine göre çözünürlüğü azalmış ve polimerizasyonu artmıştır, bu da eritrositlerde oraklaşmaya ve buna bağlı olarak eritrositlerin hemolizine ve vazo-oklüzyonlara neden olmaktadır (Şekil 2.9). Bunların sonucunda kronik hemoliz ağrı epizodları, kardiyopulmoner, serebrovasküler ve böbrek hastalığı gibi uç organ hasarı gelişmektedir. Orak mutasyonunun bir sonucu olarak, deoksijenize olmuş HbS (deoksiHbS) uzun polimerler oluşturarak karakteristik orak şekilli eritrositlere ve ardından intravasküler hemolize yol açar. Oraklaşmaya bağlı ortaya çıkan hemoliz vazooklüzyona neden olur ve hastalarda şiddetli ağrıya ve erken ölüme neden olabilen çoklu organ hasarına yol açar (Uwaezuoke ve ark. 2018).



Şekil 2.9. OHA'nın patofizyolojisi (İnal ve Arpacı 2021)

Amerika Birleşik Devletleri'nde OHA ile yaşayan 100.000 kişinin ortalama yaşam beklentisi 58 yıldır. OHA' nin ciddi patofizyolojik sonuçları nedeniyle, akut göğüs sendromu, enfeksiyonlar, felç, priapizm ve kronik ağrıyı tedavi etmek için acil bakım gereklidir (Hillery ve ark. 2011, Kassim ve ark. 2015). Ayrıca, son yıllarda özellikle Sahra

altı Afrika’da, Karayip adalarında ve Amerika Birleşik Devletleri’nde OHA insidansı önemli ölçüde artmış ve yalnızca Amerika Birleşik Devletleri’nde yıllık ortalama 488 milyon dolarlık yüksek sağlık bakım maliyetlerine yol açmıştır. 2050 yılına kadar yaklaşık 10 milyon OHA hastasının yaşamı değiştiren ciddi komplikasyonlar nedeniyle tedaviye ihtiyacı olacağı tahmin edilmektedir. OHA 100 yıldan uzun süre önce keşfedilmiş olmasına rağmen OHA ağrısının, uç organ hasarının ve OHA’de meydana gelen diğer kronik durumların kesin tedavisinin sınırlı olması son derece hayal kırıklığı yaratmaktadır (Piel ve ark. 2013).

Orak hücre anemi hastalığında, moleküler açıdan ele alındığında bozukluğun saptandığı lokasyonlara göre beş haplotip belirtilmiştir. Benin (BEN), Kamerun (CAM), Arap-Hint (AI), Senegal (SEN) ve Orta Afrika Cumhuriyeti (CAR) bölgeleri olmak üzere β -globin gen kümesinin beş ana haplotipi orak hücre hastalığı ile ilişkilidir. Her haplotipin tipik bir Hb F seviyesi vardır. Hb S ile ilişkili haplotiplerdeki Hb F değişiminin, büyük olasılıkla her bir haplotipine bağlı bycis-etkili elementler için açıklanması muhtemeldir. Her haplotip grubu içinde geniş bir Hb F seviyeleri dağılımı vardır. Haplotip genellikle HBB gen kümesinde beş ila sekiz kısıtlama fragmanı uzunluk polimorfizmi sahasının varlığı veya yokluğu ile belirlenir. Haplotiplendirme kullanışsızdır, zaman alıcıdır ve hataya açıktır (Alsultan ve ark. 2014, Nascimento ve ark. 2017).

Özetle Orak hücreli anemi hastalarının klinik özellikleri heterojenite göstermektedir. Hastaların bazıları yaşamlarının üçüncü dekadına kadar klinik bulgu vermez iken bazıları ise çocukluk çağının erken dönemlerinden itibaren hospitalizasyon gerektiren klinik tablolarla karşımıza çıkabilir (Antmen 2009).

2.2.2.3. Kliniği

Orak hücreli hastaların öyküsü ve fizik muayenesi asemptomatikten çok çeşitli klinik prezentasyonlara kadar değişkenlik gösterir. Kademe kademe azalan fetal hemoglobin varlığı nedeniyle hastalar yaşamın ilk altı ayında tamamen asemptomatiktir ve yaşamın diğer safhalarında HbS baskın olmaya başlar. OHA’nin klinik görünümü de komplikasyon tipine ve etkilenen vücut sistemine bağlı olarak değişkenlik gösterir (Rees ve ark. 2010).

2.2.2.3.1. Vazooklusiv kriz

Vazooklusiv kriz (VOC), OHA'nin en yaygın klinik prezentasyonudur. Mikrovasküler tıkanıklık (akut ağrının ana patofizyolojik nedeni), iskemi ve hipoksiye yol açar, ardından inflamasyon, doku ve vasküler hasar ile nosiseptörleri aktive eden inflamatuvar mediatörlerin salınımı gerçekleşir. Reperfüzyon, iltihabı ve bunun sonucunda ortaya çıkan ağrıyı yoğunlaştırır. Hastalar vücudun herhangi bir yerinde, ancak tipik olarak uzun kemiklerde, sırtta, pelviste, göğüste ve karında şiddetli ağrıdan şikâyet ederler. Semptomlar altı aylıkken hem ellerde hem de ayaklarda ağrı ve şişlik şeklindeki 'daktilit' tablosu ile başlayabilir. Çoğu durumda, vazookluziv kriz ile ilişkili ağrının varlığını veya yokluğunu gösteren güvenilir işaretler veya testler yoktur (Uwaezuoke ve ark 2018).

2.2.2.3.2. Akut göğüs Sendromu

Akut göğüs Sendromu (ACS), ateş ve öksürük, takipne ve göğüs ağrısı gibi solunum semptomlarının eşlik ettiği göğüs radyografisinde yeni bir pulmoner infiltrasyonun ortaya çıkması olarak tanımlanır. ACS' nun, hipoksi ve pulmoner mikrodamarlarda orak şekilli eritrositlerin yapışmasını indükleyen inflamatuvar mediatör salınımının artışı sonucu oluştuğu varsayılmaktadır. Bu süreç, normalde onu etkisiz hale getirecek olan NO' te bir azalma ile birliktedir. Bu klinik prezentasyonda en sık görülen semptomlar; ateş, öksürük, göğüs ağrısı, nefes darlığıdır ve akciğer muayenesinde hava girişinde azalma, raller ve bazen hırıltılı solunum görülebilir. ACS, hemen tedavi edilmezse hızla hipoksemiye ve solunum yetmezliğine ilerleyebilen bir tablodur. Tespit edilebilen enfeksiyöz ajanlar ise sıklıkla Klamidya, Streptococcus pneumonia ve Mycoplasma'dır (Vichinsky ve ark. 1997).

2.2.2.3.3. Enfeksiyonlar

OHA'li hastalar, fonksiyonel asplenileri ve ayrıca fonksiyonel olarak bağışıklığı baskılanmış durumları (artan kemik iliği döngüsü ve değişmiş kompleman aktivasyonu) nedeniyle özellikle kapsüllü mikroorganizmalarla olan enfeksiyon riski altındadırlar. Çocuklarda penisilin profilaksisi ve pnömokok aşısının yaygın kullanımı, bu hastalarda bakteriyel enfeksiyon ve sepsis insidansını dramatik olarak azaltmıştır (Booth ve ark. 2010).

2.2.2.3.4. Pulmoner Hipertansiyon (PHTN)

Pulmoner Hipertansiyon (PHTN) insidansı %6 ila %10 ve mortalitesi %2 ila %5 arasında değişmektedir. PHTN'nin büyük ölçüde medial düz kas ve endotel hücrelerindeki değişikliklerden kaynaklandığına inanılmaktadır. Anahtar klinik bulgu egzersiz kapasitesinde azalmadır (hastaların %45'i New York Kalp Derneği sınıf III veya IV'tür). Teşhis bulguları arasında artmış N-terminal pro-brain natriüretik peptit (NT-proBNP), ekokardiyografide artmış triküspit kapak regürjitasyonlu jet hızı ve sağ kalp kateterizasyonunda artmış pulmoner basınç yer alır (Ataga ve ark. 2006).

2.2.2.3.5. Serebrovasküler patoloji (CVA)/İnme

İki yaşındaki çocuklarda bile CVA ortaya çıkabilir iken OHA'lı hastaların %11'i 20 yaşına kadar inme geçirmektedir. Bununla birlikte, küçük damar hastalığı ile ilişkili sessiz serebral enfarktüsler (SCI), belirgin inmelerden daha yaygındır ve OHA hastalarının %34'ünde 14 yaşına kadar SCI olduğu gözlenmiştir. Transkraniyal Doppler, yüksek CVA riski taşıyanları belirlemek için OHA hastalarında iki yaşında başlatılan etkili bir tarama testidir (Moran ve ark. 1998).

2.2.2.3.6. Pulmoner Emboli (PE)

OHA olan hastalarda PE insidansı daha yüksektir. Yatan hastalarda OHA'lü olmayanlara göre yıllık insidanda 50 ila 100 kat artış vardır (Stein ve ark. 2006).

2.2.2.3.7. Böbrek Komplikasyonları

Böbrek komplikasyonları OHA'de son derece yaygındır ve yetişkinlerin %30'unda kronik böbrek yetmezliği gelişir. Bunun nedeni, eritrosit dehidrasyonuna ve vazo-oklüzyona katkıda bulunan renal medulladaki düşük parsiyel oksijen basıncı, düşük pH ve yüksek ozmolalitedir. Tanıda mikroalbüminüri ve proteinüri yaygın laboratuvar bulgularıdır (Pham ve ark. 2000).

2.2.2.3.8. Göz Komplikasyonları

Proliferatif retinopati, OHA'nın en yaygın oftalmolojik komplikasyonudur (HbSC'de daha sık, %70 gibi yüksek bir oran) ve periferik retinal damarların tıkanmasından kaynaklanır (Bonanomi ve Lavezzo 2013).

2.2.2.3.9. Dalak Sekestrasyonu

Dalak sekestrasyonu, OHA'nın potansiyel olarak katastrofik bir komplikasyonudur ve pediatrik popülasyonda, özellikle HbSS anemisinde daha sık görülen şiddetli karın ağrısı ve dolaşım kollapsına neden olabilen hemoglobin seviyesindeki akut düşüş ile karakterizedir. Bu, altı yaş civarında meydana gelen dalak oto enfarktüsünden kaynaklanmaktadır. Ancak bu, HbSC ve diğer hemoglobinopatileri olan erişkinlerde görülebilir (Brousse ve ark. 2012).

2.2.2.3.10. Priapizm

OHA ile ilişkili priapizm, staz, hipoksi ve iskemi ile ilişkili düşük kan akımı sonucu gelişmektedir (Rogers 2005).

2.2.2.3.11. Kolelitiazis

Kronik hemoliz ve artan bilirubin döngüsünün bir sonucu olarak kolelitiazis ve safra çamuru gelişir (Martins ve ark. 2017).

2.2.2.3.12. Osteonekroz

Femur ve humerus başları, artan eritrosit iliği veya damar tıkanıklığından kaynaklanan artan basıncın bir sonucu olarak ortaya çıkan yaygın osteonekroz bölgeleridir. Bazen cerrahi tedavi endikedir (Adesina ve Neumayr 2019).

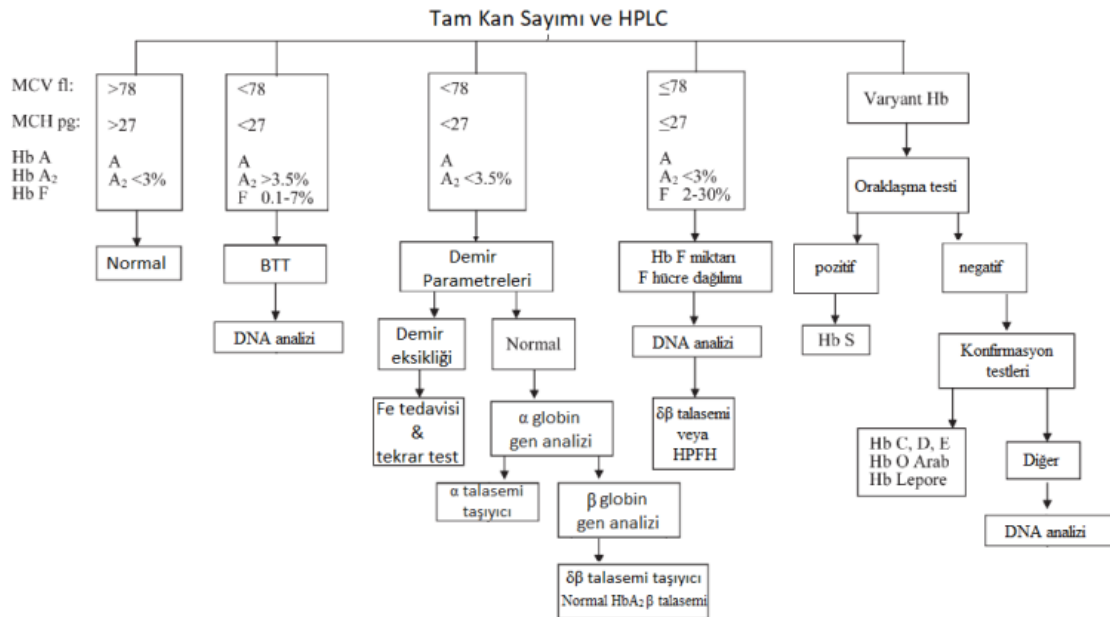
2.2.2.3.13. Aplastik kriz

Eritropoezin kesintiye uğramasının neden olduğu Parvovirus B19'un neden olduğu aplastik kriz, ciddi anemi ve kardiyovasküler dekompanseasyona yol açabilir. Bu kendi

kendini sınırlayan enfeksiyon tipik olarak 7 ila 10 gün sürer ve yaşamı tehdit edebilir (Rao ve ark. 1992).

2.2.2.3.14. Tanısal Değerlendirme

Amerika Birleşik Devletleri'nde, OHA olan hastaların çoğuna yenidoğan veya doğum öncesi tarama ile teşhis konur. Tanı, hemoglobin türlerini ölçen ve çeşitli hemoglobinopatileri saptayan hemoglobin elektroforezine dayanır. Semptomlarla başvuran hastalar arasında, olağan laboratuvar değerlendirmesi, diferansiyel retikülosit sayımı, tam metabolik panel, LDH düzeyi, bilirubin düzeyi ve kan grubunun belirlenmesi ile birlikte tam kan sayımından (CBC) ve olası transfüzyon tedavisi için çapraz karşılaştırmadan oluşur. Enfeksiyon sürecinden şüpheleniliyorsa, kan da dâhil olmak üzere uygun kültürler alınmalıdır (Agrawal ve ark. 2019, Ameringer ve ark. 2019, Elghazaly ve ark. 2019, Pai ve ark. 2019) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Hemoglobinopati tanısında algoritma (Old 2007)

2.2.2.3.15. Görüntüleme

Akut göğüs sendromunu teşhis etmek için klinisyenlerin pulmoner X-ray grafi çekimi kararında tereddüt edilmemeli ve gerektiğinde batın ultrasonografisi yaptırılmalıdır.

Transkraniyal ultrasonografi, felçleri önlemek için özellikle iki yaşından itibaren tarama testleri olarak önerilir. Klinik şüpheye bağlı olarak da kemik taraması, MR görüntüleme ve MR anjiyografi gibi diğer görüntüleme çalışmalarının düşünülmesi önerilir (Zúñiga ve ark. 2018).

2.2.2.3.16. Tedavi / Yönetim

Orak hücreli anemide hastalığın yönetimi; iyilik halinin sürdürülmesi ve komplikasyonların yönetimi olmak üzere iki kategoride ele alınabilir. Sağlığın korunmasının amacı, risk faktörlerini ve erken komplikasyon belirtilerini taramak ve belirlemektir. Pnömonokok aşısı, erken bebeklik döneminden itibaren başlanarak en az beş yaşına kadar penisilin profilaksisi ve ek olarak ateş yönetimi eğitiminin invaziv enfeksiyonlardan kaynaklanan mortalite ve morbiditeyi önemli ölçüde azalttığına dair kanıtlar literatürde bildirilmiştir. Büyük intrakraniyal kan damarlarının transkraniyal Doppler (TCD) ile rutin taraması, orak hücre hastalığı olan çocuklarda stroke riskini erkenden öngörebilirse de bu yöntem her zaman ve her yerde ulaşılabilir olmayabilir. Hatta kronik transfüzyon tedavisi gibi bu hastalıkta yaygın gereksinimi olan tedaviler birçok gelişmekte olan ülkelerde uygulanabilir değildir (Haydock ve ark. 2019, Ogunsile ve ark. 2019).

Orak hücre hastalığında komplikasyonların yönetimi, komplikasyon tipine göre belirlenir. VOC yönetimi, hızlı ağrı değerlendirmesi, analjezik tedavinin erken başlatılması ve bu analjezinin mümkünse hasta kontrollü analjezi (PCA pompası) olması ve semptomlar düzelene kadar hidrasyonun sürdürülmesinden oluşur. Hafif ağrısı olan çoğu hasta için asetaminofen veya NSAID'ler yeterli olabilir, ancak orta ve şiddetli ağrı için NSAID'li veya NSAID'siz opiyatlar endikedir. Daha yakın zamanlarda, ketaminin alt dissosiyatif dozlarda opiyat kullanımını azalttığı gösterilmiştir. Ateş ile başvuran hastalar, idrar yolu enfeksiyonundan (İYE) şüpheleniliyorsa, diferansiyel, retikülosit sayımı, kan kültürü ve idrar kültürü ile tam kan sayımı (CBC) yapılmalı ve geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi başlanarak yaşamı tehdit eden enfeksiyonlar için derhal değerlendirilmelidir. Akut göğüs sendromu, dalak sekestrasyonu ve inme gibi diğer komplikasyonların çoğu için titiz destekleyici bakım (oksijen, uygun sıvı tedavisi) ve kan transfüzyon tedavisi gereklidir. Sık ve ciddi komplikasyonları olan hastalar arasında hidroksiürenin önemli faydalar sağladığı gösterilmiştir. Hematopoetik kök hücre transplantasyonu (kemik iliği transplantasyonu),

orak hücre hastalığının tedavisi olarak büyük umut vaat etmektedir. Antihistaminikler (difenhidramin, hidrokizin) opiyatların neden olduğu kaşıntıyı azaltabilir ve bir miktar opioid koruyucu etkiye sahip olabilir. Akut göğüs sendromu için ampirik antibiyotikler (sefalosporin ve makrolid), yeterli analjezikler, oksijen takviyesi, basit veya exchange transfüzyon, beta-agonist inhalasyonları ve spirometri gerekebilir (Druye ve ark. 2018, Liem 2018).

2.2.2.3.17. Prognoz

Orak hücre hastalığında beklenen yaşam süresi, normal yetişkinlere kıyasla genel olarak azalır (muhtemelen 20 ila 30 yıl), ancak tedavideki ilerlemeler sağkalımı uzatmaktadır. Kötü prognozu öngören faktörler, bebeklik döneminde daktilit, 7 gr/dL'den düşük hemoglobin seviyesi ve enfeksiyon yokluğunda yüksek olan beyaz küre hücre sayımıdır.

Orak hücre hastalığının kesin tedavisi yoktur ve tedavi, yaşamı tehdit eden komplikasyonlarla ilişkilidir. Bu nedenle, hastalığın hematolog, cerrah, göğüs hastalıkları uzmanı, ortopedist, dâhiliyeci, diş hekimi, pratisyen hemşire ve eczacıdan oluşan profesyonel bir ekip tarafından yönetilmesi önerilmektedir. Tedavi yönetimindeki anahtar ise kesinlikle hasta eğitimidir. Sağlığı koruyarak, aşı yaptırarak ve hastalığın ataklarını tetikleyici faktörlerden kaçınarak bazı hastalar iyi bir yaşam kalitesi sağlayabilir. Çoğu hasta için orak hücre krizleri sıklıkla hastaneye yeniden yatış gerektirir. Bu hastaların çoğunda iyileşmeyen kronik yaralar vardır. Maalesef ki genel olarak, orak hücre hastalığı olan hastalar, sağlıklı popülasyona kıyasla çok daha kısa bir yaşam süresine sahiptir (Pack-Mabien ve Haynes Jr 2009, Sedrak ve Kondamudi 2021).

Gelecekteki gen tedavisi veya ileri genetik mühendislik çalışmaları, normal hemoglobin veya yüksek fetal hemoglobin üretmek için insan pluripotent hücrelerinin yeniden programlanması yoluyla kalıcı tedavi sağlayabilir (Sedrak ve Kondamudi 2021).

Tam genom dizilimine ilişkin son güncel kanıtlar, insan genom dizilerimizin çok azının (%2'den az) aslında protein üretebileceğini ortaya koydu. Bununla birlikte, genom dizilerinin geri kalanı DNA'dan transkripsiyona uğrarken protein dönüşmesi için gerekli olan translasyona uğramaz ve protein kodlamayan bu RNA'lar non-coding RNAs

(ncRNA'lar) olarak adlandırılır. Bu ncRNA'ların DNA'dan transkripsiyonları proteinleri sentezlemek için olmasa da onlar, gen düzenlemesi ve insan hastalıkları hakkındaki bilgimizi arttırmanın anahtarı olabilir. Kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar); ribozomal RNA'yı (rRNA), transfer RNA'yı (tRNA), küçük nükleolar ribonükleoproteinler (snoRNP'ler) Piwiinteracting RNA'ları, mikroRNA'ları (miRNA) ve uzun kodlamayan RNA'ları (lncRNA) içerir (Doss ve ark. 2015, Pellin ve ark. 2019).

2.3. MikroRNA(miRNA)

MikroRNA'lar, özellikle MRE dizisinde (miRNA recognition element) 3'-UTR bölgesine (3'-untranslated region) bağlanan ve gen ekspresyonunu inhibe eden 18-25 bp kısa kodlayıcı olmayan RNA'lardır. miRNA ailesi, tüm hücrelerde bulunan ve protein kodlayan birçok genin güçlü bir moleküler düzenleyicisi olup, hastalıklara önemli etkiler yapmaktadır. miRNA'lar bu etkilerini; mRNA'nın bozulması ve /veya translasyonel inhibisyonu ile yapabilir (Byon ve Papayannopoulou 2012, Raisch ve ark. 2013).

1993'te miRNA'lar ilk olarak *C. elegans*'taki heterokronik lin-4 geninin ürünü olarak keşfedildi (Fyfe 2020, Winkle, El-Daly ve ark. 2021). Bunlar küçük (~22 nükleotid), sitoplazmada gene özgü mRNA'yı susturmak için miRNA ile indüklenen susturma kompleksi (miRISC) ile etkileşime giren, protein kodlamayan endojen RNA molekülleridir (Bhatnagar and Garzon 2021). miRNA'lar, hedef mRNA'nın 3'UTR bölgelerinde tamamlayıcı dizilerle baz eşleşmesi yaparak mRNA bozulmasını ve gen susturulmasını kolaylaştırır (Geisler ve ark. 2021). Şimdiye kadar 38.000'den fazla olgun miRNA keşfedilmiştir (Mitra ve Elangovan 2021). Üretilen her miRNA potansiyel olarak yüzlerce genin ifadesini düzenler. Ek olarak, aynı yoldaki genlerin ekspresyonunu değiştirmek için birden fazla miRNA tarafından tek bir transkript hedeflenebilir (Wightman ve ark. 1993, Saki ve ark. 2014). Bu nedenle, miRNA'lar, PubMed'de indekslenen miRNA'lar üzerinde 126.900'den fazla yayınlanmış çalışma tarafından kanıtlandığı gibi, keşiften bu yana geniş çapta araştırılmıştır (Kim 2005).

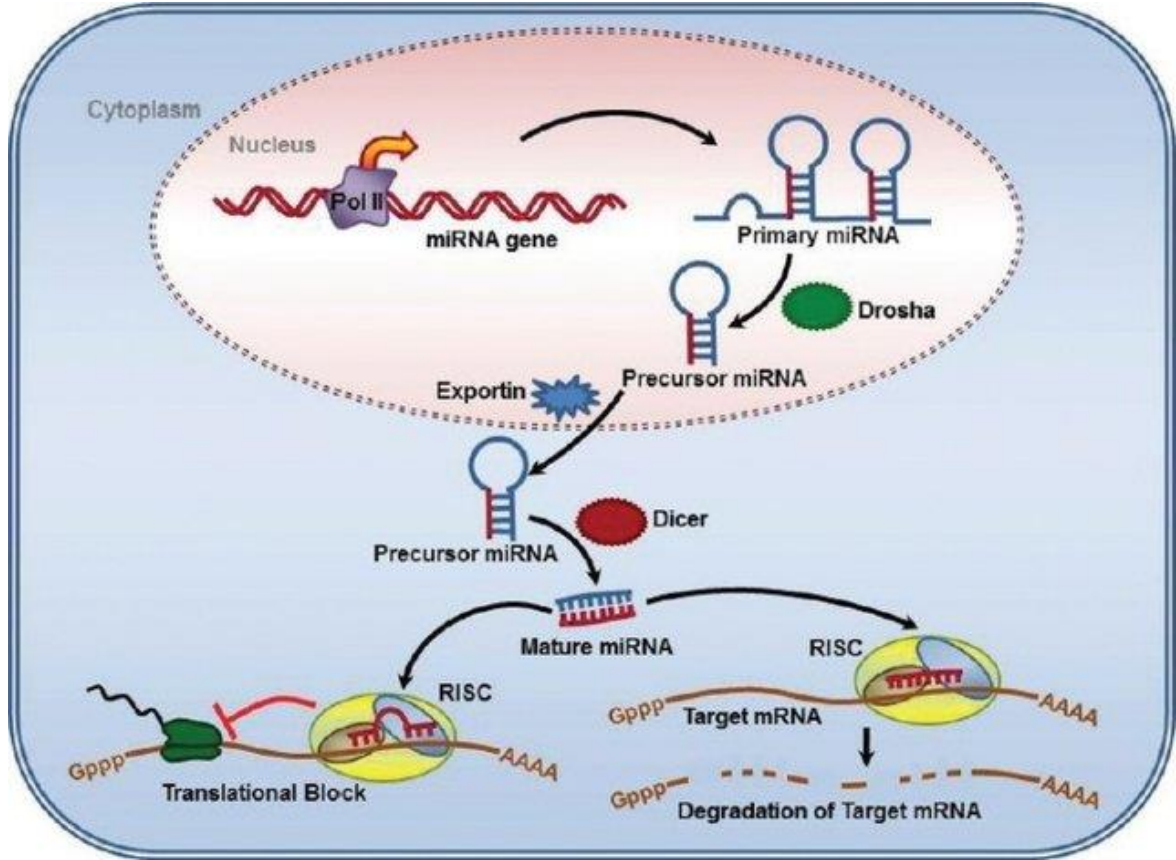
Bilinen birçok miRNA'nın (miR-150, miR-15a ve miR-126, miR-221/222, miR-223), hematopoez ve eritropoez sırasında eritroid hücrelerin diferansiyasyon ve matürasyonu için çok önemli olan c-Myb geninin düzenlenmesi ile etkileşime girdiği bulunmuştur (Felli

ve ark. 2005, Felli ve ark. 2009, Ardekani ve Naeini 2010). Bazı çalışmalar, OHA hastalarında miR-15a, miR16, miR-26b ve miR-151-3p yoluyla HU (hidroksiüre) aracılı γ -globin ekspresyonunun transkripsiyon sonrası regülasyonunu ortaya çıkarmıştır. Çalışmalar miRNA199b-5p ve 23a'nın GATA-1 ve NFE2 gibi birçok transkripsiyon faktörü yoluyla eritropoezi değiştirebildiğini göstermektedir (Zhu ve ark. 2013, Pule ve ark. 2016). Ek olarak, bu miRNA lar birçok transkripsiyon faktörü yoluyla globin zincirinin ekspresyonunu up ve/veya down regüle edilmesini düzenleyerek hemoglobin sentezini kontrol eder. miRNA'ların OHA'deki kesin işlevi hakkında çok fazla veri olmamasına rağmen, miRNA'ların OHA'deki HU düzenleme yollarında çok önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Lee ve ark. 1993, Zhu ve ark 2013).

HU' nun başlıca faydası, doğrudan ağrının, akut göğüs ataklarının, mortalitenin ve kan transfüzyonu ihtiyacının önemli ölçüde azalmasına yol açan HbF üreten etkisiyle ilişkilidir (Steinberg 2009, Lebensburger ve ark. 2011). Bununla birlikte, infertilite, enfeksiyonlara duyarlılık ve potansiyel teratojenik etkiler gibi olası kısa ve uzun vadeli olumsuz etkiler de HU ile ilişkilendirilmiştir. Bu tür yan etkilerden duyulan korku, bazı klinisyenler, ebeveynler ve hastalar için bir endişe konusu olmuştur ve bu durum tedaviye uyumun önünde potansiyel bir engel teşkil etmektedir (Pule ve ark. 2016). Bundan dolayı HU hâlâ yeterince kullanılmadığından HbF seviyesini eşit derecede artırabilecek alternatif ve potansiyel olarak daha az toksik ve daha kabul edilebilir ajanları keşfetmek için HU'nun moleküler etki mekanizmalarının tam olarak anlaşılması gereksinimi devam etmektedir (Pule ve ark 2016). Nitrik oksit üretimi, çözünebilir guanil siklazın düzenlenmesi, siklik adenosin ve guanozin monofosfatın yanı sıra eritropoietik stres tepkisi dahil olmak üzere HU aracılı hastalık iyileşmesinin diğer birçok mekanizması rapor edilmiştir (Cokic ve ark. 2006) (Mabaera ve ark. 2008). Ayrıca HU aracılı fetal hemoglobin (HbF) indüksiyonunda; $G_{i\alpha}$ /JNK/Jun p38/MAPK/CREB1; cAMP aracılı yanıt; ERK-1/ERK-2 MAPK'nın eritropoietin (EPO) kaynaklı aktivasyonu; γ -globin ekspresyonunun histon deasetilaz (HDAC) ve DNA metil-transferaz (DNMT) inhibitörünün aracılık ettiği epigenetik modifikasyonu gibi çeşitli sinyal yolları belirtilmiştir (Pule ve ark 2016). Buna rağmen HU aracılı HbF üretimi moleküler mekanizmaları hala tam olarak açıklanamamıştır ancak γ -globin ekspresyonunun mikroRNA'lar (miRNA'lar) yoluyla transkripsiyon sonrası düzenlenmesinin, OHA hastalarında HU aracılı HbF indüksiyonunda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, DNA metilasyonu başlangıçtaki HbF ile önemli ölçüde

ilişkilendirilmiştir ancak HU'ya yanıt olarak HbF indüksiyonu için önemli bir açıklama sağlanamamıştır. Bununla birlikte, küçük kodlamayan RNA'lar, özellikle de miRNA'lar, mRNA translasyonunun inhibisyonu yoluyla hematopoez ve eritropoez de gen ekspresyonunun güçlü düzenleyicileri ve değiştiricileri olarak ortaya çıkmıştır. Nitekim bazı çalışmalarda miRNA'ların HbF'nin düzenlenmesinde spesifik olarak rol oynadığını göstermiştir (Pule ve ark 2016).

miRNA'lar, memeli dokularında doğal olarak değişen seviyelerde eksprese edilen endojen küçük RNA'lardır. Memeli hücrelerinde farklı süreçleri düzenlemede miRNA'ların rolünün ortaya çıkmasından bu yana, çeşitli hastalıklarımızda, özellikle kanserde hedeflenen gen ekspresyonu için yeni bir terapötik sınıf olarak uygulanabilirlikleri kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve oldukça faydalı olduğu kanıtlanmıştır (Wightman ve ark. 1993, Starlard-Davenport ve ark. 2019). Ayrıca, sınırlı boyutları, türler arasında korunmaları ve hedef genlerin ekspresyonunu bozma kapasiteleri nedeniyle miRNA'lar, yaygın memeli hastalıklarında gen ekspresyonunu hedeflemek için dikkat çekici terapötik adaylardır. Son on yılda, artan çok sayıda kanıt, mikroRNA'ların HBG aktivasyonu veya transkripsiyonel baskılayıcı proteinler tanımlanmış ve HBG ekspresyonunun transaktivatörleri yoluyla baskılanma ile ilişkisi vurgulamıştır (Li ve ark. 2019) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. miRNA biogenezi (Joshi ve ark. 2011)

Keşfinden bu yana, kanserden Alzheimer hastalığına kadar çok çeşitli hastalıklar için miRNA tabanlı terapötiklerin geliştirilmesi için çalışmalar yapılmaktadır. Yakın zamanlarda yapılan çalışmalar, nörodejeneratif bozukluklar, Alzheimer hastalığı ve kanser dâhil olmak üzere çeşitli hastalıkların periferik kanındaki miRNA'lar arasındaki ilişkiyi incelemiştir (Cui ve ark. 2019, Starlard-Davenport ve ark. 2022). Birkaç miRNA, eritroid hücrelerinde bol miktarda bulunur ve miR-15a/16, miR-144, miR-150, miR-191 ve miR-221/222 dâhil olmak üzere hematopoezin kritik düzenleyicileri olarak işlev görür (Pellin D ve ark 2019). Destekleyici çalışmalar, let-7 miRNA ailesi de dâhil olmak üzere, fetal ve erişkin eritroid progenitör hücrelerinde farklı şekilde eksprese edilen miRNA'lar tarafından hedeflenen genlerin ekspresyonunu bildirmiştir (Zhang ve ark 2012, Zheng ve ark. 2020). Bu bulgular, yetişkin eritropoezi sırasında HBG gen düzenlemesinde yer alan miRNA'ların terapötik potansiyeline ilişkin daha fazla araştırmayı haklı çıkarmaktadır.

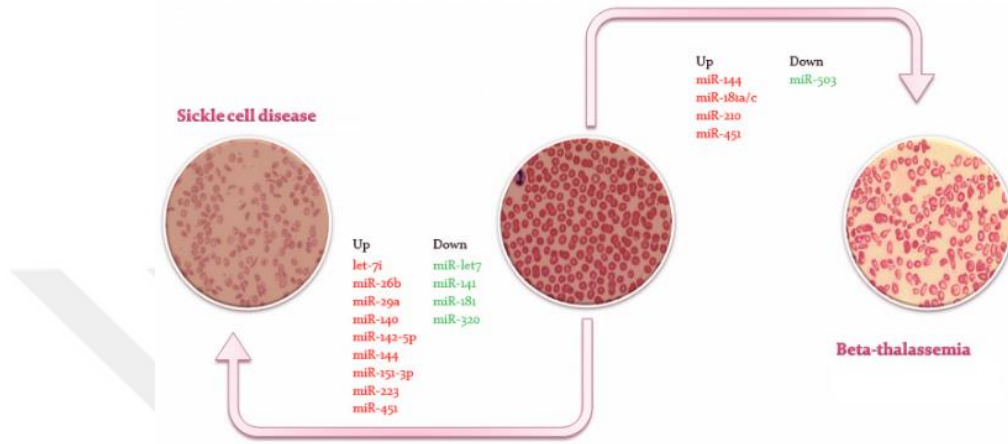
2.3.1. Eritrosit miRNA'ları ve orak hücre patogenezi

Eritrositlerde çekirdek ve sitoplazmik organeller bulunmadığından, nükleik asitlerden yoksun oldukları düşünülüyordu. Bununla birlikte, gelişmiş genomik araçlarla yapılan çalışmalardan sonra, eritrositlerin bol miktarda farklı miRNA içerdiği bulunmuştur (Lessard ve ark. 2018). Birkaç çalışma, miRNA'ların hematopoez ve eritropoez sırasında hücre farklılaşması ve olgunlaşmasının düzenlenmesindeki rolünü göstermiştir (Havelange ve Garzon 2010, Papasavva ve ark. 2021).

Literatürde, eritrositler içerisinde miR-320, miR-141, let-7 miRNA ve miR-181 dâhil olmak üzere çeşitli miRNA'ların bol miktarda bulunduğunu göstermiştir. Bu tür miRNA'lar normal eritrositlerde (HbAA) fazlaca bulunmakla birlikte HbSS'den muzdarip hastaların eritrositlerinde daha düşük oranlardadır. Öte yandan, orak eritrositlerde miR-29a, miR-451, miR-140, miR-144 ve miR-299'un yüksek ekspresyonları gösterilmiştir (Lawrie 2010, Sangokoya ve ark. 2010). Vasconcellos ve arkadaşları, let-7a ve let-7b gibi let-7 miRNA ailelerinin, retikülositler dâhil olmak üzere periferik kan hücrelerini aşırı eksprese ettiğini bildirdi. Bu nedenle, belirli farklı eritroblast genlerinin, özellikle γ -globin'in ekspresyonunu modüle etmek için let-7a ve let-7b'nin ekspresyonunu bloke etmek gerekliliğini desteklemektedir (Sangokoya ve ark. 2010).

Başka bir araştırma, Orak hücreli eritrositlerde miRNA-320'nin normal eritrositlere göre daha düşük eksprese edilmesi, OHA hastalarında retikülositlerin farklılaşması ve olgunlaşması sırasında transferrin reseptörü 1 (TFR1) (CD71 olarak da bilinir) gibi majör demir taşıyan proteinin de down regülasyonu için gerekli olduğunu gösterdi. Bu miRNA'nın düşük ekspresyonu, doğrudan CD71'in ekspresyonunu artırarak düzenlenir. Ek olarak, K562 insan ölümsüzleştirilmiş miyeloid lösemi hücre hattı hücreleri ve birincil progenitör hücreler, miRNA-144'ün önemli bir oksidatif stres modülatörü olarak işlev gördüğünü ve potansiyel olarak ilgili nükleer faktör eritroid-2 (NRF2) lösin feruar transkripsiyon faktörü orak RBC'lerinin ekspresyonunu düzenlediğini göstermiştir. Bu şekilde, oksidatif stresi azaltmak ve OHA'de artan hemolitik krizi önlemek için olası bir hedef sağlayabilirler (Verma ve ark. 2021). Artan miR-144, HbSS retikülositlerinde azalmış NRF2 seviyeleri ile HbSS eritrositlerinde azalmış glutatyon rejenerasyonu ve zayıflamış antioksidan kapasitesi ile ilişkilidir, böylece HbSS hastalarında görülen azalmış oksidatif stres toleransı ve artan anemi şiddeti için olası bir mekanizma sağlar (Sangokoya ve ark. 2010). Jain ve arkadaşları

OHA ile ilişkili trombosit miRNA'larının ve miR-154, miR-329 ve miR376'nın down regülasyonunun OHA'da artan trombosit aktivasyonu ile bağlantılı olduğunu belirten ilk araştırmacılar. Bu nedenle, yeni trombosit türevli miRNA'nın tanımlanması, OHA tedavisi için potansiyel bir terapötik seçenek sağlayabilir (Jain ve ark. 2013, Saki ve ark. 2016, De Vasconcellos ve ark. 2017) (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. β -talasemi ve orak hücre hastalığında mikroRNA ekspresyonunun disregülasyonu. Bu miR'lerin up-down regülasyonuna göre eritrosit kaderi belirlenir. Bunlardan bazıları, bu soyun farklılaşması sırasında ekspresyonu artan mir-451 gibi eritrositlere özgü mikroRNA'lardır (Saki ve ark 2016)

2.3.2. Plazma ve eksozomal miRNA'lar

miRNA'lar plazmada yüksek stabiliteye sahip olduklarından, yeni bir biyobelirteç sınıfı olarak büyük umutlar taşırlar. Dolaşımdaki serum mikroRNA'ları farklı hastalıklarda tanısal veya prognostik belirteçler olarak çalışılması güncel moleküler hedeflerdir. OHA hastalığının klinik şiddeti ile ilişkili biyobelirteçlerin tanımlanması arzu edilse de OHA ve miRNA ile ilgili az sayıda çalışma vardır. Biassi ve arkadaşları plazmanın artmış OHA şiddeti ile ilişkili bazı miRNA'lar içerdiğini bildirdi (Biassi ve ark. 2022). Klinik şiddet indekslerine göre OHA li hastaların plazma örneklerinde 5 miRNA'yı araştırdıkları çalışmalarında bunların 2'sinin (miR510 ve miR629) klinik şiddeti ağır olan hastalarda down regüle olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca miR510 stres oksidasyonunda rol oynayan bir protein olan Peroksisredoksin-1'i (PRDX1) ile ilişkili olduğu ve düşük ekspresyonunu hemolizle ve miR629'un Endotelin-1 ile ilişkili olduğu ve düşük ekspresyonunu pulmoner hipertansiyon gibi artmış vasküler hastalıkla ilişkilendirmişlerdir (Biassi ve ark. 2022).

Khalifa ve arkadaşları miRNA'nın endotel hücre aktivasyonu, monosit adezyonu ve dolaşımdaki eksozomlar yoluyla endotelial ve hücreler arası bariyerin bozulmasında rol oynadığı ve hafif, orta ve şiddetli OHA vakalarında klinik gidişi öngörmede anahtar bir rol oynadığı gösterilmiştir (Khalyfa ve ark. 2016). Rivkin ve arkadaşları microRNA-142'nin eritrosit fizyolojisi ve moleküler hücre biyolojisi üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmalarında tipik eritrosit çift içbükey şeklini ve yapısal esnekliğini korumak, reaktif oksijen türlerinin normal metabolizması ve genel yaşam süresi için microRNA-142'nin gerekli olduğunu ayrıca miRNA-142'nin aktin filamentinin yapısının korunmasında ve hücreler iskeletinin organizasyonunda da yer aldığı gözlemiştir. Rivkin ve arkadaşları ayrıca miRNA-142'nin down regülasyonunun pro-oksidan metabolizması ile birlikte eritrositlerin normal ömrünün kısalması ve morfolojik homeostazın bozulması ile ilişkili olduğunu belirtti (Rivkin ve ark. 2017).

Sonuç olarak, miRNA-142'nin eritrositlerin patolojilerini anlamak için olası bir aday olabileceğini göstermektedir, çünkü morfolojik deformasyonun OHA gibi birçok hematolojik bozuklukta bulunduğu yaygın bir bilgidir. Pritchard ve ark. miRNA'nın %58'inin bir veya daha fazla kan hücresi tipinde yüksek oranda eksprese edildiğini göstermiştir (Pritchard ve ark. 2012). Miyeloid (miR-223, miR-197, miR-574-3p ve let-7a) ve lenfoid (miR-150) kan hücreleri dahil, bunlara karşılık gelen lökosit sayımlarıyla güçlü bir şekilde bağlantılıdır. Bununla birlikte, eritrositler (miR-486-5p, miR-451, miR-92a ve miR-16) tarafından eksprese edilen plazma miRNA'ları kohort bir çalışmada numunelerin hematokrit değerleri ile sınıflandırılmamasından dolayı kırmızı hücre sayılarıyla ilişkilendirilememiştir. Ancak önemli ölçüde miRNA'nın kanser hücrelerinden ziyade kan hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiğini (20 ila 30 kat) gösteren hemolize kan örneklerinden yapılan çalışmalar mevcuttur. Bu nedenle, bu ve benzeri sonuçlar, miRNA'nın OHA gibi hematolojik bozuklukları anlamak için olası bir aday olabileceğini göstermektedir (Pritchard ve ark. 2012, Rivkin ve 2017).

2.4. İnefektif eritropoez ve OHA

Orak hücre hastalığı (OHA), β -globin genindeki bir nokta mutasyonunun neden olduğu ve β -globin proteininin altıncı pozisyonunda Glutamik asidin-Valine dönüşümü ile sonuçlanan otozomal resesif kalıtsal bir hastalıktır (Korkmaz ve ark. 2021). Ortaya çıkan anormal hemoglobin (HbS), hipoksik koşullar altında polimerize olur ve kırmızı kan

hücresinin (RBC) oraklaşmasına neden olur. OHA, hemolitik anemi, enfeksiyonlara karşı yüksek duyarlılık, tekrarlayan ağırlı vazo-tıkayıcı krizler, felçler, akut göğüs sendromu ve çoklu organ yetmezliği ile karakterize multisistemik bir hastalıktır (Piel ve ark. 2017, El Hoss ve ark. 2020).

Dolaşımdaki RBC'nin patobiyolojisi OHA'de kapsamlı bir şekilde analiz edilmiş olsa da, eritropoez gelişimi ile ilgili bulgular halen yetersizdir. (Hasegawa ve ark. 1998, Rivella 2009). Beta talasemi hastalarında aneminin ana nedeni inefektif eritropoezdır. Buna karşılık, dolaşımdaki oraklaşmış eritrosit hücrelerinin yaşam süresinde belirgin bir azalma, OHA'deki kronik aneminin ana belirleyicisi olarak kabul edilir. Genellikle inefektif eritropoezin anemiye çok az katkıda bulunduğu varsayılır. Bununla birlikte, OHA'de kusurlu terminal eritroid farklılaşmasını öne süren bir dizi sporadik araştırma olmuştur. Örneğin, in vitro olarak farklılaşan veya OHA hastalarının kemik iliğinden izole edilen eritroblastların hipoksik koşullar altında oraklaştığı gösterilmiştir. Bu tür oraklaşma, kemik iliği içindeki geç evre eritroid öncülerinin morfolojisinin değiştiği ve ayrıca yüksek hemoglobin polimer seviyeleri ve retikülositlerin medüller endotelial göçü sırasında meydana gelen artan hücre parçalanması ile transgenik SAD fare modelinde (İnsan orak hücreli glomerülopatinin fare modeli) de rapor edilmiştir (Hasegawa ve ark.1998, Blouin ve ark. 1999). Eritroblastların oraklaşması terminal eritroid farklılaşmasının etkisiz olmasına yol açabileceği varsayılmıştır. Wu ve ark. kemik iliği nakli yapılan OHA'li küçük bir hasta grubunda kemik iliğinde meydana gelen inefektif eritropoezi kanıtlayan ilk araştırmacılar olmuştur. İneffektif eritropoezin OHA'nın patofizyolojisinde önemli bir mekanizma olduğuna dikkat çekmişlerdir (Wu ve ark. 2005).

Finch ve arkadaşları çalışmalarında, şiddetli OHA'lü sürekli transfüze edilen bir kadında eritropoezin ferrokinetik ölçümlerini gerçekleştirerek, kemik iliğinde yüksek radyoaktif demir alımını ve fakat dolaşıma çıkmadığını belirttiler. Dolayısıyla, Kronik transfüzyon ortamında, intramedüller eritroid olgunlaşmasının nispeten yavaş gerçekleşeceğini ve dolayısıyla kemik iliği içindeki orak hemoglobin miktarını artıracığı ve bunun mekanik bir inefektif eritropoez tipine yol açacağı kanatine vardılar (Finch ve ark. 1982).

2.5. GDF-15 ve Hepsidin

GDF-15, insan eritropoezinin son aşamalarında hemoglobine eritroblastlarda güçlü bir şekilde eksprese edilen TGF- β süper ailesinin bir sitokin üyesi olan Hepsidin inhibitör faktörü olarak tanımlanır.

GDF-15, hemoglobinopatide aşırı eksprese edilir ve hepatosit hücre topluluğunda gösterildiği gibi hepsidin sentezini kısmen baskılayarak karaciğer üzerinden kemik iliği sinyaline aracılık edebilir. Literatürde hemoglobinopatide hepsidin ekspresyonunu (demir emilimi artmasına rağmen) uygun olmayan şekilde inhibe etmek için GDF-15'in aktif rol oynadığı belirtilmektedir (Tanno ve ark. 2007, Tamary ve ark. 2008).

Kan transfüzyonları, splenik sekestrasyon krizlerinde olduğu gibi OHA belirtilerini tedavi etmek, oksijen taşıma kapasitesini iyileştirmek ve hemolizi en aza indirmek veya çocuklarda inmenin önlenmesinde olduğu gibi komplikasyonları ve hastalığın ilerlemesini önlemek için uygulanır (Adams ve ark. 1998, Investigators 2005). Yararlarına rağmen, düzenli transfüzyonlar aşırı demir yüklenmesine neden olabilir, çünkü transfüze edilen her kan birimi demir mineralden yaklaşık 200-250 mg içerir. Sağlıklı insanlarda vücudun demir içeriği yaklaşık 4g (Inati ve ark. 2011) iken, kronik olarak transfüzyon yapılan kişiler yılda 5 g ila 10 g depolayabilir (Ganz 2007). Aşırı demir yüklenmesiyle birlikte, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu katalize etme eğilimindeki demir; potansiyel olarak toksik hale gelir ve sonuç olarak oksidatif strese yol açar ve hücrel hasar gelişir (Hoffbrand ve ark. 2012).

Bağırsak demir emiliminin önemli bir düzenleyicisi olan hepsidin 25 aminoasitlik bir diziden oluşan bir polipeptit hormon olup, başta enterositler ve retikuloendotelial sistemin makrofajları olmak üzere çeşitli hücre tiplerinden demirin ihracından sorumlu bir protein olan ferroportine bağlanarak demir homeostazında önemli rol oynar. Hepsidin-ferroportin kompleksi bu hücreler tarafından internalize edilir ve ferroportin bozunmaya uğrar, demir çıkışını bloke eder ve sonuç olarak bağırsak demirinin emiliminde ve biyoyararlanımında bir azalmaya yol açar (Ganz ve Nemeth 2012, Bergamaschi ve ark. 2017).

OHA'ye özgü yoğun fakat etkisiz eritropoez ve anemi, potansiyel olarak hepsidin konsantrasyonunun azalmasına (Nemeth 2008) yol açan ve eser element olan demirin bağırsak emilimini artıran faktörlerdir. Buna karşılık, karakteristik inflamatuvar özellik ve ayrıca artan serum demir konsantrasyonu, bu hormonun transkripsiyonunu indükleyebilir

(Nemeth ve ark. 2003) ve demir emilimini azaltır. Hepsidin sentezini aktive eden ve inhibe eden faktörler OHA hastalarında aynı anda mevcut olabileceğinden, sağlık profesyonelleri tarafından aşırı demir yükü olan bireyleri tedavi etmek için kullanılan yaygın beslenme yaklaşımı, bu mineralin en bol bulunan besin kaynaklarının, özellikle de etlerin, sakatatların ve baklagillerin kısıtlanmasıdır. Bununla birlikte, bu eylemler, aynı zamanda demir kaynağı olan gıdalarda bulunan çinko gibi diğer minerallerin biyoyararlanımını da azaltabilir. Bundan dolayı hastalarda genellikle düşük plazma çinko konsantrasyonları da gözlenir (Zemel ve ark. 2002).

Hepsidin henüz OHA’de yeterince çalışılmamıştır. Çoğu çalışma OHA’li hastaları aşırı demir yüklenmesinin varlığı veya yokluğuna göre ayırmadığından ve bu konsantrasyonları sağlıklı kontrol gruplarıyla karşılaştırmadığından, mevcut birkaç çalışma hepsidin konsantrasyonu ile ilgili yetersiz veriler sunmaktadır (Sayani ve ark. 2008, Fertrin ve ark. 2014). Bu nedenle, özellikle OHA’da hepsidin davranışına ilişkin veriler sınırlı olup, beslenme stratejisini tanımlamak zordur. OHA’deki hepsidin düzeylerine ilişkin veriler çok sınırlıdır ve Hepsidin ekspresyonun, GDF-15/BMP sinyal yolu ile modüle edildiği belirtilmiştir (Cuny ve ark. 2008, Yadin ve ark. 2016). Kearney ve arkadaşları, normal kontrollerle karşılaştırıldığında, dokuz OHA hastasında idrarda hepsidin düzeylerini anlamlı derecede daha düşük buldu. Analizlerinde hepsidin seviyeleri, eritroid proliferasyon belirteçleri ile negatif korelasyon gösterdi, böylece hepsidin üretiminin kronik hemolitik anemide baskılandığı ve eritropoezde artış olduğu teorisini destekledi. Ancak bu bulgu, transfüze edilmemiş OHA hastalarında aşırı demir yükü gelişmediğine dair yaygın bilgiyle çelişmektedir (Kearney ve ark. 2007). Kronik hemoliz OHA’nün temel özelliklerinden biri olmasına rağmen, OHA’nün patofizyolojisi tamamen eritrositler ile ilgili değildir, ancak vazo-tıkayıcı krizlerin ve sonuçta ortaya çıkan doku hasarının, hepsidin üretimini etkileyebilecek bir durum olan kronik enflamasyona neden olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, transfüzyonel aşırı demir yüklenmesi, hepsidin üretimini daha da artırabilir. Bu nedenle, OHA’lü hastalarda hepsidin seviyeleri farklı ve zıt uyaranların etkisi altında olabilir ve muhtemelen belirgin değişkenliğe yol açabilir (Kearney ve ark. 2007). Çok yakın zamanda Kroot ve arkadaşları, OHA’li 16 hastada hepsidin ve eritropoietik, inflamatuvar ve demir durumunun çeşitli serum parametrelerini inceledi (Kroot ve ark. 2009). Popülasyonlarında geniş ölçüde değişiklik gösteren çeşitli serum parametreleri buldular. Özellikle, sadece transfüzyon geçmişi olmayan ve normal transferrin saturasyonu olan OHA li hastalarda çok

yüksek serum ferritin seviyeleri gözlemlemişlerdir. Bu bulguyu, OHA'deki serum ferritininin hepatosit demir yükünün değerlendirilmesinde uygun olmayabileceği şeklinde yorumladılar. Ortalama serum ve idrar hepsidin seviyeleri OHA ve sağlıklı kontrol grubu için benzerdi. Daha doğrusu serum hepsidin seviyeleri 5 OHA hastasında alt saptama sınırının altındayken geri kalanlarda normal sınırlar içindeydi. İlginç ve açıklaması o kadar kolay olmayan bir şekilde, hepsidin düzeyi en düşük olan beş hasta, serum demir indekslerinde belirgin değişiklikler göstermedi (transferrin saturasyonu ve serum ferritini sırasıyla %23-72 ve 40-213 µg/L arasındaydı). Aslında, sadece sTfR arttığında, serum hepsidin seviyeleri daha düşük aralıktaydı veya hatta saptanamıyordu. Sonuçlar, OHA hastalarında da eritropoezinin hepsidini down regüle ettiğini doğruladı (Nemeth ve ark. 2004, Stuart ve Nagel 2004, Walter ve ark. 2006).

Hepsidin birincil olarak hepatositlerde bir öncü propeptid olarak ve daha az ölçüde makrofajlar ve kardiyomiyositler gibi bazı diğer hücre tiplerinde eksprese edilir (Sow ve ark. 2007).

Esas olarak transkripsiyon seviyesinde düzenlenir ve mRNA seviyeleri peptit konsantrasyonları ile iyi uyum sağlar (Ross ve ark. 2012). Hepsidin, duodenal enterositlerin, makrofajların ve hepatositlerin plazma membranında lokalize olan demir transportunda görevli ferroportin 1'e bağlanarak ve onu parçalayarak, demir emilimini ve demir geri dönüşümünü etkin bir şekilde bloke eder (DÉTivaud ve ark. 2005). Sonuç olarak, aşırı ekspresyonu demir eksikliğine ve anemiye yol açarken (Roetto ve ark. 2003), hepsidinin baskılanması aşırı demir yüklenmesine neden olur (Nicolas ve ark. 2002).

Hepsidin'in regülasyonu karmaşıktır ve demir seviyesini duyarlılık mekanizmaları hala tam olarak anlaşılamamıştır. Endotelyal hücrelerden (EC) salınan kemik morfogenetik protein 6'nın (BMP6), hepsidin'i SMAD(small mothers against decapentaplegic homolog) yolağına karşı etkili bir şekilde indüklediği gösterilmiştir. BMP6, karaciğer hücre zarı üzerindeki BMP reseptörüne ve onun ko-reseptörü hemojuvelin (HJV) ile bağlanır ve tip I (ALK reseptörü tirozin kinaz [ALK]2 ve ALK3) ile tip II BMP reseptörlerini birleştiren bir kompleks oluşturur. (SMAD1/5/8'in fosforilasyonu). İkincisi, SMAD kompleksini oluşturmak için SMAD4 ile etkileşime girer ve daha sonra çekirdeğe yer değiştirir ve hepsidin promotörüne bağlanır. DNA bağlanma inhibitörü 1 (Id1), protein atonal homolog 8 ve inhibitör Smad6 ve Smad7, BMP-SMAD yolunun diğer önemli modülatörleridir. Ek

Son zamanlarda, bir çalışma, karaciğer sinüzoidal endotel hücrelerinin baskın olarak bazal BMP6 sekresyonu kaynağı olduğunu ve demirle düzenlenen hepsidin ekspresyonuna katıldığını göstermiştir (Chiou ve ark. 2019). Karaciğer sinüzoidal endotel hücrelerinin sistemik demir düzenlemesindeki rolü sadece marjinal olarak çalışılmış olsa da, kan-beyin bariyeri ve retina üzerine yapılan birkaç çalışma, demir algılama ve taşınmasında rol oynayabileceklerini düşündürmektedir (Erdei ve ark. 2018, Baumann ve ark. 2019). Ayrıca, EC'ler demir değişikliklerine oldukça duyarlıdır (Erdei ve ark. 2018, Noguchi ve ark. 2020) ve son olarak, BMP aktivitesini antagonize edebilen ve hepsidin'i düzenleyebilen bir otokrin protein olan BMPER (BMP-binding endothelial regulator) salgırlar (Patel ve ark. 2012). Sonuç olarak BMP6-SMAD sinyal yolunun, demir aracılı hepsidin regülasyonu için zaruri olduğu düşünülmektedir.

Orak Hücreli Anemi (OHA) hastalarında posttranskripsiyonel yolak üzerinden hepsidin gen ekspresyonunu engelleyen miRNA'ların tespiti hem hepsidin moleküler regülasyonun aydınlatılmasına katkı sağlayabilir hem de aşırı demir yükünün bir göstergesi olabileceğinden yeni tedavi yaklaşımlarına öncülük edebilir.

Ayrıca; antihepsidin etkili GDF-15' in ilişkili olabileceği miRNA ların tespit edilmesi orak hücre hastalığında tekrarlayan hemolitik kriz ve tranfüzyona bağlı komplikasyonların yönetiminde aşırı demir yükünü saptamak ve hastaların şelatör kullanımını değerlendirmek için kullanılacak bir tanısal belirteç olabilir.

Bu çalışmada; Orak hücreli anemi hastalarında, ekspresyonu inefektif eritropoezle indüklenen ve hepsidin ekspresyonunu baskılayarak aşırı demir birikimine katkıda bulunabilen GDF-15'in ekspresyonunun posttranskripsiyonel regülasyonunda miRNA'ların rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Giriş

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi ile Hatay Devlet Hastanesinde orak hücreli anemi tanısıyla takip edilen 0-18 yaş aralığında olan gönüllü hasta grubundan çalışma grubu (Grup 1, n:33) oluşturuldu.

Benzer yaş ve cinsiyette olan, herhangi bir kronik hastalığı olmayan 0-18 yaş aralığındaki olağan sağlık kontrolü nedeni ile Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama Araştırma ve Hastanesi sağlam çocuk polikliniğine başvuran 30 sağlıklı gönüllü kontrol grubu (Grup 2, n:30) olarak alındı.

12 yaşından küçük çocuk grubundaki her birey için sadece velisinden aydınlatılmış onam formu alınırken, 12 yaş üstü çocuklarda her birey için hem kendisinden hem de velisinden aydınlatılmış onam alındı.

Çalışmamız Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi, Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay (Tarih:10 /12 /2020, Karar No: 05) alındıktan sonra prospektif tanımlayıcı çalışma olarak yapılmıştır.

3.2. Örneklerin Toplanması

Çalışma ve kontrol grubundan flebotomistler tarafından sabah aç karnına ve toplam iki (2) tüp olacak şekilde venöz kan numuneleri alındı.

Örnekler EDTA'lı tüplere alındıktan sonra, aynı gün tam kan sayım cihazı vasıtasıyla hemogram değerleri çalışılıp HPLC ile hemoglobin tiplendirilmesi yapıldı ve sonuçlar kaydedildi.

RNA izolasyonu için kullanılacak kan örnekleri; alındıktan en geç 2 saat içinde, RNA Saver solüsyonu ile karıştırıldı ve etiketlenerek -80°C'de derin dondurucuya koyularak çalışma gününe kadar muhafaza edildi.

3.3 Kullanılan Cihaz ve Kimyasal Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasallar, cihazlar ve ticari isimleri ile kullanılan ticari kitler Çizelge 3.1, Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasallar

Kullanılan Kimyasallar	Markası
İzopropanol	QIAGEN
Etanol	QIAGEN
DNAaz/RNAaz içermeyen su	QIAGEN
RNA save solüsyonu	QIAGEN
5X RT Tampon	ABM
Dntp	ABM
Primerler	ABM
Total RNA ya da Poli (A)+ mRNA	ABM
Onescript artı RTAse	ABM
Nükleaz içermeyen su	ABM
ELISA Mikroplaka	FINE TEST
Liyofilizie standart	FINE TEST
Numune/Standart Seyreltme Tamponu	FINE TEST
Biotin İşaretli Antikor(Konsantre)	FINE TEST
Antikor Seyreltme Tamponu	FINE TEST
HRP-Streptavidin Konjugatı(SABC)	FINE TEST
SABC Seyreltme Tamponu	FINE TEST
TMB Substratı	FINE TEST
Stop Solusyonu	FINE TEST
Yıkama Tamponu(25X)	FINE TEST
Plaka Mühürleyici	FINE TEST
RNeasy UCP MinElute spin kolonları	QIAGEN
Toplama tüpleri (1.5 ml)	QIAGEN
Toplama tüpleri (2.0 ml)	QIAGEN
Tampon RPL	QIAGEN
Tampon RPP	QIAGEN
Tampon RWT	QIAGEN
Tampon RPE	QIAGEN
RNase içermeyen su	QIAGEN

Çizelge 3.2.Cihazlar ve ticari isimleri

Kullanılan cihazlar	Markası
Real-Time PCR Cycler	Qiagen, Rotor Gene Q
Thermal Cycler	Bio-Rad, T100
Spektrofotometre	Thermo, Multiskan GO
HPLC	BioRad
Kan sayım cihazı	Mindray BC 6800
Vorteks	VELP Scientifica, Classic
Soğutmalı santrifüj	Beckman Coulter, Microfuge 20R
Mikrosantrifüj	DAIHAN, Centrifuge CF-5
-20 C Derin dondurucu	Bosch
+4 C Derin Dondurucu	Bosch

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan ticari kitler.

Ticari kitin adı	Markası	Katalog No
miRCURY LNA™ RT kit	QIAGEN	339340
Preamp master Mix Kit	FLUIDIGM	211101723
miRCURY LNA™RNA spike-in kit	QIAGEN	339390
OneScript PluOHANASynthesis Kit	ABM	G236
miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit	QIAGEN	217204
Human Hepc(Hepcidin) ELISA Kit	FINE TEST	EH3221
Human GDF-15(Growth Differentiation Factor 15) ELISA Kit	FINE TEST	EH0150

3.4 Örneklerin çalışılması

3.4.1 Tam Kan Sayımı Ölçümü

Tam kan sayımı ölçümleri Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarında Mindray BC6800 China, Tam kan sayımı cihazı kullanılarak yapılmıştır.

3.4.2 Hemoglobin Varyant Analizi

3.4.2.1 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Hemoglobin varyant analizi, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında bulunan **HPLC Biorad variant II** cihazı kullanılarak yapılmıştır.

3.4.3 Elisa yöntemi

Elisa çalışması için biyokimya tüpüne (Jel separatör ve pıhtılaşma aktivatörü içeren sarı kapaklı) 3 mL kan örneği alındı. Biyokimya örnekleri 20 dakika pıhtılaşma için bekletildi. Sonrasında 4000 rpm'de 15 dakika süreyle santrüfjü edilerek serumları ayrıldı ve ayrılan serum örnekleri -80 °C'de ELISA yapılmak üzere saklandı. Çalışmadan bir gün önce -20 °C'ye alındı çalışmanın yapılacağı gün oda sıcaklığında eritilmesini müteakip serum örneklerinden GDF-15 ve Hepsidin düzeyleri Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD ELISA Laboratuvarı'nda çalışıldı.

GDF-15 ve Hepsidin ölçümleri kit prospektusundaki deney protokolüne uygun yapıldı.

Örnekleri ve reaktifleri seyreltirken tamamen ve eşit şekilde karıştırıldı.

TMB kuyulara eklemekten önce, TMB Substrate'i 37°C'de 30 dakika bekletildi. Her test için standart bir eğri çizildi.

1. Sırasıyla standart, test örnekleri (en az 1/2 oranında Örnek Seyreltme Tamponu ile seyreltilen örnekler) ve kontrol (boş) kuyucukları önceden kaplanmış plate üzerinde belirlenerek ayarlandı. Sonrasında bunların konumları kaydedildi. Standart, numune ve kontrol kuyuları eklemekten önce plate iki kez yıkandı.

2. Standartları Hazırlama: Sıfır tüp, 1 tüp, 2 tüp, 3 tüp, 4 tüp, 5 tüp, 6 tüp ve Numune Seyreltme Tamponundan 100 µL'lik kısmı standart kuyucuklara kondu.

3. Test numunesi kuyucuklarına 100 µL uygun şekilde seyreltilmiş numune eklendi.

4. Plate, üstü örtülerek dökülmeyecek şekilde kapatıldı ve 37°C'de 90 dakika inkübe edildi.

5. Plate etüvden çıkarıldı ve içeriği atıldı ve iki kez Tampon ile yıkandı. Kuyuların tamamen kurummasına izin verilmedi.

6. Kuyucuklara (standart, test örneği ve kontrol) 100 µL Biotin-etiketli antikor çalışma solüsyonu eklendi. Çözelti her kuyucuğa dikkatlice eklendi, plate kapatıldı ve 37°C’de 60 dakika inkübe edildi.

7. Plate açıldı ve bu kez üç defa Yıkama Tamponu ile yıkanıp ve Yıkama Tamponunun her seferinde 1-2 dakika kuyularda kalmasına izin verildi.

8. Her kuyucuğa 100 µL SABC(HRP-Streptavidin Konjugatı) çözeltisi ekleyip, plaka kapatıldı ve 37°C’de 30 dakika inkübe edildi.

9. Tekrar beş kez yukarıda bahsedildiği gibi yıkama yapıldı.

10. Her kuyucuğa 90 µL TMB Substrat eklendi, plate kapatıldı ve karanlıkta 37°C’de 10-20 dakika inkübe edildi.

11. Her kuyucuğa 50 µL stop çözeltisi eklendi. Renk hemen sarıya döndü. Stop çözelti ekleme prosedürü TMB Substrate Solution ile aynı idi.

12. OD Ölçümü: Stop çözeltisi eklendikten hemen sonra Microplate Reader’da 450nm’de absorbansta OD’yi okundu.

GEN EKSPRESYONU VE MİKRORNA ANALİZİ İÇİN K₃ EDTA’LI TÜPE ALINAN TAM KAN ÖRNEKLERİNDEN PLAZMA AYIRMA PROTOKOLÜ

Tam Kan alındıktan sonra maksimum iki saat içerisinde işlemler tamamlandı.

1. Alınan kan numunesi asgari 8-10 kez yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı.
2. Tüpler 1000 g’de 15 dakika santrifüj edildi.
3. Santrifüj işlemi sonunda tüpler sarsılmadan dikkatlice santrifüjden çıkarılır ve yavaşça kapakları açılır ve üstteki plazma tabakası ile alttaki kırmızı kan hücre tabakası arasında bulunan buffy coat kısmına dokunmadan, plazmanın en üst kısmından 200 µl’lik pipetlerle (DNase, RNase Free, filtreli pipet uçları kullanılarak) 4-5 kez pipetleme yaparak toplamda 1.000 µl olacak şekilde plazma steril (DNase-RNase free) ependorf tüplere toplandı.

4. Tüpler 2.000 g'de 5 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası, yeni bir steril ependorf tüpüne total hacmin %80'inine yakın plazma transfer edildi.
6. Bu şekilde ayrılan plazma örnekleri -80°C' lik derin dondurucuda saklandı.

3.4.4 RNA izolasyonu

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD Laboratuvarı'nda yapıldı.

Mor tüpe kan alındıktan sonra maksimum iki saat içerisinde işlemler tamamlandı.

300 µl tam kan örneği 1,5 ml ependorf tüpüne alındı. 700 µl RNA SAVE' ependorf tüpüne alınarak RNA'nın izolasyonu yapıldı.

RNA'nın izolasyonu deney protokolü

1. 250 µl koagüle olmamış tam kan üzerine 1 ml HT Tamponu eklenir ve karışım homojen olana dek vortekslendi.
2. Buz üzerinde 5 dk. inkübasyon yapıldı.
3. 200µl kloroform eklenip, 15 sn. vorteks ile homojen hale gelene kadar karıştırılarak ve buz üzerinde 10 dk. inkübasyona bırakıldı.
4. Örnek 4° C'de 12000 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi. Santrifüjden sonra karışım; altta fenol kloroform ve üstte RNA içeren renksiz faz * olacak şekilde iki kısma ayrıldı. Üstteki renksiz faz pipet yardımıyla alttaki diğer fazların karışmasına olanak vermeyecek şekilde dikkatlice yeni bir Rnaz bulundurmeyen boş tüpe aktarıldı.
5. Alınan renksiz fazın hacmine göre üzerine ½ oranında önceden soğutulmuş EtOH(etanol) (%100) Karışım vorteksle iyice karıştırıldı, Karışım filtreli tüpe aktarıldı 4° C'de 12000 rpm'de 30 sn. santrifüj edilip ve filtrenin altındaki tüpte toplanan sıvı atıldı.

* Renksiz faz ve etanol karışımı kolon hacminden fazla olduğu durumlarda, kalan karışım filtreli tüpe yüklenip tekrar santrifüj edildi. (Filtreler 800 µl hacminde sıvı almaktadır.)

6. Filtreye 500 µl RY1 eklenip ve 4°C’de 12000 rpm’de 30 sn. kalacak şekilde santrifüj edildikten sonra yine altta kalan sıvı atıldı.

7. Daha sonra filtreye 500 µl RY2 eklenip, bir dk. oda sıcaklığında inkübasyon yapıldıktan ve 4°C’de 12000 rpm’de 30 sn. santrifüj edildikten sonra altta kalan sıvı atıldı.

8. Filtreli tüp 12000 rpm’de iki dk. kuruması için santrifüj edildi.

9. Kolon 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilip direkt olarak membran üzerine 30-100 µl DEPC ile muamele edilmiş su eklendi. İki dk. oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan, sonra RNA’yı bu su içerisinde toplamak için 12000 rpm’de iki dk. santrifüj edildi. Elde edilen RNA Uzun süreli saklama için -80° C’de muhafaza edildi.

3.4.5 cDNA elde edilmesi

RNA ‘lardan cDNA elde edilmesi protokolü

1. Kullanmadan önce bileşenler tek tek ayrı iyice çözdürüldü, karıştırılıp reaksiyonlar buz üzerinde birleştirildi.

2. Reaksiyon nazıkçe karıştırılıp, kısaca santrifüjlendi.

3. 50-55°C’de 15 dakika inkübe ederek cDNA sentezini gerçekleştirildi.

- Kullanılan Primerler/ RNA oranı, sentezlenen ortalama cDNA uzunluğu açısından önemli olmasından dolayı Primer/ RNA oranının yüksek olması beklenir. Bu durum, daha kısa (~500 bp) cDNA verimine neden olurken, düşük Primer/RNA oranı, daha uzun cDNA ürünlerine yol açar. Primerlerin düşük tavlama sıcaklığı nedeniyle, ters transkripsiyondan önce primer tavlamaına izin vermek için 25°C’de 10 dakika inkübe edildi.

- cDNA’yı, tamamlayıcı RNA’yı çıkarmak için 1 µl E. coli RNase H (Kat. No. E018) eklendi ve 37°C’de 20 dakika inkübe edildi.

3.4.6 miRNA analizi

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD Laboratuvarında miRNA analizi yapıldı.

İleri düzey QIAGEN miRNeasy Serum/Plazma Protokolü

Deneyin tüm adımları oda ısısında gerçekleştirildi.

RWT ve RPE tamponları kullanımdan önce, şişe üzerinde yazan hacimde %96-100 etanol eklendi

1. Plazma örnekleri çözdürüldü.
2. Mikrosantrifüj tüpüne 200 ul örnek eklendi.
3. Örnek üzerine 60 ul tampon RPL ekleyin ve >5 sn. vorteks ile karıştırın, oda sıcaklığında 3 dk. bekletildi.
4. Tüpe 20 ul tampon RPP eklendi, tüpü >20 sn. vorteks ile iyice karıştırılıp ve oda sıcaklığında 3 dk. bekletildi.
Tüpün iyice karıştırıldı.
5. Tüpü süre bitiminde 12.000 x g'de 3 dk. santrifüf edin ve pelleti çökmesi sağlandı. Süpernatant berraktı.
6. Süpernatantı, yaklaşık 230 ul yeni bir tüpe alın ve üzerine 1/1 hacimde isopropanol eklenip ve vorteks ile iyice karıştırıldı.
7. Kolonlara, tüpün tüm içeriğini aktarılıp ve 8.000 x g'de 15 sn. santrifüj edildip Tüpteki süzüntü atıldı.
8. Kolona 700 ul tampon RWT eklendi ve 8.000 x g'de 15 sn. santrifüj edilip. Tüpteki süzüntü atıldı.
9. Daha sonra Kolona 500 ul tampon RPE eklendi ve 8.000 x g'de 15 sn. santrifüj edilip. Tüpteki süzüntü atıldı.
10. Sonraki aşamada 500 ul %80'lik alkol eklendi 10.000 x g'de iki dk. santrifüj edilip Tüpteki süzüntü atıldı.
Bu adımda, kolonu tüpten alırken süzüntü ile temas edilmedi.
11. Kolon paket içerisinde olan yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne alındı, tüpü ağzı açık şekilde 5 dk. maksimum hızda santrifüj edildi.
Kolondan etanolün tamamen uzaklaşması sağlandı.

12. Kolon paket içerisinde olan yeni bir 1,5 mL tüp içerisine alınıp, membranın tam ortasına gelecek şekilde 20 ul RNase free sudan pipetlendi, tüpü kapağı açık halde bir dk. oda sıcaklığında bekletildi.
13. Süre bitiminde, tüpü maksimum hızda bir dk. santrifüj edilip RNA membrandan süzüldü.
- Bu işlem sonrasında yaklaşık 18 ul RNA süzümü elde edildi.

A. cDNA Hazırlanması (miRCURY LNA RT Kit, Qiagen),

Aşağıdaki karışım hazırlandı.

5x Reaction Buffer	120 µl
Enzyme mix	60 µl
Spike in Kontrol Karışımı RT*	60 µl
TOPLAM	240 µl

*cDNA aşamasında kullanılacak olan Spike'in Kontrol Karışımının hazırlanması Ek 1 de anlatıldı.

Bu karışım bir 8 li strip tüpün tüm kuyularına 25 şer µl olarak transfer edildi. Buradan 8 kanallı pipet yardımı ile 1.75 er µl alınarak temiz bir Piko Plate'in tüm kuyularına pipetlendi.

RNA her kuyuya, yukarıda transferi yapılan karışımların üzerine 3.25 er µl olmak üzere pipetlendi. Plate film ile kaplandı ve karıştırıcıda elle bastırılarak 10 saniye karıştırıldı.

Plate santrifüj de bir dakika santrifüj edilip ve Piko Thermal Cycler da aşağıdaki program çalıştırıldı.

42°C 60 dakika

95°C 5 dakika

4°C ∞

Thermal programın sonunda plate'in oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Plate santrifüjde bir dakika santrifüj edilip Preamplifikasyon hemen gerçekleştirildi.

B. PreAmplifikasyon Hazırlanması:

Preamplifikasyon primer karışımı (Pool Primer Mix) her plate için bir kez aşağıdaki şekilde hazırlandı. Primer plate'i santrifüjde iki dakika santrifüj edilip. Üzerindeki film açılarak ve her kuyuya 9 µl 1x TE Buffer ve 1x DNA Suspension Buffer ya da DNase, RNase Free su eklendi. Plate karıştırıcıda üç dakika 2000 rpm de karıştırılıp santrifüjde bir dakika santrifüj edildi. 4°C 30 dakika bekletilip ve yukarıdaki karıştırma ve santrifüj işlemleri tekrarlandı.

Bir rezervuarın içerisine bu primer kuyularından 4,5 er µl primer konularak hepsi birbirine karıştırıldı. Bu karışım halindeki primerlerin üzerine 18 µl 1x TE Buffer ya da 1x DNA Suspension Buffer ya da DNase, RNase Free su eklenip iyice karıştırılarak ve 150 şer µl olacak şekilde üç ayrı SafeLock Eppendorf tüpüne konularak uygun şekilde etiketlendi.

Plate içerisinde kalan primerler film ile kaplanarak aşağıdaki Dinamik Array hazırlanması kısmına kadar 4°C de saklandı.

cDNA plate'i bir plate taşıyıcı üzerine konulup Film açıldı. Piko plate in tüm kuyularından birer µl yeni temiz bir Piko plate'e cDNA örnekleri pipetlendi. Bir rezervuara 5 mL kadar DNase, RNase-free su konuldu. Bu yeni Piko Plate'in her kuyusuna 9 ar µl bu sudan eklenip, yeni bir film ile plate kaplanıp, plate karıştırıcıda 2000 rpm de üç dakika karıştırıldı. Plate santrifüj de bir dakika santrifüj edildi.

Preamplifikasyon deneyi için aşağıdaki karışım hazırlandı.

Pre Amp Master Mix Reagent Kit	120 µl
(Fluidigm, 100-5580 veya 100-5581)	
Pool Primer Mix	150 µl
DNase, RNase Free su	180 µl
TOPLAM	450 µl

Bu karışım bir 8 li strip tüpün tüm kuyularına 54 er µl olarak transfer edilip buradan 8 kanallı pipet yardımı ile 3.75 er µl alınarak temiz bir Piko plate'in tüm kuyularına pipetlendi.

Sulandırılmış olan cDNA örneklerinden her kuyuya 1.25 er µl olmak üzere pipetlenip, Plate, film ile kaplanarak, plate karıştırıcıda 3000 rpm de üç dakika karıştırıldı. Plate santrifüj de bir dakika santrifüj edilip ve Piko Thermal Cycler da aşağıdaki PreAmp Protokolü çalıştırıldı.

PreAmp Protokolü

95 °C	2 dakika	Başlangıç Dentürasyonu
95 °C	15 saniye	
60 °C	4 dakika	15 döngü
4 °C	∞	

Thermal programın sonunda plate'in oda sıcaklığına gelmesi beklenip

Plate santrifüj de bir dakika santrifüj edilip ardından exonuclease adımına geçildi.

C. Exonuclease Adımı, New England Biolabs:

Aşağıdaki karışım hazırlandı.

Exonuclease I Reaction Buffer	24 µl
Exonuclease I	48 µl
Nucleaz Free Water	168 µl

TOPLAM	240 µl
---------------	---------------

Bu karışım bir 8 li strip tüpün tüm kuyularına 30 er µl olarak transfer edilip. Buradan 8 kanallı pipet yardımı ile 2.00 şer µl alınarak preamplifiye örnek plate in tümüne pipetlendi. Plate, film ile kaplanıp, plate karıştırıcıda 3000 rpm de üç dakika karıştırılarak Plate santrifüj de bir dakika santrifüj edildive Plate 384 lük Thermal Cycler da eğer aşağıdaki Exonuclease Protokolü çalıştırıldı.

Exonuclease Protokolü

37 ° C	30 dakika
80 ° C	15 dakika
4°C	∞

Thermal programın sonunda plate'in oda sıcaklığına gelmesi beklenerek Plate santrifüj de bir dakika santrifüj edildi. Her kuyuya 18 er µl DNase, RNasefree su eklenip Yeni bir film ile plate kaplanarak, plate karıştırıcıda 3000 rpm de üç dakika karıştırıldı. Plate santrifüj de bir dakika santrifüj edildi.

C. Dynamic Array (Dinamik Dizi) Hazırlanması

Bu aşama da 6 ayrı adım vardı;

1. Dynamic Array'ın PRIME edilmesi,
2. Assay Plate'inin hazırlanması,
3. Örneklerin hazırlanması,
4. Dynamic Array'e pipetlemelerin yapılması,
5. IFC Controller da Dynamic Array'in Load edilmesi,
6. Dynamic Array'in BioMark da çalışılması Aşamaları aşağıdaki gibi yapıldı.

1. Dynamic Array'ın PRIME edilmesi:

Bir adet Dynamic Array'e kontrol sıvılar enjekte edilip ve Dynamic Array IFC Controller da PRIME edildi. Bu işlem tam 20 dakika sürdü. PRIME işlemi devam ederken aşağıdaki aşamaya geçildi.

2. Assay Plate'inin Hazırlanması:

Pool Primer Mix hazırlandıktan sonra plate de kalan primerler oda sıcaklığına getirildi.

Aşağıdaki karışım hazırlandı. Bu karışım bir adet Assay Plate için yeterliydi (ekstra hacimler hesaplamaya dahil edilmiştir).

2X Assay Loading Reagent (Cat. No:100-7611, Fluidigm)	1260 µl
DNase, RNase Free su	630 µl
TOPLAM	1890 µl

Bu karışım bir 8 li strip tüpün tüm kuyularına 230 ar µl olarak transfer edilip Assay plate in her bir kuyusuna bu karışımdan 13,5 er µl pipetlendi.

Assay Plate film ile kaplanıp. Plate karıştırıcıda 2000 rpm de 3 dakika karıştırılarak Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edildi.

Hazırlanan bu karışım Dynamic Array lere pipetlemeye hazırды ve 3 adet Dynamic Array için yeterliydi.

3. Dinamik array için karışımın Hazırlanması:

Aşağıdaki karışım hazırlanırken ekstra hacimler hesaplamaya dahil edilmiştir.

2x TaqMan Gene Expression Master Mix (Cat. No:4370048,Thermo Fisher)	360 µl
20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Cat.No:100-7609, Fluidigm)	36 µl
20x EvaGreen (Cat.No: 31000, Biotium)	36 µl
DNase, RNase Free su	108 µl
TOPLAM	540 µl

Bu karışım bir Piko plate in bir kolonuna 65 er µl olarak transfer edilip bu karışımdan 4,5 er µl temiz bir Piko plate in tüm kuyularına pipetlenerek, Sulandırılmış olan preamplifiye ürünlerin üzerindeki film açıldı. Her bir preamplifiye örnek den 1,5 er µl bu plate' e transfer edilip Plate yeni bir film ile kaplandı. Plate, karıştırıcıda 2000 rpm de üç dakika karıştırılıp 30 saniye santrifüje edildi.

4. Dynamic Array'e Pipetlemelerin Yapılması:

Assay pipetlemeleri için Viaflo Voyager (12,5 µl) de şu program yapıldı. Aspirate 4.75 µl, Dispense 4.50 µl. Tüm kuyularda ki Assayler bu şekilde Dynamic Array e transfer edildi. Örnek pipetlemeleri için Viaflo Voyager (12,5 µl) de Assay için yapılan program kullanıldı. Tüm kuyularda ki Örnekler bu şekilde Dynamic Array e transfer edildi.

5. IFC Controller da Dynamic Array'in Load edilmesi:

Dynamic Array IFC Controller'a yerleştirilip, LOAD Seçeneği seçilerek LOAD işlemi başlatıldı. Bu işlemi başlattıktan sonra BioMark Data Collection yazılımı başlatılarak ve "Double Click to Turn Lamp On" kısmına çift tıklanarak BioMark'ın lambası çalıştırıldı.

6. Dynamic Array'in BioMark da çalışılması:

Dynamic Array IFC Controller dan alınıp Dynamic Array altındaki mavi filmin uzaklaştırıldığından emin olundu. Chip yüzeyinin temiz olup olmadığı kontrol edilerek Dynamic Array BioMark'a barcode kısmı dışarı bakacak şekilde yerleştirildi.

BioMark Data Collection yazılımı yardımı ile Dynamic Array çalıştırılarak. Verilerin kaydedileceği yer ve Dosya adı seçildikten sonra diğer sayfa da. "Gene Expression" seçildi. Passive Reference Dye olarak "ROX" seçilerek, "Probe Type" kısmında "EvaGreen" seçildi.

Sonraki ekranda Protokoller arasından "Exiqon miRNA Protokol" seçilir ve Program başlatıldı.

Biomark Thermal Protokol:

70 °C 2400 sn.  Thermal mix

60 °C 30 sn.

95 °C 600 sn.  Hot start

95 °C 15 sn.

60 °C 60 sn.  30 PCR Cycle

60-95 °C melting curve

EK 1.**Spike in Karışımı Hazırlanması (cDNA aşaması için):**

cel-miR-39-3p, RNA Spike-in template (RNA Spike-in Kit, Qiagen, 339390)

UniSp6, RNA Spike-in template (miRCURY LNA RT Kit, 8-64 rxns, Qiagen, 339340)

Bu iki Spike-in kontrol dried-down (kuru) olarak gelmektedir. Aşağıdaki adımlar takip edilerek sulandırılarak karıştırıldı.

Sulandırma;

1. Tüpler mikro santrifüjde maksimum hızda 2 dakika santrifüj edildi
2. UniSp6 tüpüne 80 µl DNase, RNase Free su pipetlendi.
3. Vorteks ile 15 saniye karıştırıldı ve mikro santrifüjde 10 saniye 10000 rpm de santrifüj edildi.
4. Buz içerisinde 30 dakika ya da +4°C de 45 dakika bekletildi.
5. UniSp6 tüpünün tüm içeriği cel-miR-39-3p tüpüne aktarıldı.
6. Vorteks ile 15 saniye karıştırıldı ve mikro santrifüjde 10 saniye 10000 rpm de santrifüj edildi.
7. Buz içerisinde 30 dakika ya da +4°C de 45 dakika bekletildi.
8. Hazırlanan bu tüp “Spike in Kontrol Karışımı RT” şeklinde etiketlenir ve yukarıda cDNA Hazırlanması adımındaki şekilde cDNA reaksiyonlarına eklendi.

EK 2.

UniSp2, UniSp4, UniSp5 Hazırlanması (RNA izolasyonu için)

Sulandırma;

1. Tüpler mikro santrifüjde maksimum hızda 2 dakika santrifüj edildi.
2. UniSp2, UniSp4, UniSp5 tüpüne 80 µl DNase, RNase Free su pipetlendi.
3. Buz içerisinde 20 dakika bekletildi.
4. Vorteks ile 15 saniye karıştırılıp ve mikro santrifüjde 10 saniye 10000 rpm de santrifüj edildi.
5. RNA izolasyonu öncesi, izolasyon kitinin lizis tamponuna her örnek için 1 ul olacak şekilde eklenerek karışım taze hazırlandı.
7. UniSp 2,4,5 karışımı Lizis tamponu ile karıştırılarak örnek üzerine eklendi.

3.4.7 Gen ekspresyon analizi

Plazmadan ticari kitlerle izole edilen mRNA'lar hesaplama tablosu kullanılarak seyretilti.

5X RT BUFFER	2 µl(1örnek için)
Dntp	0.5 µl(1örnek için)
Primerler	0.5 µl(1örnek için)
Total RNA ya da Poli (A)+ mRNA	0.25 µl(1örnek için)
Onescript plus RTase	0.5 µl(1örnek için)
Nuclease free water	10 µl(1örnek için)

Çalışmaya alınan hasta ve kontrol gruplarındaki miRNA ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta Ct}$ formülü ile hesaplandı. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi olarak da bilinen delta-delta Ct yöntemi, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR olarak da bilinir) gerçekleştirirken numunelerin görel kat gen ifadesini hesaplamak için kullanılan basit bir formüldür. Livak ve Schmittgen tarafından 2001 yılında geliştirilen delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) matematiksel modeli, genlerin görel ifade düzeylerini belirlemek için en yaygın kullanılan modeldir. Bu modelde görel ifade; $\Delta Ct = Ct(\text{hedef gen}) - Ct(\text{referans gen})$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{çalışma grubu}) - \Delta Ct(\text{kontrol grubu ortalaması})$ formülü ile belirlenir. Çalışılan bir genin ekspresyon seviyesindeki kontrol grubuna kıyasla değişiklik, kat değişimi (Fold Change: FC) olarak

adlandırılır. Bir genin ekspresyon seviyesindeki değişiklik; $FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülasyonu ile hesaplanır. Bu matematiksel model, miRNA gen ekspresyonlarını araştıran çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Livak ve Schmittgen 2001).

Örneğin; çalışmamızın kontrol grubunda hsa let7b-5p için bir hastada hesaplama yapacak olursak;

Hedef genimiz olan hsa let7b-5p'nin Ct değeri: 11,3; housekeeping olarak kullandığımız hsa-miR-188-5p için Ct değeri: 19.54 idi. $\Delta Ct = Ct(\text{hedef gen}) - Ct(\text{referans gen})$ formülüne göre $\Delta Ct = Ct(\text{hedef gen:11,3}) - Ct(\text{referans gen:19,54})$ olduğundan $\Delta Ct(\text{çalışma grubu}) = -8,24$. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{çalışma grubu}) - \Delta Ct(\text{kontrol grubu ortalaması})$ formülü olduğundan $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{çalışma grubu:-8,24}) - \Delta Ct(\text{kontrol grubu ortalaması:-7,67})$ yani $\Delta\Delta Ct = -0,57$ olarak bulundu. Kat değişimi (FC:fold change) olarak kullandığımız $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yani $2^{-(-0,57)} = 1.49$ olarak hesaplanmıştır. Sonucun 1'den büyük olması hedef genin, referans genden (housekeeping gen) daha fazla replike olduğunu göstermektedir (Rao ve ark. 2013).

GDF-15, HEPsİDİN, GEN EKSPRESYONU DENEY PROTOKOLÜ:

1. GoTaq® qPCR Master Mix'i çözülmesi sağlandı. Ana karışımı oda sıcaklığında çözüldü.
2. Karıştırmak için GoTaq® qPCR Master Mix'i 3-5 saniye vortekslendi.
3. 300nM'lik bir nihai konsantrasyon için 20µl reaksiyon başına 0.2µl eklendi.
4. Karıştırmak için 3-5 saniye vortekslendi.

Reaksiyon Karışımını Birleştirme

GoTaq® qPCR Master Mix, reaksiyon kurulumunun oda sıcaklığında gerçekleştirilmesine izin veren bir sıcak başlangıç kimyası kullanır.

Bu protokoldeki son reaksiyon hacmi 20µl'dir. Burada verilen hacimler, daha büyük veya daha küçük reaksiyon hacimleri için ölçeklenebilir.

1. GoTaq® Ana Karışımı ve Nükleazsız Suyu çözüldü. GoTaq® Master Mix'i oda sıcaklığında çözüldü.
2. Karıştırmak için GoTaq® Master Mix'i 3-5 saniye vortekslendi. Havalandırmayı önlemek için düşük hızda vortekslendi.

3. Negatif kontrol reaksiyonları dahil, oluşturulacak reaksiyonların sayısını belirlendi.
Pipetleme hatasını telafi etmek için bu numaraya 1 reaksiyon eklendi.

4. GoTaq® qPCR Master Mix, PCR primerleri ve Nükleazsız Suyu aşağıda açıklandığı gibi birleştirilerek reaksiyon karışımını (eksi DNA şablonu) hazırlandı. DNA şablonu Adım 6'da eklendi. Karıştırmak için kısaca vortekslendi.

İçerik	Hacim	Son konsantrasyon
GoTaq® qPCR Master Mix (2X)	10µl	1X
Forward Primer (20X)	2µl	200nM–1µM
Reverse Primer (20X)	2µl	200nM–1µM
Ek CXR Referans Boyası (gerekirse)	0.2µl her reaksiyon için	300nM
Nuclease-Free Water	20µl'lik bir son hacme	

Not: Primer konsantrasyonu, her bir primer kombinasyonu için optimize edilmelidir.

5. Her bir PCR tüpüne veya optik dereceli bir PCR plakasının kuyusuna uygun hacimde reaksiyon karışımı eklendi.
6. DNA şablonunu (veya şablonsuz kontrol reaksiyonları için suyu) reaksiyon plakasının uygun kuyularına eklendi.
7. Tüpleri veya optik plakayı kapatın ve alttaki kuyuların içeriğini toplamak için kısa süre santrifüjlendi. Numuneler termal döngü için hazır hale geldi.

Isı Döngüsü

Standart döngü koşullarında (aşağıdaki adımlar izlenerek) yapıldı.

ADIMLAR	Cycles	SICAKLIK	SÜRE
GoTaq® Hot Start Polymeraz aktivasyonu	1	95°C	2 dakika
Denaturasyon	40	95°C	15 saniye
Annealing ve		60°C	1 dakika

GoTaq® qPCR Master Mix ile SYBR® Green I testleri için oluşturulan cihaz optik ayarları kullanıldı.

İSTATİSTİKSEL İNCELEME

Araştırmamızda elde edilen istatistiki veriler SPSS 23,0 programı kullanılarak analiz edildi. Sayısal değişkenler için ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum tanımlayıcı ölçüler verildi. Grupların normal dağılıma uyup uymadıkları Shapiro Wilk testi ile belirlendi. Kategorik değişkenlerin ilişkisinin analizinde ki-kare, sürekli değişkenler için Student-t, Mann Whitney U testleri kullanıldı. Sürekli değişkenlerin ilişkisinin analizinde Pearson ve Spearman rank korelasyon katsayısı kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

Çalışmamızda, çalışma grubu olarak orak hücre anemili 13 kadın (%39,4) ve 20 erkek (%60,6), sağlıklı kontrol grubunda ise 15 kadın (%50) ve 15 erkek (%50) dahil edildi. Çalışma grubunda yaş ortalaması 12,24 yıl, kontrol grubunda ise 12,9 yıl idi. Her iki grupta da yaş ve cinsiyet bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi ($p=0,391$, $p=0,397$) (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Çalışma gruplarının demografik verilerinin karşılaştırılması

Gruplar					
Değişkenler	OHA		Kontrol		
Cinsiyet	n (%)				p
Kadın	13 (39,4)		15 (50,0)		0,391*
Erkek	20 (60,6)		15 (50,0)		
	Ort ± SD	Min – Max	Ort ± SD	Min - Max	
Yaş	12,24 ± 3,26	8 – 17	12,90 ±1,60	10 - 15	0,397**

*Pearson Chi Square

**Mann Whitney U

Çalışma grubu ve sağlıklı kontrol gruplarının tam kan sayım parametreleri kıyaslandığında HbF, HCT, HGB, MCH, MCHC, MCV, RBC, RDW, MPV, PLT, WBC seviyeleri her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulundu ($p<0.001$) (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Çalışma grupları arasında hemogram ve HbF değerlerinin karşılaştırılması

	Grup				P
	OHA (n=33)		Kontrol (n=30)		
	Ort±SD	Min-Maks	Ort±SD	Min-Maks	
WBC($10^3/\mu\text{L}$)	10,4 ± 4,1	3,5 - 26,3	7,4 ± 1,9	5,3-14,5	<0,001**
RBC($10^6/\mu\text{L}$)	3,2 ± 0,7	1,9 - 4,3	4,8 ± 0,4	3,9-5,3	<0,001*
Hb(g/dL)	7,6 ± 1,04	5,6 - 11,9	13,9 ± 1,3	12-16,9	<0,001*
Hct (%)	23,6 ± 2,8	17,2 - 33,4	41,8 ± 3,1	37,4-49,6	<0,001*
MCV(fL)	90,3 ± 6,0	75,7 - 102,2	82,3 ± 2,4	79,7-88,8	0,047*
MCH (pg)	29,6 ± 4,2	20,8 – 36,8	27,7 ± 1,6	25,7-30,0	0,016*
MCHC (g/dL)	33,2 ± 2,5	28,1 - 36,4	33,3 ± 1,0	31,4-34,5	0,039*
RDW (fL)	19,4±2,7	13,9-24,7	12,7±1,3	10,2-14,5	<0,001*
MPV(fL)	10,2±0,8	8,7-11,7	9,5±0,8	8,0-11,0	<0,001*
PLT($10^3/\mu\text{L}$)	340,8±133,5	138,0-694,0	252,3±63,4	168-405	<0,001**
HbF (%)	20,7 ± 8,4	2,8 - 38,4	0,4 ± 0,2	0,0-0,9	<0,001**

* Student t ve Mann whitney U (Sürekli değişkenlerin analizinde parametrik veriler için Student-t, non-parametrik veriler için Mann Whitney U testleri kullanıldı)

Orak hücreli anemili hastalar ile sağlıklı kontrol grubu arasında ferritin düzeyleri kıyaslandığında; hasta grubunda ferritinin ortalama düzeyinin 1161,31 ng/mL (125-2920), kontrol grubunda ise ortalama değerin 28,87 ng/mL (3,7-47,87) olduğu izlendi. Ferritin düzeyleri her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı idi ($p<0,001$) (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Çalışma grupları arasında ferritin değerlerinin karşılaştırılması

OHA Grubu				Kontrol grubu			
	Ort ± SD	Median	Min-Maks	Ort ± SD	Median	Min-Max	p*
Ferritin(ng/ml)	61,31±734,6	950,00	125-2920	28,87 ±12,10	31,75	3,70-47,87	<0,001
Transfüzyon Sıklığı (n/yıl)	4,7±1,76	5	1-7				

*Mann Whitney U testi

Orak hücreli anemili hastalar ile sağlıklı kontrol grubu arasında HGB ve ferritin düzeylerinin korelasyonunu karşılaştırıldığında; hasta grubunda negatif ve kontrol grubunda pozitif korelasyon görüldü (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Çalışma grupları arasında HGB ve ferritin düzeylerinin korelasyonunun karşılaştırılması

Grup			HGB	Ferritin
OHA	HGB	r	1	-0,307
		p		0,082
		N	33	33
	Ferritin	r	-0,307	1
		p	0,082	
		N	33	33
Kontrol	HGB	r**	1	0,072
		p*		0,667
		N**	30	30
	Ferritin	r	0,082	1
		p	0,667	
		N	30	30

Pearson* ve Spearman** korelasyon testi

Orak hücreli anemili hastalar ile sağlıklı kontrol grubu arasında CRP düzeyleri kıyaslandığında; her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ve her iki grupta da CRP düzeylerinin normal aralıkta olduğu görüldü ($p=0,102$) (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Çalışma grupları arasında CRP değerlerinin karşılaştırılması

Değişken	OHA Grubu		Kontrol Grubu		p
CRP(mg/L)	2,58 ± 1,14	0,3 - 4,87	2,19 ± 0,65	0,88 - 3,2	0,102*

*: Student-t test

Orak hücreli anemili hastalar ile sağlıklı kontrol grubu arasında hepsidin protein düzeyleri kıyaslandığında; hepsidin düzeyinin OHA grubunda ortalama 63,3 (6,96-176,50), kontrol grubunda ise ortalama 195,58 (117,67-245,78) olduğu ve her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu izlendi ($p<0,001$). Hepsidin seviyesine gen ekspresyonu düzeyinde bakıldığında OHA grubunda ortalama düzeyin 0,63 (0,12-1,22), kontrol grubundaki hepsidin gen ekspresyon düzeyinin ortalama 16,67 (0,03-174,13) olduğu görüldü. Hepsidin gen ekspresyon düzeyinin hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla daha düşük olduğu ve her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu izlendi ($p=0,021$)(Çizelge 4.6).

Orak hücreli anemili hastalar ile sağlıklı kontrol grubu arasında GDF-15 protein düzeyleri kıyaslandığında; GDF-15 düzeyinin OHA grubunda ortalama 1053,7pg/mL (183,26–5306), kontrol grubunda ise ortalama 428,4pg/mL (235,8-1258,4) olduğu ve her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu izlendi ($p<0,001$). GDF-15 seviyesine gen ekspresyonu düzeyinde bakıldığında OHA grubunda ortalama düzeyin 1,51 (0,37-6,84), kontrol grubundaki GDF-15 gen ekspresyon düzeyinin ortalama 0.89 (0.18-2.82) olduğu görüldü. GDF-15 gen ekspresyon düzeyinin hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla daha yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu gözlemlendi ($p=0,023$) (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6: Çalışma grupları arasında hepsidin ve GDF-15 protein ve gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması

	Grup				<i>p</i>
	OHA (n=33)		Kontrol (n=30)		
	Ort±SD	Min-Maks	Ort±SD	Min-Maks	
Hepsidin proteini (pg/mL)	63,3 ± 35,49	6,96-176,50	195,58±29,15	117,67-245,78	<i><0,001</i>
Hepsidin Gen Ekspresyonu	0,63 ± 0,38	0,12 – 1,22	16,67±44,30	0,03-174,13	<i>0,021</i>
GDF-15 proteini(pg/mL)	1053,7±1048,33	183,26–5306	428,4±244,8	235,8-1258,4	<i><0,001</i>
GDF-15 Gen Ekspresyonu	1,51 ± 1,40	0,37 – 6,84	0,89 ± 0,52	0,18-2,82	<i>0,023</i>

Student-t ve Mann Whitney U (Sürekli değişkenlerin analizinde parametrik veriler için Student-t, non-parametrik veriler için Mann Whitney U testleri kullanıldı)

GDF-15 ile hepsidin protein düzeyleri arasındaki korelasyon hasta grubunda negatif olup istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0,002$). GDF-15 ile hepsidin protein düzeyleri arasındaki korelasyon kontrol grubunda pozitif olup istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,901$). (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Çalışma grupları arasında GDF-15 ve Hepsidin protein düzeylerinin korelasyonunun karşılaştırılması

Grup	Değişken	İstatistik	Hepsidin Proteini
OHA	GDF proteini	r	-0,641
		p*	0,002
Kontrol		r	0,025
		p*	0,901

*Pearson korelasyon testi

Hasta grubunda GDF-15 protein düzeyi ile Ferritin düzeyi arasındaki korelasyon pozitif olup istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0,001$ ve $r:0,602$). Hepsidin protein düzeyi ile Ferritin düzeyi arasındaki korelasyon negatif olup istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,001$ ve $r:-0,628$). Kontrol grubunda ise GDF-15 protein düzeyi ile Ferritin düzeyi arasındaki korelasyon negatif olup istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,965$ ve $r:-0,008$). Hepsidin protein düzeyi ile Ferritin düzeyi arasındaki korelasyon negatif olup istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0,033$ ve $r:-0,40$) (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Çalışma grupları arasında GDF-15 ve Hepsidin protein düzeylerinin ferritin düzeyleri ile korelasyonunun karşılaştırılması

Grup	Değişkenler	İstatistik	Ferritin
OHA	Hepsidin_ protein düzeyi	r	-0,628
		p	<0,001
	GDF protein düzeyi	r	0,602
		p	0,001
Kontrol	Hepsidin protein düzeyi	r	-0,4
		p	0,033
	GDF protein düzeyi	r	-0,008
		p	0,965

Spearman korelasyon testi

Çalışmaya alınan hasta ve kontrol gruplarındaki miRNA ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta Ct}$ formülü ile hesaplandı. Hasta ve sağlıklı gruplar arasındaki miRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı. **Housekeeping olarak hsa-miR-188-5p** kullanıldı.

hsa-miR-125b-5p'nin ekspresyon düzeyi hasta grubunda ortalama 2,60 (0,28-6,15), sağlıklı grupta ise ortalama 1,25(0,08-3,68) olup hasta grubunda daha yüksekti ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,001$).

hsa-miR-144-3p'nin ekspresyon düzeyi hasta grubunda ortalama 0,57 (0,21-1,01), sağlıklı grupta ise ortalama 0,94 (0,1-1,92) olup kontrol grubunda daha yüksekti ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0,002$).

hsa-miR-17-5p'nin ekspresyon düzeyi hasta grubunda ortalama 0,68 (0,16-1,96), sağlıklı grupta ise ortalama 0,97 (0,27-2,28) olup kontrol grubunda daha yüksekti ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0,043$).

hsa-miR-210 -3p'nin ekspresyon düzeyi hasta grubunda ortalama 0,80 (0,24-2,20), sağlıklı grupta ise ortalama 1,04 (0,27-3,01) olup kontrol grubunda daha yüksekti ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,227$).

hsa-miR-221-3p'nin ekspresyon düzeyi hasta grubunda ortalama 0,65 (0,05-1,94), sağlıklı grupta ise ortalama 1,03 (0,19-2,93) olup kontrol grubunda daha yüksekti ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0,009$).

hsa-miR-93-5p'nin ekspresyon düzeyi hasta grubunda ortalama 0,74 (0,18-2,02), sağlıklı grupta ise ortalama 1,01 (0,27-2,37) olup kontrol grubunda daha yüksekti ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0,031$).

hsa-miR-451a'nin ekspresyon düzeyi hasta grubunda ortalama 0,27 (0,02-1,93), sağlıklı grupta ise ortalama 1,19 (0,08-3,42) olup kontrol grubunda daha yüksekti ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,001$).

hsa-miR-20a-5p'nin ekspresyon düzeyi hasta grubunda ortalama 0,52 (0,15-1,23), sağlıklı grupta ise ortalama 1,02 (0,28-2,63) olup kontrol grubunda daha yüksekti ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,001$).

hsa-let-7b-5p'nin ekspresyon düzeyi hasta grubunda ortalama 0,46 (0,11-1,14), sağlıklı grupta ise ortalama 1,06 (0,29-2,64) olup kontrol grubunda daha yüksekti ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,001$).

hsa-miR-199a-5p'nin ekspresyon düzeyi hasta grubunda ortalama 0,84 (0,12-3,19), sağlıklı grupta ise ortalama 1,28 (0,1-2,98) olup kontrol grubunda daha yüksekti ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0,008$).

hsa-let-7i-5p'nin ekspresyon düzeyi hasta grubunda ortalama 0,43 (0,13-1,21), sağlıklı grupta ise ortalama 1,04 (0,27-2,05) olup kontrol grubunda daha yüksekti ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,001$) (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9: Çalışma grupları arasında miRNA düzeylerinin karşılaştırılması

	Grup				<i>p</i>
	OHA (n=33)		Kontrol (n=30)		
	Ort±SD	Min-Maks	Ort±SD	Min-Maks	
hsa-miR-125b-5p	2,60 ± 1,58	0,28 - 6,15	1,25 ± 0,81	0,08-3,68	<i><0,001</i>
hsa-miR-144-3p	0,57 ± 0,23	0,21- 1,01	0,94 ± 0,53	0,01-1,92	<i>0,002</i>
hsa-miR-17-5p	0,68 ± 0,39	0,16- 1,96	0,97 ± 0,56	0,27-2,28	<i>0,043</i>
hsa-miR-210 -3p	0,80 ± 0,34	0,24- 2,20	1,04 ± 0,68	0,27-3,01	<i>0,227</i>
hsa-miR-221-3p	0,65 ± 0,41	0,05 – 1,94	1,03 ± 0,62	0,19-2,93	<i>0,009</i>
hsa-miR-93-5p	0,74 ± 0,38	0,18 – 2,02	1,01 ± 0,54	0,27-2,37	<i>0,031</i>
hsa-miR-451a	0,27 ± 0,34	0,02 – 1,93	1,19 ± 0,94	0,08-3,42	<i><0,001</i>
hsa-miR-20a-5p	0,52±0,27	0,15-1,23	1,02±0,56	0,28-2,63	<i><0,001</i>
hsa-let-7b-5p	0,46±0,26	0,11-1,14	1,06±0,62	0,29-2,64	<i><0,001</i>
hsa-miR-199a-5p	0,84±0,66	0,12-3,19	1,28±0,72	0,01-2,98	<i>0,008</i>
hsa-let-7i-5p	0,43 ± 0,23	0,13 – 1,21	1,04 ± 0,55	0,27-2,05	<i><0,001</i>

Student t ve Mann whitney U (Sürekli değişkenlerin analizinde parametrik veriler için Student-t, non-parametrik veriler için Mann Whitney U testleri kullanıldı)

5. TARTIŞMA

OHA, dünyadaki en yaygın tek gen hastalıklarından biridir. Her yıl 300.000 homozigot bebek doğmakta ve 366 milyon taşıyıcı olduğu tahmin edilmektedir. Ülkemizdeki prevalans çalışmaları genellikle Hatay gibi Türkiye'nin güney illerini kapsamaktadır (Arpacı ve ark. 2003).

OHA, sadece tek bir hastalık değildir. Aksine klinik şiddeti ve beklenen yaşam süresi oldukça değişken olan bir dizi kalıtsal hemolitik anemiye içeren klinik bir antitedir. β -globin genindeki nokta mutasyonlarını içerir ve bu da hemoglobin S (HbS) olarak adlandırılan anormal bir hemoglobin üretimi ile sonuçlanır. En yaygın görülen ve genellikle aynı zamanda en şiddetli olan OHA formlarında, hasta her iki ebeveynden de mutant geni alır ve dolayısıyla yalnızca HbS üretilir. OHA'nın birleşik heterozigot formları, HbS ve başka bir anormal β -globin proteininin üretimi olarak tanımlanır (Kapoor ve ark. 2018).

β -globin genindeki nokta mutasyonu, ortaya çıkan proteinde 6. pozisyonadaki glutamik asidin valin ile yer değiştirmesi ile sonuçlanır (Kapoor ve ark. 2018). Hemoglobinin aminoasit dizisindeki bu küçük değişikliğin derin yapısal ve işlevsel sonuçları vardır. Çünkü düşük oksijen koşulları altında, oksijensizleştirilmiş HbS'de iki hemoglobin molekülünün $\beta 1$ ve $\beta 2$ zincirleri arasındaki bağlanmayı destekleyen ve sonuçta HbS polimerizasyonunun çubuk şeklindeki yapılara dönüşmesine neden olan hidrofobik bir bölge üretir (Rees ve ark. 2010).

OHA ile ilişkili ülkemizdeki mevcut çalışmalar, hastalığın ve taşıyıcılığının özellikle Türkiye'nin Adana, Hatay ve Mersin gibi güney illerinde daha yüksek olduğunu göstermiştir. Ülkemizdeki Ulusal Hemoglobinopati Konseyi ve Bakanlığımızca paylaşılan veriler ele alındığında Çukurova bölgesi OHA'nın en yaygın karşılaşıldığı bölge olup hastalığın taşıyıcı olma sıklığı ise Mersin'de %13,6, Antakya'da %10,5, Adana'da %10,0 olarak belirtilmiştir (Arpacı ve ark. 1991). Arpacı ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada; Türkiye, nüfus artışı en fazla olan ilk 25 ülke arasında 16. sırada yer aldığını, özellikle Prevalans çalışmalarının Türkiye'nin güneyinde Hatay ve Adana gibi güney illerini kapsayan Çukurova'da yapıldığını belirtmişlerdir. Ayrıca çeşitli bölgelerde orak hücre özelliği için %0,5 ila %30-40 arasında gözlendiği ve OHA için güney illerinde %8'lik genel taşıyıcı oranına ulaşıldığını belirtmişlerdir (Arpacı ve ark. 2003). Hastalık otozomal resesif olduğundan her iki cinsiyettede de eşit sıklıkta görülmektedir (Söylemez-Gökçer ve Kayaaltı

2016).Çalışmamızda, hasta grubunda orak hücre anemili 13 kadın (%39,4) ve 20 erkek (%60,6), sağlıklı kontrol grubunda ise 15 kadın (%50) ve 15 erkek (%50) dahil edildi. Çalışma grubunda yaş ortalaması 12,24 yıl, kontrol grubunda ise 12,9 yıl idi. Çizelge 4.1 de görüldüğü üzere her iki grupta da yaş ve cinsiyet bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi ($p=0,391$, $p=0,397$).Gruplar seçilirken -genellikle literatürde yapıldığı gibi- gruplar arasında yaş farkı olmamasına dikkat edildi.

Brousse ve arkadaşları bir çalışmalarında HbF düzeyi yükseldikçe OHA’de klinik bulguların şiddetinde hafif seyretmekte olduğunu belirtmişlerdir (Quinn 2016, Brousse ve ark. 2018). Bazı çalışmalarda da OHA li hastalarda HbF değerleri ile bu hastalardaki kronik hemoliz ve eritrosit transfüzyonu sıklığı arasında negatif korelasyon olduğu bu durumun da demir birikimine sebep olduğu bildirilmiştir (Dahmani ve ark. 2016, Steinberg 2020, Brandow ve Liem 2022). Çalışmamızda, hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının tam kan sayım parametreleri kıyaslandığında HbF, HCT, HGB, MCH, MCHC, MCV, RBC, RDW, MPV, PLT, WBC seviyeleri her iki grup arasında literatür ile uyumlu olarak istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulundu ($p<0,001$) (Çizelge 4.2). OHA kliniğinin diğer bölgelere göre daha ağır seyrettiği Hatay ilinde (Arpacı ve ark. 1991) gerçekleştirilen çalışmamızda OHA li hastaların ortalama HbF değeri $20,70 \pm 8,42$ (Ort $\pm$ SD) idi.

Bölgemizde diğer bölgelere göre OHA kliniğinin daha ağır seyretmesi hastalarımızda HbF’in arttırılamadığı bu durumunda kronik hemoliz ve etkin olmayan eritropoez ile sonuçlandığını düşündürmektedir. HbF düzeyi ile OHA klinik bulgularının şiddeti arasında negatif korelasyon olduğu literatürde belirtilmiştir. Orak hücreli anemide HbF düzeyi değişik miktarlarda yükselir. HbSS de HbF düzeyi $<1\%$ ’den 60% ’a kadar değişen düzeylerde saptanabilir (Akinsheye ve ark. 2011, Ngo ve ark. 2012). Bizim çalışmamızda OHA li hastalarımızın HbF değeri ortalaması $20,70 \pm 8,42$ olup hafif OHA kliniğinin görüldüğü yüksek HbF değerlerinden düşük bulundu (Çizelge 4.2).

İnsanlarda demir homeostazı, vücut ihtiyaçlarına göre emilimin sıkı bir şekilde düzenlenmesiyle sağlanır. Günde bir mg (toplam diyet demirinin 10% ’u) demir ağırlıklı olarak duodenumda emilir ve eşit miktarda dışkı, idrar ve ter yoluyla kaybedilir. Normal fizyolojik koşullarda demir eksikliği ve anemi demir emilimini arttırırken aşırı demir yüklenmesi demir emilimini azaltır (Dubach ve ark. 1955, Andrews 2000). Ancak insan vücudunun fazla demiri atmak için etkili bir fizyolojik mekanizması yoktur. Bu nedenle OHA gibi transfüzyonların sıklıkla endike olduğu durumlarda, eksojen demir birikebilir,

transferine bağılı olmayan demir (NTBI) olarak dolaşabilir, dokulara girebilir, reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturabilir ve son organ hasarına neden olabilir (Andrews 2000, Walter ve ark. 2009). Aşırı demir yükü, OHA'da uzun süreli transfüzyonun korkulan bir komplikasyonudur. OHA'de transfüzyon endikasyonları genişlemeye devam etmektedir ve aşırı demir yükünün komplikasyonlarını azaltmak için OHA'li hastalarda gereksiz transfüzyonların en aza indirilmesi klinik ortamda güçlü bir şekilde vurgulanmalıdır. Hidroksiüre gibi transfüzyon dışı tedavinin optimum kullanımı, transfüzyon tedavisine olan ihtiyacın tamamını olmasa da bir kısmını azaltabilir. Miyeloablatif olmayan kemik iliği transplantasyonunun bazı durumlarda uzun süreli transfüzyon tedavisinin yerini alıp almayacağı henüz açıklığa kavuşmamıştır. OHA hastaları, transfüzyon gereksinim azaltılarak demir toksisitesinden kaynaklanan uç organ hasarından nispeten korunabilir (Raghupathy ve ark. 2010).

Namaste ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada gerçek bir demir eksikliğini saptamak için ferritin düzeyinin gerekli olduğu belirtilmiş, Dünya Sağlık Örgütü de, 2007 yılında Geneva'da gerçek bir demir eksikliğini saptamak için ferritin düzeylerinin bilinmesinin gerekli olduğunu belirtmiş ve çocuklar için referans aralıkları oluşturulmuştur (Who 2007, Namaste ve ark. 2017). Bryd ve arkadaşlarının orak hücreli hastalarda yaptığı çalışmada hemoglobinopatilerin serum ferritin düzeyine etki ettiğini göstermişlerdir (Byrd ve ark. 2018). Elbostany ve arkadaşlarının demir birikimi olan OHA'li çocuklarda hepsidin ekspresyonunu araştırdıkları bir çalışmada; ferritin düzeyi 938ng/mL'den yüksek olan OHA'li hastalarda kan transfüzyon sıklığının, serum ferritin düzeyi 938ng/mL'den düşük olan OHA'li hasta grubuna göre daha yüksek olduğu ayrıca ferritin düzeyi yüksek olan OHA'li hastalarda, ferritin düzeyi düşük olan OHA'li hastalara göre hepsidin düzeyinin daha düşük olduğunu belirtmişlerdir (Elbostany ve ark. 2021). Bizim çalışmamızda orak hücreli anemili hastaların ortalama serum ferritin düzeyi literatürle uyumlu olarak (>938 ng/mL) yüksekti. Ayrıca çalışmamızda OHA'li hastaların serum ferritin düzeyi, sağlıklı kontrol grubu ile kıyaslandığında; hasta grubunda ferritin düzeyinin ortalama düzeyinin 1161,31 (125-2920) ng/mL, kontrol grubunda ise ortalama değerin 28,87 ng/mL (3,7-47,87) olduğu izlendi. Ferritin düzeyleri her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı idi ($p<0.001$) (Çizelge 4.3). Orak hücreli anemili hastalar ile sağlıklı kontrol grubu arasında HGB ve ferritin düzeylerinin korelasyonunu karşılaştırıldığında; hasta grubunda negatif ve kontrol grubunda pozitif korelasyon görüldü (Çizelge 4.4). Ayrıca ferritin değeri yüksek

OHALi hastalarda literatürle uyumlu olarak Hepsidin düzeyi düşük bulundu (Çizelge 4.6). Bu veriler ışığında hastalarımızdaki yüksek ferritin düzeyinin demir birikimine katkıda bulunan antihepsidinik faktör GDF-15' in yüksek ekspresyonu ile bağlantılı olduğu ve yüksek GDF-15 ekspresyonunun da miRNA düşüklüğü ile ilişkili olabileceği kanaatindeyiz (Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.6).

Transfüze edilmemiş hemoglobinopatili hastalarda inefektif eritropoez, anemi ve hipoksinin, demir homeostazının ana düzenleyicisi olan hepsidini azalttığı, hepsidin eksikliğinin de duodenal aşırı demir emilimine ve böylece sistemik aşırı demir yüklenmesine neden olduğu ancak düzenli olarak transfüzyon yapılan hastalarda, aşırı demir yüklenmesinin çoğunlukla eritrositlerin parçalanmasından kaynaklandığı literatürde belirtilmiştir (Origina ve ark. 2007). Başka bir çalışmada da OHA li hastalarında artmış GDF-15'in; OHA'de inefektif eritropoezin ve kronik aneminin patofizyolojisi ve şiddetindeki önemini yansıttığını ayrıca artmış GDF-15 seviyelerinin hemoliz ve aşırı demir yüklenmesi ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Tantawy ve ark. 2014). Çalışmamızda OHA hastalarının transfüzyon sıklığı 4,7/yıldır (Çizelge 4.3). Bu veriler ışığında OHA li hastaların yüksek ferritin düzeylerinin bu hastalarda tespit ettiğimiz düşük hepsidin düzeyleri ve yüksek GDF-15 düzeyleri ile ilişkili olabileceği kanaatindeyiz.

Orak hücreli anemili hastalar ile sağlıklı kontrol grubu arasında CRP düzeyleri kıyaslandığında; her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ve her iki grupta da CRP düzeylerinin normal aralıkta olduğu görüldü (Çizelge 4.5). Bu bulgular literatür ile uyumlu bulundu (Byrd ve ark. 2018). OHA li hastalar ile sağlıklı kontrol grubu arasında CRP yönünden fark olmaması OHA li çalışma grubu hastalarımızın kan numunelerinin alındığı sırada enfeksiyöz bir tabloda ya da hemolitik kriz döneminde olmadığını dolayısıyla OHA li hastaların yüksek ferritin değerlerinin de akut faz reaktanı olan yükseklikte olmadıklarını desteklemektedir.

Hepsidin, OHA'de demir toksisitesi arasında gözlenen farklılıkların merkezinde muhtemelen yer almaktadır. GDF aşırı ekspresyonu ile baskılanmış hepsidinin ekspresyonu demir toksisitesinde rol oynayabilir (Raghupathy ve ark. 2010).

Mevcut az sayıdaki çalışma, OHA hastaları arasında ayırım yapmaksızın hepsidin plazma düzeyine ilişkin kesin olmayan veriler sunduğu ve ayrıca bu düzeylerin sağlıklı kontrol gruplarıyla genellikle karşılaştırılmadığını söylemektedir (Omena ve ark. 2018). Elbostanby'in çalışmasında, serum hepsidin düzeyinin; serum ferritin düzeyi yüksek olan

OHA li hastalarda, serum ferritin düzeyi düşük OHA li hastalara ve sağlıklı kontrol grubuna göre daha düşük düzeylerde olduğunu belirtmiştir (Elbostany ve ark. 2021). Fertrin ve arkadaşları da buna benzer sonuçlar ileri sürmüştür (Fertrin ve ark. 2014). Bununla birlikte, diğer bazı çalışmalar, OHA hastaları ve kontrolleri arasında eşit veya hatta kontrol grupları arasında daha da yüksek hepsidin düzeyi saptandığını açıklamaktadır (Kearney ve ark 2007, Shen ve ark. 2015). Bu çalışmaya benzer şekilde, Rashidy ve ark. (Rashidy ve ark. 2015), OHA hastalarında ferritin ve hepsidin düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki olmadığını bildirmiştir. Çalışmamızda ise orak hücreli anemili hastalar ile sağlıklı kontrol grubu arasında hepsidin protein düzeyleri kıyaslandığında; OHA li hastalarda hepsidin düzeyinin sağlıklı kontrol grubuna göre daha düşük olduğu tespit edildi. Hepsidin düzeyi; OHA grubunda ortalama 63,30 (6,96-176,50) pg/ml, kontrol grubunda ise ortalama 195,58 (117,67-245,78) pg/ml olup her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu izlendi ($p<0,001$) (Çizelge 4.6). Demir emiliminin ve dokulara taşınmasının ana düzenleyicisi olarak rol oynayan Hepsidin'in serum seviyesi plazma demir seviyesi ile düzenlenir. Hepsidin'in transkripsiyonu demir eksikliğinde baskılanırken aşırı demir yükü olan durumlarda indüklenir ve yüksek hepsidin seviyesi diyetle alınan demir emilimi yanısıra hücre içinde demir kullanımını da azaltarak dokularda demir birikimini engeller (Nemeth ve ark. 2009, Arezes ve ark. 2015). Origas ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; transfüze edilmemiş hemoglobinopatili hastalarda inefektif eritropoez, anemi ve hipoksinin, demir homeostazının ana düzenleyicisi olan hepsidini azalttığı, hepsidin eksikliğinin, duodenal aşırı demir emilimine ve böylece sistemik aşırı demir yüklenmesine neden olduğu ancak düzenli olarak transfüzyon yapılan hastalarda, aşırı demir yüklenmesinin çoğunlukla eritrositlerin parçalanmasından kaynaklandığı belirtilmiştir (Origas ve ark. 2007). Tantawy ve arkadaşları; OHA hastalarında artmış GDF-15'in, OHA'daki inefektif eritropoezin ve aneminin patofizyolojisini ve şiddetindeki önemini yansıttığını ayrıca artmış GDF-15 seviyelerinin hemoliz ve aşırı demir yüklenmesi ile ilişkili olduğunu ve trombotik olay riski yüksek olan hastaların belirlenmesinde fayda sağlayabileceğini bildirmişlerdir (Tantawy ve ark. 2014). Literatür ve çalışma verileri ışığında; enfeksiyonun göstergesi olan CRP değerlerinin negatif olduğu yüksek ferritin düzeylerine sahip OHA li çalışma grubu hastalarındaki düşük hepsidin düzeylerinin inefektif eritropoeze, kronik anemiye ve hemolize bağlı gelişebileceği düşüncesini ve düşük hepsidin düzeyinin bu hastalarda aşırı demir birikimine katkıda bulunduğu hipotezimizi desteklemektedir.

GDF-15 seviyeleri hemoliz ve aşırı demir yüklenmesi ile ilişkilidir ve trombotik olay riski yüksek olan hastaların belirlenmesinde fayda sağlayabilir. GDF-15 inefektif veya apopitotik eritropoezi göstermektedir (Tanno ve ark. 2010). Hemoglobinopatilerde GDF-15 düzeyinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Tantawy ve ark 2014). Tanno ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; hemoglobinopatili hastalardan alınan serumların hepsidin ekspresyonunu bastırdığı ve ardından GDF-15 tükendiğinde de baskılamanın tersine döndüğü gösterilmiştir (Tanno ve ark. 2007). Yapılan bir çalışmada talasemi sendromları gibi, orak hücre sendromlarının da artan eritropoez seviyeleri ile karakterize edildiği, ancak orak hücredeki birincil kusurun olgun eritrositlerin yıkımı olduğu ayrıca şiddetli OHA vakalarında, inefektif eritropoez bulunabileceği bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada GDF-15, hipoksi ile indüklenebilir bir gen ürünü ve hepsidin düzenlemesinde yer alan bir molekül olarak tanımlanmıştır. İnefektif eritropoez ortamında elde edilen yüksek seviyelerde GDF-15 ekspresyonu, tamamlanmamış bir hepsidin baskılama mekanizması yoluyla patolojik aşırı demir yüklenmesine katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Tantawy ve ark 2014). Bizim çalışmamızda da orak hücreli anemili hastalar ile sağlıklı kontrol grubu arasında GDF-15 protein düzeyleri kıyaslandığında; GDF-15 düzeyinin OHA grubunda ortalama 1053,77 (183,26-5306,00) pg/ml, kontrol grubunda ise ortalama 428,40 (235,80-1258,40) pg/ml olduğu ve her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu izlendi ($p < 0,001$) (Çizelge 4.6). Literatürle uyumlu olarak GDF-15 protein düzeyi ile Hepsidin protein düzeyi arasındaki korelasyon OHA li grupta negatif olup istatistiksel olarak anlamlı idi. GDF-15 protein düzeyi ile Hepsidin protein düzeyi arasındaki korelasyon kontrol grubunda pozitif olup istatistiksel olarak anlamlı değildi (Çizelge 4.7). Ayrıca OHA li hastalarda GDF-15 protein düzeyi ile Ferritin arasındaki korelasyon pozitif ve Hepsidin protein düzeyi ile Ferritin arasındaki korelasyon ise negatif idi. Bu veriler istatistiksel olarak anlamlı idi (Çizelge 4.8). Çalışmamız, OHA li hastalarımızın GDF-15 nin sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek oranda eksprese ve translase edildiğini göstermektedir. Bu veriler ışığında OHA li hastalarda GDF-15 serum protein düzeyi yüksekliğinin bu hastalarda Hepsidin ekspresyonunu inhibe ederek aşırı demir birikimine (yüksek ferritin düzeyine) sebep olabileceği kanatındeyiz.

Orak hücre sendromları, artan eritropoez seviyeleri ile karakterize edilir, ancak orak hücredeki birincil kusur, olgun eritrositlerin yıkımını içerse de şiddetli orak hücre hastalığı vakalarında inefektif eritropoez gözlenebilir (Kanda ve ark. 2008). Ancak, OHA'li hastalar

arasındaki GDF-15 düzeylerine ilişkin veriler ve bu ilişkiyi etkileyen faktörler ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır (Tantawy ve ark 2014). Bu faktörlerden eritropoez ile ilişkili miRNA lar, GDF transkripsiyonu üzerinden hepsidin düzeylerini etkileyerek bu hastalarda demir aşırı birikimine katkıda bulunabilir. Nitekim bizim çalışmamızda da orak hücreli hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre GDF-15 serum düzeyleri yüksek, hepsidin serum düzeyleri düşük ve ferritin düzeyleri yüksekti. Ayrıca GDF-15 gen ekspresyonunun da hasta grubunda daha yüksek olması miRNA ların bu ekspresyon üzerinde etkili olduğunu düşündürmektedir. Biz çalışmamızda da ayrıca; miRNA ların etkilerini incelemeyi amaçladık.

İlk miRNA 1993 yılında keşfedildi, keşfinden bu yana miRNAlar birçok hastalığın patogenezinin anlaşılması için çalışılmıştır. Bazı miRNAlar eritroid hücrelerde bol miktarda bulunur ve hematopoezde kritik bir düzenleyici olarak rol alırlar (Zhang ve ark. 2012). İn vitro şartlarda ilk defa Felli ve arkadaşları göbek kordonundan aldıkları kanda eritroid hücrelerin farklılaşabilmesi için miR221 ve miR222 ekspresyonlarının düşük düzeyde olması gerektiğini göstermişlerdir (Felli ve ark. 2005). Gabbianelli ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada miR221 ve miR222 deki yüksek düzeydeki ekspresyonun HbF düzeyinde düşüşe neden olduğu gösterilmiştir (Gabbianelli ve ark. 2010). Noh ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kord kanı ve adult periferik kanlar incelenmiş ve miRNA ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. Let7b ve let 7i gibi birçok miRNA nın adult dönemde kordon kanına göre ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Noh ve ark. 2009). Güzelgül ve arkadaşlarının yaptığı tez çalışmasında OHA da let7d'nin ekspresyon düzeyinin HbSS'de, HbAA'ya göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada mir144 ekspresyon düzeyinin OHA da anlamlı derecede yüksek olduğu belirtilmiştir (Güzelgül 2014). Dore ve arkadaşları Mir144'ün eritropoezde pozitif düzenleyici olarak rol aldığını belirtmişlerdir (Dore ve ark. 2008).

Çalışmamızda **hsa-miR-125b-5p** ekspresyon düzeyi hasta grubunda ortalama 2,60 (0,28-6,15), sağlıklı grupta ise ortalama 1,25 (0,08-3,68) olup hasta grubunda daha yüksekti ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0,001$). Hematopoietik kök hücrelerde miR-125b'nin overekspresyonu, rejenerasyonu ve diferansiyasyonu stimüle ettiği ve miR-125b, normal ve malign hematopoezde kilit rol oynadığı belirtilmektedir (Darden ve ark. 2020). Bildiğimiz kadarıyla literatürde hsa-miR-125b-5p ile OHA veya hsa-miR-125b-5p ile HbF ilişkisini açıklayan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu veriler ışığında

çalışmamızdaki hsa-miR-125b-5p yüksekliğinin eritropoez aktivasyonuna hepsidin ekspresyonunun inhibisyonuna ve orak hücre patofizyolojisi ile aşırı eritroid hücre yıkımına (Darden ve ark. 2020) sonuç olarak demir aşırı birikimine katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz.

hsa-miR-144-3p ekspresyon düzeyi hasta grubunda ortalama 0,57 (0,21-1,01), sağlıklı grupta ise ortalama 0,94 (0,1-1,92) olup kontrol grubunda daha yüksekti ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0,002$). miR-144; NRF2 (nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör) ekspresyonunu baskılayarak oksidatif stres seviyelerini kontrol eden periferik kan eritrositlerindeki baskın miRNA'lerden biridir. Sangokoya ve ark. miR144'ün hemoglobin sentezinde ve OHA hastalığının klinik şiddetinde önemli olduğunu gösterdi (Sangokoya ve ark. 2010). NRF2 tarafından γ -globin aktivasyonunun moleküler mekanizmaları hala tam olarak bilinmemektedir. NRF2'nin HGB transkripsiyonunu doğrudan etkinleştirdiği, miR-144'ün ise normal CD34+ hücrelerinde HGB mRNA'yı susturmak için NRF2'yi hedeflediği iyi belgelenmiştir. Tersine, miR-144'ü inhibe etmek, normal ve orak hücre progenitörlerinde HGB 'i yukarı doğru düzenler. NRF2 tarafından γ -globin regülasyonunda yer alan moleküler mekanizmaları tanımlamak için, sıvı bir kültür sisteminde insan CD34+ kök hücrelerinden üretilen eritroid progenitörlerinin kullanıldığı bir çalışmada NRF2'nin γ -globin transkripsiyonunu aktive etme yeteneğinin baskılayıcı komplekslerinin modülasyonu yoluyla gerçekleştirilebileceği belirtilmiştir (Zhu ve ark. 2017). Çalışma grubu ve sağlıklı kontrol gruplarının tam kan sayım parametreleri kıyaslandığında HGB ve RBC seviyeleri miR144 ekspresyonunun düşük bulunduğu OHA' li grupta sağlıklı kontrol grubuna göre düşüktü ve bu düşüklük istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.001$) (Çizelge 4.2). Başka bir çalışmada da düşük HbF düzeyine sahip OHA hastaların periferik kan retikülositlerinde daha yüksek miR-144 ekspresyonu gözlemlendi (Li ve ark. 2019). NRF2 protein seviyeleri, OHA'de eritropoez sırasında γ -globin gen susturma mekanizması olarak miR-144 tarafından düzenlenir denilmiştir (Li ve ark. 2019). Çalışmamızdaki veriler ışığında hsa-miR-144-3p' nin OHA li hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre düşük serum düzeylerinin; ferritin düzeyi yüksek olan OHA li hastalarda baskılanmış HbF düzeyleri ile ilişkili olduğu söylenebilir. OHA de HbF düzeyinin değişik miktarlarda yükseldiği ve HbF düzeyi ile OHA klinik bulgularının şiddeti arasında negatif korelasyon olduğu literatürde belirtilmiştir (Ngo ve ark. 2012). HbSS de HbF düzeyi $<1\%$ 'den 60% 'a kadar değişen düzeylerde saptanabilir (Akinsheye ve 2011, Ngo ve 2012). Bizim çalışmamızda OHA li

hastalarımızın HbF değeri ortalaması $20,70 \pm 8,42$ olup bu değer hafif OHA kliniğinin görüldüğü HbF değerlerinden daha düşüktü (Çizelge 4.2). Ayrıca baskılanmış HbF'nin yanısıra artmış oksidatif stres seviyelerinden kaynaklı transfüzyonu ihtiyacı ve artmış GDF-15 düzeylerinin baskıladığı düşük hepsidine bağlı aşırı demir yüklenmesi ile ilişkili olabileceği kanaatindeyiz.

hsa-miR-17-5p ekspresyon düzeyi hasta grubunda ortalama 0,68 (0,16-1,96), sağlıklı grupta ise ortalama 0,97 (0,27-2,28) olup sağlıklı grupta daha yüksekti ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0,043$). Hsa-miR-17-5p β -talasemili pediatrik hastalarda önemli ölçüde düşük çıkmasına karşın (Wang ve Chen 2021) bildiğimiz kadarıyla hsa miR17b-5p ile OHA ilişkisini açıklayan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. GDF-15, ALK reseptörlerinin aktivasyonu ve SMAD'ın fosforilasyonu yoluyla hücre proliferasyonunu düzenlemek için gerekli olan sinyal yollarını düzenler (Rochette ve ark. 2021). SMAD kompleksleri, promotörlerindeki SMAD bağlayıcı proteinlere bağlanarak miRNA genlerinin transkripsiyonunu kontrol eder. Ek olarak SMAD'ler, miRNA promoter aktivitesini düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu yoluyla miRNA seviyelerini dolaylı olarak modüle edebilir. Genlerin miRNA'lar tarafından düzenlenmesi, GDF-15 tarafından uygulanan gen ekspresyonunun kontrolünün ayrılmaz bir bileşenidir (Hata ve Chen 2016). Bu veriler ışığında çalışmamızdaki hsa-miR-17b-5p'nin sağlıklı kontrol grubuna göre OHA li hastalardaki düşüklüğünün GDF-15 aşırı ekspresyonuna, GDF-15'te SMAD üzerinden hepsidin ekspresyonunun inhibisyonuna neden olabileceğini düşünmekteyiz.

Spesifik olarak, miR-210 ve miR486-3p, HU yanıt verenlerde artan hemoglobinin ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir (Hojjati ve ark. 2017). Vardiman ve diğerleri tarafından yapılan ayrı bir çalışmada miR-210'un ekspresyonundaki artış, HbF'nin HU aracılı indüksiyonu ile ilişkilendirildi. Böylece miR-210'un, HU tedavisi alan OHA hastalarında eritroid farklılaşmasında ve HbF indüksiyonunda rolünü daha da destekledi (Vardiman ve ark. 2016). Bizim çalışmamızda **hsa-miR-210 -3p** ekspresyon düzeyi hasta grubunda ortalama 0,80 (0,24-2,20), sağlıklı grupta ise ortalama 1,04 (0,27-3,01) olup kontrol grubunda daha yüksekti ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,227$). Yoshioka ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ferritin ekspresyon seviyesi, anti-miR-210 ile transfekte edilmiş hücrelerde, hiposik koşullar altındaki hücrelere kıyasla artmış olduğu görülmüştür. Öte yandan, miR-210'un aşırı ekspresyonunun ferritin ekspresyonunu

baskıladığını belirtmişlerdir (Yoshioka ve ark. 2012). miR-210'un upregülasyonunun HbF ekspresyonu ile korele olduğu rapor edilmiştir (Bianchi ve ark. 2009). Bu, miR-210'un eritroid olgunlaşmasıyla ilişkili olduğunu göstermektedir. Ancak miRNA-210'un eritropoezdeki hedef geni tanımlanmamıştır (Sarakul ve ark. 2013). Her ne kadar hsa-miR-210-3p'nin OHA li hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre daha düşük serum düzeylerinin varlığı istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermese de OHA grubundaki hsa-miR-210-3p düşüklüğünün; bu hastalardaki yüksek ferritin düzeyi, indüklenemeyen HbF düzeyleri (Bianchi ve 2009) ve yüksek GDF-15 düzeyinin de düşük hepsidin düzeyine bağlı demir yüklenmesi ile ilişkili olabileceği kanaatindeyiz.

HU tedavisi ile HbF indüksiyonunda miRNA'ları ima eden en eski çalışmalardan biri Lopes ve arkadaşları tarafından yayınlandı. Yazarlar, in vitro HU tedavisini takiben insan göbek damarı endotel hücre kültürlerinde HIF1A ekspresyonunda, bir anjiyojenez belirtici ve miR-221 indüksiyonunda önemli bir azalma gözlemladiler (Lopes ve ark. 2014). Zhang ve arkadaşları, Eritroid hücrelerde çok sayıda miRNA bulunduğunu ve miR-15a/16, miR-144, miR-150, miR-191 ve miR-221/222 dahil olmak üzere hematopoezin kritik düzenleyicileri olarak işlev gördüğünü belirtmişlerdir (Zhang ve ark. 2012). Ma ve arkadaşları doğal bir Çin tıbbının emodin adı verilen saflaştırılmış bir bileşeni, c-KIT'in up regülasyonu ve miR-221 ve miR-222'nin down regülasyonu yoluyla K562 hücrelerinde hemoglobulin ekspresyonunu aktive ettiğini ve HbF düzeyini suprese ettiğini belirtmişlerdir (Ma ve ark. 2013). Çalışmamız yukarıda bahsedilen çalışma ile uyumluydu. Çalışmamızda **hsa-miR-221-3p** ekspresyon düzeyi hasta grubunda ortalama 0,65 (0,05-1,94), sağlıklı grupta ise ortalama 1,03 (0,19-2,93) olup OHA li grupta daha düşüktü ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı idi (p=0,009). Literatürle uyumlu olarak çalışmamızda hsa-miR-221-3p' nin OHA li grupta sağlıklı kontrol grubuna göre down regüle olduğunu gözledik. Bu veriler ışığında OHA li hasta grubunda hsa-miR-221-3p'nin düşüklüğünün arttırılamayan HbF düzeyleri (Bianchi ve ark. 2009) ve yüksek GDF-15 düzeyinin de düşük hepsidin düzeyine bağlı demir yüklenmesi ile ilişkili olabileceği kanaatindeyiz.

Shkurnikov ve arkadaşlarının hemolizin kan plazmasının miRNA profili üzerindeki etkisini analiz ettikleri çalışmada eritrositlerin hemolizinin 9 miRNA konsantrasyonunu (hsa-miR-486-5p, hsa-miR-16-5p, **hsa-miR-451a**, hsa-miR-106a- 5p, hsa-miR-17-5p, **hsa-miR-93-5p**, **hsa-miR-20a-5p**, hsa-miR-107 ve hsa-miR-20b-5p gibi) önemli ölçüde etkilediğini bulduklarını ve bu 9 miRNA'nın düzeyinin hemoglobin konsantrasyonuyla

anlamli düzeyde pozitif korelasyon gsterdigini belirtmektedirler (Shkurnikov ve ark. 2016). Hsa-miR-93-5p'nin plazmadaki varligi ile hemogloblin konsantrasyonu arasinda bir iliski olmasini; bu miRNA'nin eritrositlerdeki varligina isaret edebilecegini belirtmislerdir. (Shkurnikov ve ark.2016). Calismamizda **hsa-miR-93-5p** ekspresyon düzeyi hasta grubunda ortalama 0,74 (0,18-2,02), saglikli grupta ise ortalama 1,01 (0,27-2,37) olup OHA li grupta daha dusuktu ve bu farklilik istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0,031$). Aynı sekilde calismamizda ayrıca **hsa-miR-20a-5p** ekspresyon düzeyi hasta grubunda ortalama 0,52 (0,15-1,23), saglikli grupta ise ortalama 1,02 (0,28-2,63) olup OHA li grupta daha dusuktu ve bu farklilik istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,001$). Bu veriler; hasta grubundaki hsa-miR-93-5p ve hsa-miR-20a-5p dusuklugunun ferritin düzeyi yuksek olan OHA li hastalarin artmis GDF-15 ekspresyonu ve OHA li hastalardaki artan hemoliz ve azalan hemogloblin konsantrasyonu dolayisiyla da kan transfuzyonu ihtiyaci nedeniyle de OHA li hastalardaki demir birikimi ile iliskili olabilecegini dusundurmektedir.

Son in vitro arastirmalar, mikroRNA'larin (miRNA'lar) miR-451a ve let-7i-5p'nin saglikli kontrollere (HbAA) kiyasla HbSS eritrositlerinde farkli sekilde exprese edildigini ve Plasmodium ile enfekte sıtma eritrositlerinde overexpresse edildigini gstermistir (Shkurnikov ve ark. 2016). Plazmada dolasan miRNA'lar genellikle eksozomlar gibi hucre disı vezikullerde kapsullenir ve hastalik gelisminde rol oynadigi dusunulmektedir. Dolasimdaki eksozomal miR-451a ve let-7i-5p, (+) ve (-) sıtması olmayan cesitli hemogloblin genotiplerine (HbAA, HbAS, HbAC, HbSS, HbSC ve HbCC) sahip bireylerde olculmüstür. Sonuclar, sıtması olmayan yani HbSS-'de daha yuksek bir eksozomal let-7i-5p ve miR-451a seviyesi gsterdi. Eksozomal let-7i-5p ve miR-451a seviyeleri HbSS+'da diger genotiplere gore daha dusuktu. miR-451a ve let-7i-5p'nin, enflamasyonla ilgili genleri module ettigi ve dolayisi ile her iki hastalik için potansiyel patogeneze biyobelirteçleri olabilecegi dusunulmüstür (Shkurnikov ve ark. 2016). Calismamizda literatürle uyumlu olarak **hsa-miR-451a** ekspresyon düzeyi hasta grubunda ortalama 0,27 (0,02-1,93), saglikli grupta ise ortalama 1,19 (0,08-3,42) olup OHA li grupta daha dusuktu ve bu farklilik istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,001$). Calismamiz homozigot OHA li hastalar ile yapilmis olup literatür ile uyumlu olarak homozigot hastalardaki hsa-miR-451a dusuklugü sonucunu desteklemektedir. Bulgularimiz ayrıca hsa-miR-451a dusuklugünün homozigot hastalardaki artmis hemoliz ve transfuzyon ihtiyaci ile ve ferritin düzeyi yuksek olan OHA li hastalardaki artmis GDF-15 ekspresyonu ile iliskili olabilecegini dusundurmektedir.

Literatürde let 7 miRNA ailesinin (7a, 7b, 7c, 7d ve 7f) RBC’de yüksek düzeyde eksprese edildiğini bildirmiştir (Sangokoya, 2010). Li ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada hsa-let-7b-5p nin HbF ile negatif korele olduğunu bildirmişlerdir (Li ve ark. 2019). Başka bir çalışmada K562 hücreleriyle karşılaştırıldığında hematopoietik sistemdeki olgun eritrositlerin farklılaşmasında, let-7 ailesine bağlı mikroRNA’ların ekspresyonunun rol oynadığı gösterilmiştir (Chen, 2004). Chen ve arkadaşları Hb SS’li ve Hb AA’lı olguların eritrositlerinde let7 ailesinin ekspresyon düzeylerini çalışmışlar ve Hb SS’li olgularda let-7 ailesinin ekspresyon düzeylerinin Hb AA’lı olgulara göre düşük olduğunu bildirmişlerdir (Chen ve ark. 2008). Çalışmamız literatürle uyumlu olarak **hsa-let-7b-5p**’nin ekspresyon düzeyi hasta grubunda ortalama 0,46 (0,11-1,14), sağlıklı grupta ise ortalama 1,06 (0,29-2,64) olup OHA li grupta daha düşüktü ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,001$).

hsa-miR-199a-5p ekspresyon düzeyi hasta grubunda ortalama 0,84 (0,12-3,19), sağlıklı grupta ise ortalama 1,28 (0,1-2,98) olup OHA li grupta daha düşüktü ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı idi ($p=0,008$). Bildiğimiz kadarıyla hsa-miR-199a-5p ile OHA ilişkisini açıklayan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu veriler ışığında çalışmamızdaki hsa-miR-199a-5p’nin sağlıklı kontrol grubuna göre OHA li hastalardaki düşüklüğünün GDF-15’in aşırı ekspresyonuna, bu yolla hepsidin ekspresyonunun inhibisyonuna ve sonuç olarak ta demir aşırı birikimine katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz.

Destekleyici çalışmalar, let-7 miRNA ailesi de dahil olmak üzere fetal ve yetişkin eritroid progenitör hücrelerinde diferansiyel olarak eksprese edilen miRNA’lar tarafından hedeflenen genlerin ekspresyonunu bildirdi (Lessard ve ark. 2018, Oxendine Harp ve ark. 2022). Lee ve ark. LIN28B’ yi hedefleyen let-7’nin baskılanmasının, BCL11A ekspresyonunu da azalttığını ve yetişkin insan eritroblastlarında HbF’yi önemli ölçüde indüklediğini gözlemledi (Lee ve ark. 1993). Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak **hsa-let-7i-5p** ekspresyon düzeyi hasta grubunda ortalama 0,43 (0,13-1,21) ve sağlıklı grupta ise ortalama 1,04 (0,27-2,05) olup OHA li grupta daha düşüktü ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,001$). Dolayısıyla literatürle uyumlu olarak çalışmamızda yüksek HbF düzeyine sahip OHA li hasta grubunda düşük **hsa-let-7i-5p** ekspresyonunun olması, hsa-let-7i-5p ekspresyonunun HbF düzeyini etkilediğini göstermiştir. Ayrıca sağlıklı kontrol grubuna göre OHA li hastalardaki **hsa-let-7i-5p** düşüklüğünün GDF-15’in aşırı

ekspresyonuna, bu yolla hepsidin ekspresyonunun inhibisyonuna ve sonuç olarak ta demir aşırı birikimine katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz.



SONUÇ

Pediyatrik Orak hücreli anemi hastalarında, hepsidin ekspresyonunu baskılayarak demir birikimine katkıda bulunabilen GDF-15'in artmış ekspresyonunu aydınlatabilecek moleküler olaylardan GDF-15'in posttranskripsiyonel regülasyonunda miRNA'ların rolü araştırılmıştır.

- Antihepsidin etkili GDF-15'in ilişkili olabileceği miRNA'ların tespit edilmesi OHA li hastalardaki tekrarlayan hemoliz ve tranfüzyona bağlı komplikasyonların yönetiminde aşırı demir yükünü değerlendirmek için kullanılacak bir tanısal belirteç olabileceğini düşünmekteyiz. Nitekim çalışmamızda OHA li hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre daha düşük eksprese olduğunu tespit ettiğimiz miRNA'ların* OHA li hastalarda GDF-15' in aşırı ekspresyonuna, bu yolla hepsidin ekspresyonunun inhibisyonuna ve sonuç olarak ta demirin aşırı birikimine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. (*hsa-miR-144-3p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-210-3p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-20a-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-let-7i-5p)
- Çalışmamızda OHA li hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre hsa-miR-125b-5p yüksekliğinin hepsidin ekspresyonunun inhibisyonuna ve sonuç olarak ta demir aşırı birikimine katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz. Dolayısıyla OHA li hastalarda posttranskripsiyonel yolak üzerinden hepsidin gen ekspresyonunu engelleyen miRNA'ların** tespiti hem hepsidin moleküler regülasyonunun aydınlatılmasına katkı sağlayabilir hem de aşırı demir yükünün bir göstergesi olabileceğinden yeni tedavi yaklaşımlarına öncülük edebilir. (** hsa-miR-125b-5p)
- Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ışığında OHA tanısı alan çocukların ilk değerlendirilmesinde bu hastalığın morbidite ve mortalitesinin belirleyicisi olan demir birikimine yönelik prognozunun belirlenmesinde ilgili miRNA ların test edilmesinin bu hastalarda aşırı demir birikimine yönelik erken belirteçler olabilecekleri kanaatindeyiz.

- Son yapılan çalışmalarda miRNA düzeyinin globilin gen ekspresyonu üzerinden HbF üretimini artırarak terapötik amaçlı kullanımı hedeflenmektedir. Çalışmamız; literatüre bakıldığında OHA li pediatrik hastalarda hastalığın progresinde etkili olabilecek GDF-15'in posttranskripsiyonel moleküler regülasyonunda etkili olabilecek miRNA'ların ayrıca GDF-15 ve Hepsidinin hem gen ekspresyonunun hem de gen ürününün birlikte çalışıldığı ilgili miRNA ların tanısal ve terapötik amaçlı kullanımını hedefleyen araştırmalara öncülük edebilecek az sayıda olan klinik çalışmalardan biridir.

Çalışmamızdaki Limitasyonlar

Çalışmamızda tespit ettiğimiz OHA li hastalarda posttranskripsiyonel yolak üzerinden GDF-15 gen ekspresyonunu upregüle eden ve hepsidin gen ekspresyonunu downregüle eden miRNA'lar; hem antihepsidin etkili GDF-15 in aşırı ekspresyonu ile hepsidinin moleküler regülasyonun aydınlatılmasına katkı sağlayabilecek hem de düşük hepsidin ile ilişkili demir birikiminin bir göstergesi olabilecek belirteç olabilme potansiyelinde olduğu kanaatindeyiz. Ancak çalışma bütçesi nedeni ile kısıtlı hasta sayısı ve hedeflenen GDF-15-Hepsidin yolağı ile ilgili olabilecek ek moleküler analizlerin yapılamaması çalışmamızın kısıtlılıklarındandır.

Dolayısıyla çocuklarda OHA li hastalarda miRNA düzeyleri ile hastalığın prognozu arasında kesin ilişki kurulabilmesi amacıyla bu konuyla ilgili çoklu merkezlerde daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. **Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E ve ark** "Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography." *New England Journal of Medicine*(1998). 339(1): 5-11.
2. **Adesina OO and Neumayr LD** "Osteonecrosis in sickle cell disease: an update on risk factors, diagnosis, and management." *Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book*(2019). 2019(1): 351-358.
3. **Agrawal S, Burton WB, Manwani D, Rastogi D and De A** "A physicians survey assessing management of pulmonary airway involvement in sickle cell disease." *Pediatric pulmonology*(2019). 54(7): 993-1001.
4. **Ahmed MH, Ghatge MS and Safo MK** "Hemoglobin: structure, function and allostery." *Vertebrate and invertebrate respiratory proteins, lipoproteins and other body fluid proteins*(2020). 345-382.
5. **Akinsheye I, Alsultan A, Solovieff N, Ngo D, Baldwin CT ve ark** "Fetal hemoglobin in sickle cell anemia." *Blood*(2011). 118(1): 19-27.
6. **Aksoy M, Ikin EW, Mourant AE and Lehmann H** "Blood Groups, Haemoglobins, and Thalassaemia in Turks and Eti-Turks." *British Medical Journal*(1958). 2(5102): 937.
7. **Albayrak B, Darici MB, Kiraci F, Öğrenci AS, Özmen A ve ark.** Orak Hücreli Anemi Tespiti Sickle Cell Anemia Detection. (2018) Medical Technologies National Congress (TIPTEKNO), IEEE.
8. **Alsultan A, Alabdulaali MK, Griffin PJ, AlSuliman AM, Ghabbour HA ve ark** "Sickle cell disease in Saudi Arabia: the phenotype in adults with the Arab-Indian haplotype is not benign." *British journal of haematology*(2014). 164(4): 597-604.
9. **Altan M.** "2008-2019 yılları arasında Aydın ilinde premarital hemoglobinopati taraması sonuçlarının retrospektif olarak değerlendirilmesi." *Uzmanlık Tezi. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Aydın, 2019*
10. **Ameringer S, Elswick Jr R, Sisler I, Smith W, Lipato T ve ark** "Exercise testing of adolescents and young adults with sickle cell disease: perceptual responses and the gas exchange threshold." *Journal of Pediatric Oncology Nursing*(2019). 36(5): 310-320.
11. **Andrews NC** "Iron homeostasis: insights from genetics and animal models." *Nature reviews genetics*(2000). 1(3): 208-217.
12. **Andriopoulos Jr B, Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S ve ark** "BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism." *Nature genetics*(2009). 41(4): 482-487.
13. **Antmen B** "Orak hücre anemisi Derleme." *Türk Pediatri Arşivi*(2009). 44(11): 39-42.
14. **Ardekani AM and Naeini MM** "The role of microRNAs in human diseases." *Avicenna journal of medical biotechnology*(2010). 2(4): 161.
15. **Arezes J, Foy N, McHugh K, Sawant A, Quinkert D ve ark** "Erythroferrone inhibits the induction of hepcidin by BMP6." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*(2018). 132(14): 1473-1477.
16. **Arezes J and Nemeth E** "Hepcidin and iron disorders: new biology and clinical approaches." *International journal of laboratory hematology*(2015). 37(92-98).
17. **Arigliani M, Kitenge R, Castriotta L, Ndjule P, Barbato V ve ark** "Lung function in children with sickle cell disease from Central Africa." *Thorax*(2019). 74(6): 604-606.
18. **Arndt S, Maegdefrau U, Dorn C, Schardt K, Hellerbrand C ve ark** "Iron-induced expression of bone morphogenic protein 6 in intestinal cells is the main regulator of hepatic hepcidin expression in vivo." *Gastroenterology*(2010). 138(1): 372-382.
19. **Arpacı A, Aksoy K and Dikmen N** "Çukurova'da orak hücre anemisi ve talassemi taraması." XXII. Ulusal Hematoloji Kongresi, İstanbul(1991). 115(
20. **Arpacı A, Aytaç N, Yüregir GT, Tuli A and Aksoy K** "An education programme on sickle cell anemia and β -thalassemia for the 8th grade students." (2003).

21. **Ataga KI, Moore CG, Jones S, Olajide O, Strayhorn D ve ark** "Pulmonary hypertension in patients with sickle cell disease: a longitudinal study." *British journal of haematology*(2006). 134(1): 109-115.
22. **Bartnikas TB and Fleming MD** "A tincture of hepcidin cures all: the potential for hepcidin therapeutics." *The Journal of clinical investigation*(2010). 120(12): 4187-4190.
23. **Baumann BH, Shu W, Song Y, Simpson EM, Lakhal-Littleton S ve ark** "Ferroportin-mediated iron export from vascular endothelial cells in retina and brain." *Experimental eye research*(2019). 187(107728).
24. **Bergamaschi G, Di Sabatino A, Pasini A, Ubezio C, Costanzo F ve ark** "Intestinal expression of genes implicated in iron absorption and their regulation by hepcidin." *Clinical Nutrition*(2017). 36(5): 1427-1433.
25. **Beutler E** "Disorders of hemoglobin structure: sickle cell anemia and related abnormalities." *Williams hematology*(2006).
26. **Bianchi N, Zuccato C, Finotti A, Lampronti I, Borgatti M ve ark** "Involvement of miRNA in erythroid differentiation." *Epigenomics*(2012). 4(1): 51-65.
27. **Bianchi N, Zuccato C, Lampronti I, Borgatti M and Gambari R** "Expression of miR-210 during erythroid differentiation and induction of gamma-globin gene expression." *BMB Rep*(2009). 42(8): 493-499.
28. **Biassi TP, Guerra-Shinohara EM, Moretti PNS, de Freitas Dutra V, Cabañas-Pedro AC ve ark** "miRNA profile and disease severity in patients with sickle cell anemia." *Annals of Hematology*(2022). 101(27-34).
29. **Blouin M-J, De Paepe ME and Trudel M** "Altered hematopoiesis in murine sickle cell disease." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*(1999). 94(4): 1451-1459.
30. **Bonanomi MTBC and Lavezzo MM** "Sickle cell retinopathy: diagnosis and treatment." *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*(2013). 76(320-327).
31. **Booth C, Inusa B and Obaro SK** "Infection in sickle cell disease: a review." *International Journal of Infectious Diseases*(2010). 14(1): e2-e12.
32. **Brandow A and Liem R** "Advances in the diagnosis and treatment of sickle cell disease." *Journal of hematology & oncology*(2022). 15(1): 20.
33. **Brousse V, El Hoss S, Bouazza N, Arnaud C, Bernaudin F ve ark** "Prognostic factors of disease severity in infants with sickle cell anemia: A comprehensive longitudinal cohort study." *American Journal of Hematology*(2018). 93(11): 1411-1419.
34. **Brousse V, Elie C, Benkerrou M, Odièvre MH, Lesprit E ve ark** "Acute splenic sequestration crisis in sickle cell disease: cohort study of 190 paediatric patients." *British journal of haematology*(2012). 156(5): 643-648.
35. **Byon JC and Papayannopoulou T** "MicroRNAs: Allies or foes in erythropoiesis?" *Journal of cellular physiology*(2012). 227(1): 7-13.
36. **Byrd KA, Williams TN, Lin A, Pickering AJ, Arnold BF ve ark** "Sickle cell and α -thalassemia traits influence the association between ferritin and hepcidin in rural Kenyan children aged 14–26 months." *The Journal of nutrition*(2018). 148(12): 1903-1910.
37. **Champe PC, Harvey RA and Ferrier DR** "Lippincott's illustrated reviews serisinden: Biyokimya." Çeviri: Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E(1997). 2(33-34).
38. **Chang K-C, Sun C, Cameron EG, Madaan A, Wu S ve ark** "Opposing effects of growth and differentiation factors in cell-fate specification." *Current Biology*(2019). 29(12): 1963-1975. e1965.
39. **Chen S-Y, Wang Y, Telen MJ and Chi J-T** "The genomic analysis of erythrocyte microRNA expression in sickle cell diseases." *PloS one*(2008). 3(6): e2360.
40. **Chiou B, Neal EH, Bowman AB, Lippmann ES, Simpson IA ve ark** "Endothelial cells are critical regulators of iron transport in a model of the human blood–brain barrier." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*(2019). 39(11): 2117-2131.
41. **Clark B and Thein S** "Molecular diagnosis of haemoglobin disorders." *Clinical & Laboratory Haematology*(2004). 26(3): 159-176.

42. **Cokic VP, Beleslin-Cokic BB, Tomic M, Stojilkovic SS, Noguchi CT ve ark** "Hydroxyurea induces the eNOS-cGMP pathway in endothelial cells." *Blood*(2006). 108(1): 184-191.
43. **Cui M, Wang H, Yao X, Zhang D, Xie Y ve ark** "Circulating microRNAs in cancer: potential and challenge." *Frontiers in genetics*(2019). 10(626).
44. **Cuny GD, Paul BY, Laha JK, Xing X, Liu J-F ve ark** "Structure–activity relationship study of bone morphogenetic protein (BMP) signaling inhibitors." *Bioorganic & medicinal chemistry letters*(2008). 18(15): 4388-4392.
45. **Dahmani F, Benkirane S, Kouzih J, Woumki A, Mamad H ve ark** "Etude de l'hémogramme dans la drépanocytose homozygote: à propos de 87 patients." *The Pan African Medical Journal*(2016). 25(
46. **Darden DB, Stortz JA, Hollen MK, Cox MC, Apple CG ve ark** "Identification of unique mRNA and miRNA expression patterns in bone marrow hematopoietic stem and progenitor cells after trauma in older adults." *Frontiers in Immunology*(2020). 11(1289).
47. **David AN, Jinadu MY, Wapmuk AE, Gbajabiamila TA, Okwuzu JO ve ark** "Prevalence and impact of sickle cell trait on the clinical and laboratory parameters of HIV infected children in Lagos, Nigeria." *Pan African Medical Journal*(2018). 31(1).
48. **de Vasconcellos JF, Byrnes C, Lee YT, Allwardt JM, Kaushal M ve ark** "Tough decoy targeting of predominant let-7 miRNA species in adult human hematopoietic cells." *Journal of translational medicine*(2017). 15(1-13).
49. **Détivaud Lnc, Nemeth E, Boudjema K, Turlin B, Troadec M-B ve ark** "Hepcidin levels in humans are correlated with hepatic iron stores, hemoglobin levels, and hepatic function." *Blood*(2005). 106(2): 746-748.
50. **Dore LC, Amigo JD, Dos Santos CO, Zhang Z, Gai X ve ark** "A GATA-1-regulated microRNA locus essential for erythropoiesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences*(2008). 105(9): 3333-3338.
51. **Doss JF, Corcoran DL, Jima DD, Telen MJ, Dave SS ve ark** "A comprehensive joint analysis of the long and short RNA transcriptomes of human erythrocytes." *BMC genomics*(2015). 16(1-16).
52. **Druey A, Robinson B and Nelson K** "Self-management recommendations for sickle cell disease: A Ghanaian health professionals' perspective." *Health Science Reports*(2018). 1(11): e88.
53. **Dubach R, Moore CV and Callender S** "Studies in iron transportation and metabolism: IX. The excretion of iron as measured by the isotope technique." *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*(1955). 45(4): 599-615.
54. **Eaton WA** "Linus Pauling and sickle cell disease." *Biophysical chemistry*(2002). 100(1-3): 109-116.
55. **El Hoss S, Cochet S, Godard A, Yan H, Dussiot M ve ark** "Fetal hemoglobin rescues ineffective erythropoiesis in sickle cell disease." *Blood*(2020). 136(14-15).
56. **Elbostany EA, Elghoury EA, Thabet EH, Rashad AA, Rasheed EA ve ark** "Oxidative stress and hepcidin expression in pediatric sickle cell anemia with iron overload." *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*(2021).
57. **Elghazaly AA, Aljatham AA, Khan AM, Elneil RM, Jafar SZS ve ark** "Patterns of prescribing hydroxyurea for sickle cell disease patients from a central hospital, Saudi Arabia." *Hematology Reports*(2019). 11(1): 7860.
58. **Erdei J, Tóth A, Balogh E, Nyakundi BB, Bányai E ve ark** "Induction of NLRP3 inflammasome activation by heme in human endothelial cells." *Oxidative medicine and cellular longevity*(2018). 2018(
59. **Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D ve ark** "MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation." *Proceedings of the National Academy of Sciences*(2005). 102(50): 18081-18086.

60. **Felli N, Pedini F, Romania P, Biffoni M, Morsilli O ve ark** "MicroRNA 223-dependent expression of LMO2 regulates normal erythropoiesis." *haematologica*(2009). 94(4): 479.
61. **Fertrin KY, Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Hatzlhofer BL ve ark** "High Transferrin Saturation Is Associated with Lower Monocytic Ferritin Heavy Chain Expression in Sick Cell Anemia Patients." *Blood*(2014). 124(21): 4058.
62. **Fertrin KY, Lanaro C, Franco-Penteado CF, de Albuquerque DM, de Mello MRB ve ark** "Erythropoiesis-driven regulation of hepcidin in human red cell disorders is better reflected through concentrations of soluble transferrin receptor rather than growth differentiation factor 15." *American journal of hematology*(2014). 89(4): 385-390.
63. **Finch CA, Lee MY and Leonard JM** "Continuous RBC transfusions in a patient with sickle cell disease." *Archives of Internal Medicine*(1982). 142(2): 279-282.
64. **Frenette PS and Atweh GF** "Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise." *The Journal of clinical investigation*(2007). 117(4): 850-858.
65. **Gabbianelli M, Testa U, Morsilli O, Pelosi E, Saulle E ve ark** "Mechanism of human Hb switching: a possible role of the kit receptor/miR 221-222 complex." *Haematologica*(2010). 95(8): 1253.
66. **Ganz T** "Molecular control of iron transport." *Journal of the American Society of Nephrology*(2007). 18(2): 394-400.
67. **Ganz T and Nemeth E** "Hepcidin and iron homeostasis." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*(2012). 1823(9): 1434-1443.
68. **Gell DA** "Structure and function of haemoglobins." *Blood Cells, Molecules, and Diseases*(2018). 70(13-42).
69. **Genç A.** "Hemoglobin Varyantlarının DNA Dizi Analizi ile Belirlenmesi" Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2005.
70. **Ghosh K, Ghosh K, Agrawal R and Nadkarni AH** "Recent advances in screening and diagnosis of hemoglobinopathy." *Expert Review of Hematology*(2020). 13(1): 13-21.
71. **Giordano PC, Harteveld CL and Bakker E** "Genetic epidemiology and preventive healthcare in multiethnic societies: the hemoglobinopathies." *International journal of environmental research and public health*(2014). 11(6): 6136-6146.
72. **Güzelgöl F** "Orak hücre anemili olgularda miRNA ekspresyon düzeylerinin RT-PCR ile belirlenmesi."Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilimdalı, ADANA,2014.
73. **Hasegawa S, Rodgers G, Dwyer N, Noguchi C, Blanchette-Mackie E ve ark** "Sickling of nucleated erythroid precursors from patients with sickle cell anemia." *Experimental hematology*(1998). 26(4): 314-319.
74. **Hassell KL** "Population estimates of sickle cell disease in the US." *American journal of preventive medicine*(2010). 38(4): S512-S521.
75. **Hata A and Chen Y-G** "TGF- β signaling from receptors to Smads." *Cold Spring Harbor perspectives in biology*(2016). 8(9): a022061.
76. **Havelange V and Garzon R** "MicroRNAs: emerging key regulators of hematopoiesis." *American journal of hematology*(2010). 85(12): 935-942.
77. **Haydock MM, Elhamdani S and Alsharedi M** "Long-term direct oral anticoagulation in primary osteonecrosis with elevated plasminogen activation inhibitor." *SAGE Open Medical Case Reports*(2019). 7(2050313X19827747).
78. **He Z and Russell JE** "Expression, purification, and characterization of human hemoglobins Gower-1 ($\zeta\epsilon 2$), Gower-2 ($\alpha\epsilon 2$), and Portland-2 ($\zeta\beta 2$) assembled in complex transgenic–knockout mice." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*(2001). 97(4): 1099-1105.
79. **Herrick JB** "Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. 1910." *The Yale journal of biology and medicine*(2001). 74(3): 179.

80. **Hillery CA, Kerstein PC, Vilceanu D, Barabas ME, Retherford D ve ark** "Transient receptor potential vanilloid 1 mediates pain in mice with severe sickle cell disease." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*(2011). 118(12): 3376-3383.
81. **Hoffbrand AV, Taher A and Cappellini MD** "How I treat transfusional iron overload." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*(2012). 120(18): 3657-3669.
82. **Hojjati MT, Azarkeivan A, Pourfathollah AA and Amirzadeh N** "Comparison of MicroRNAs mediated in reactivation of the γ -globin in β -thalassemia patients, responders and non-responders to hydroxyurea." *Hemoglobin*(2017). 41(2): 110-115.
83. **Houwing M, De Pagter P, Van Beers E, Biemond B, Rettenbacher E ve ark** "Sickle cell disease: clinical presentation and management of a global health challenge." *Blood reviews*(2019). 37(100580).
84. **Howard J and Davies S** "Sickle cell disease in North Europe." *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*(2007). 67(1): 27-38.
85. **Huisman TH** Separation and characterization of hemoglobins, 1st Ed ACS Publications. (1976):1-48.
86. **İnal G and Arpacı A** "Molecular and Cellular Pathophysiology of Sickle Cell Anemia." *Türk Klinik Biyokimya Derg* (2021); 19(1): 89-98
87. **Inati A, Khoriaty E and Musallam KM** "Iron in sickle-cell disease: What have we learned over the years?" *Pediatric blood & cancer*(2011). 56(2): 182-190.
88. **Investigators OPSPiSCAT** "Discontinuing prophylactic transfusions used to prevent stroke in sickle cell disease." *New England Journal of Medicine*(2005). 353(26): 2769-2778.
89. **Jain S, Kapetanaki MG, Raghavachari N, Woodhouse K, Yu G ve ark** "Expression of regulatory platelet microRNAs in patients with sickle cell disease." *PloS one*(2013). 8(4): e60932.
90. **Jiang S** "MicroRNA-451 Escapes Global MicroRNA Crisis by Clustered Neighboring MicroRNA-144 During Erythropoiesis." *Molecular cell*(2020). 78(5): 808-810.
91. **Joshi SR, McLendon JM, Comer BS and Gerthoffer WT** "MicroRNAs-control of essential genes: implications for pulmonary vascular disease." *Pulmonary circulation*(2011). 1(3): 357-364.
92. **Kanda J, Mizumoto C, Kawabata H, Tsuchida H, Tomosugi N ve ark** "Serum hepcidin level and erythropoietic activity after hematopoietic stem cell transplantation." *haematologica*(2008). 93(10): 1550-1554.
93. **Kapoor S, Little JA and Pecker LH** Advances in the treatment of sickle cell disease. (2018). Mayo Clinic Proceedings, Elsevier.
94. **Kassim AA, Galadanci NA, Pruthi S and DeBaun MR** "How I treat and manage strokes in sickle cell disease." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*(2015). 125(22): 3401-3410.
95. **Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E ve ark** "Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism." *Nature genetics*(2014). 46(7): 678-684.
96. **Kautz L, Meynard D, Monnier A, Darnaud V, Bouvet R ve ark** "Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*(2008). 112(4): 1503-1509.
97. **Kearney SL, Nemeth E, Neufeld EJ, Thapa D, Ganz T ve ark** "Urinary hepcidin in congenital chronic anemias." *Pediatric blood & cancer*(2007). 48(1): 57-63.
98. **Kerkhoffs J, Giordano P and Wijermans P** "Sikkelcelziekte en thalassemie in Den Haag: een perspectief voor een Haags Hemoglobinoopathie Centrum." *Epidemiologisch bulletin*(2007).
99. **Khalyfa A, Kheirandish-Gozal L, Khalyfa AA, Philby MF, Alonso-Álvarez ML ve ark** "Circulating plasma extracellular microvesicle microRNA cargo and endothelial

- dysfunction in children with obstructive sleep apnea." American journal of respiratory and critical care medicine(2016). 194(9): 1116-1126.
100. **Kim VN** "Small RNAs: classification, biogenesis, and function". *Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV)*, (2005). 19(1).
 101. **Kim M, Tan YS, Cheng WC, Kingsbury TJ, Heimfeld S ve ark** "MIR 144 and MIR 451 regulate human erythropoiesis via RAB 14." British journal of haematology(2015). 168(4): 583-597.
 102. **KORKMAZ M, Berna K, DİRİCAN E and ARPACI A** "Orak Hücre Anemili Hastalarda Osteoporoz ile İlişkili Biyokimyasal Markerlerin Tanıdaki Yeri." The Medical Journal of Mustafa Kemal University(2021). 12(44): 231-235.
 103. **Kroot JJ, Laarakkers CM, Kemna EH, Biemond BJ and Swinkels DW** "Regulation of serum hepcidin levels in sickle cell disease." Haematologica(2009). 94(6): 885.
 104. **Lawrie CH** "microRNA expression in erythropoiesis and erythroid disorders." British journal of haematology(2010). 150(2): 144-151.
 105. **Lebensburger J, Johnson SM, Askenazi DJ, Rozario NL, Howard TH ve ark** "Protective role of hemoglobin and fetal hemoglobin in early kidney disease for children with sickle cell anemia." American journal of hematology(2011). 86(5): 430-432.
 106. **Lee RC, Feinbaum RL and Ambros V** "The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14." cell(1993). 75(5): 843-854.
 107. **Lessard S, Beaudoin M, Orkin SH, Bauer DE and Lettre G** "14q32 and let-7 microRNAs regulate transcriptional networks in fetal and adult human erythroblasts." Human molecular genetics(2018). 27(8): 1411-1420.
 108. **Li B, Zhu X, Ward CM, Starlard-Davenport A, Takezaki M ve ark** "MIR-144-mediated NRF2 gene silencing inhibits fetal hemoglobin expression in sickle cell disease." Experimental hematology(2019). 70(85-96. e85.
 109. **Li B, Zhu X, Ward CM, Starlard-Davenport A, Takezaki M ve ark** "MIR-144-mediated NRF2 gene silencing inhibits fetal hemoglobin expression in sickle cell disease." Exp Hematol(2019). 70(85-96.e85.
 110. **Liem RI** "Balancing exercise risk and benefits: lessons learned from sickle cell trait and sickle cell anemia." Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book(2018). 2018(1): 418-425.
 111. **Livak KJ and Schmittgen TD** "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method." methods(2001). 25(4): 402-408.
 112. **Lopes FCM, Ferreira R, Albuquerque DM, Silveira AAA, Costa R ve ark** "In vitro and in vivo anti-angiogenic effects of hydroxyurea." Microvascular research(2014). 94(106-113.
 113. **Ma Y-N, Chen M-T, Wu Z-K, Zhao H-L, Yu H-C ve ark** "Emodin can induce K562 cells to erythroid differentiation and improve the expression of globin genes." Molecular and cellular biochemistry(2013). 382(127-136.
 114. **Mabaera R, West RJ, Conine SJ, Macari ER, Boyd CD ve ark** "A cell stress signaling model of fetal hemoglobin induction: what doesn't kill red blood cells may make them stronger." Experimental hematology(2008). 36(9): 1057-1072.
 115. **Mangla A, Ehsan M, Agarwal N, Maruvada S and Doerr C** Sickle Cell Anemia (Nursing). (2021). StatPearls [Internet], StatPearls Publishing.
 116. **Mariani R, Trombini P, Pozzi M and Piperno A** "Iron metabolism in thalassemia and sickle cell disease." Mediterranean journal of hematology and infectious diseases(2009). 1(1).
 117. **Martins RA, Soares RS, Vito FBD, Barbosa VdF, Silva SS ve ark** "Cholelithiasis and its complications in sickle cell disease in a university hospital." Revista brasileira de hematologia e hemoterapia(2017). 39(28-31.
 118. **May J, Evans JA, Timmann C, Ehmen C, Busch W ve ark** "Hemoglobin variants and disease manifestations in severe falciparum malaria." Jama(2007). 297(20): 2220-2226.

119. **Mitra T ve Elangovan S** "Cervical cancer development, chemoresistance, and therapy: a snapshot of involvement of microRNA". *Molecular and Cellular Biochemistry*, (2021).476(12): 4363-4385.
120. **Moran CJ, Siegel MJ and Debaun MR** "Sickle cell disease: imaging of cerebrovascular complications." *Radiology*(1998). 206(2): 311-321.
121. **Namaste SM, Rohner F, Huang J, Bhushan NL, Flores-Ayala R ve ark** "Adjusting ferritin concentrations for inflammation: Biomarkers Reflecting Inflammation and Nutritional Determinants of Anemia (BRINDA) project." *The American journal of clinical nutrition*(2017). 106(suppl_1): 359S-371S.
122. **Nascimento AF, Oliveira JS, Silva Junior JC and Barbosa AAL** "Haplotypes and polymorphism in the CCR5 gene in sickle cell disease." *Genet Mol Res*(2017). 16(2).
123. **Nemeth E** "Iron regulation and erythropoiesis." *Current opinion in hematology*(2008). 15(3): 169-175.
124. **Nemeth E and Ganz T** "The role of hepcidin in iron metabolism." *Acta haematologica*(2009). 122(2-3): 78-86.
125. **Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S ve ark** "IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin." *The Journal of clinical investigation*(2004). 113(9): 1271-1276.
126. **Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A ve ark** "Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*(2003). 101(7): 2461-2463.
127. **Ngo DA, Aygun B, Akinsheye I, Hankins JS, Bhan I ve ark** "Fetal haemoglobin levels and haematological characteristics of compound heterozygotes for haemoglobin S and deletional hereditary persistence of fetal haemoglobin." *Br J Haematol*(2012). 156(2): 259-264.
128. **Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C ve ark** "Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin." *Proceedings of the National Academy of Sciences*(2002). 99(7): 4596-4601.
129. **Noguchi T, Ikeda M, Murakami M, Masuzawa M, Imamura T ve ark** "Regulatory expression of bone morphogenetic protein 6 by 2, 2'-dipyridyl." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*(2020). 1864(8): 129610.
130. **Noh S-J, Miller SH, Lee YT, Goh S-H, Marincola FM ve ark** "Let-7 microRNAs are developmentally regulated in circulating human erythroid cells." *Journal of translational medicine*(2009). 7(1): 1-7.
131. **Ogunsile FJ, Naik R and Lanzkron S** "Overcoming challenges of venous thromboembolism in sickle cell disease treatment." *Expert review of hematology*(2019). 12(3): 173-182.
132. **Old J** "Screening and genetic diagnosis of haemoglobinopathies." *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*(2007). 67(1): 71-86.
133. **Omena J, Cople-Rodrigues CDS, Cardoso JDdA, Soares AR, Fleury MK ve ark** "Serum hepcidin concentration in individuals with sickle cell anemia: Basis for the dietary recommendation of iron." *Nutrients*(2018). 10(4): 498.
134. **Origa R, Galanello R, Ganz T, Giagu N, Maccioni L ve ark** "Liver iron concentrations and urinary hepcidin in β -thalassemia." *Haematologica*(2007). 92(5): 583-588.
135. **Oxendine Harp K, Bashi A, Botchway F, Dei-Adomakoh Y, Iqbal SA ve ark** "MicroRNAs miR-451a and let-7i-5p profiles in circulating exosomes vary among individuals with different sickle hemoglobin genotypes and malaria." *Journal of Clinical Medicine*(2022). 11(3): 500.
136. **Pack-Mabien A and Haynes Jr J** "A primary care provider's guide to preventive and acute care management of adults and children with sickle cell disease." *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*(2009). 21(5): 250-257.

137. **Pai M, Yeung CH, Akl EA, Darzi A, Hillis C ve ark** "Strategies for eliciting and synthesizing evidence for guidelines in rare diseases." *BMC medical research methodology*(2019). 19(1-10).
138. **Papasavva PL, Papaioannou NY, Patsali P, Kurita R, Nakamura Y ve ark** "Distinct miRNA signatures and networks discern fetal from adult erythroid differentiation and primary from immortalized erythroid cells." *International journal of molecular sciences*(2021). 22(7): 3626.
139. **Patel N, Masaratana P, Diaz-Castro J, Latunde-Dada GO, Qureshi A ve ark** "BMPER protein is a negative regulator of hepcidin and is up-regulated in hypotransferrinemic mice." *Journal of Biological Chemistry*(2012). 287(6): 4099-4106.
140. **Pellin D, Loperfido M, Baricordi C, Wolock SL, Montepeloso A ve ark** "A comprehensive single cell transcriptional landscape of human hematopoietic progenitors." *Nature communications*(2019). 10(1): 2395.
141. **Perutz MF, Rossmann MG, Cullis AF, Muirhead H, Will G ve ark** "Structure of hæmoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å. resolution, obtained by X-ray analysis." *Nature*(1960). 185(416-422).
142. **Pham P-TT, Pham P-CT, Wilkinson AH and Lew SQ** "Renal abnormalities in sickle cell disease." *Kidney international*(2000). 57(1): 1-8.
143. **Piel FB, Hay SI, Gupta S, Weatherall DJ and Williams TN** "Global burden of sickle cell anaemia in children under five, 2010–2050: modelling based on demographics, excess mortality, and interventions." *PLoS medicine*(2013). 10(7): e1001484.
144. **Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW ve ark** "Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates." *The Lancet*(2013). 381(9861): 142-151.
145. **Piel FB, Steinberg MH and Rees DC** "Sickle cell disease." *New England Journal of Medicine*(2017). 376(16): 1561-1573.
146. **Porter JB** "Pathophysiology of transfusional iron overload: contrasting patterns in thalassemia major and sickle cell disease." *Hemoglobin*(2009). 33(sup1): S37-S45.
147. **Pritchard CC, Kroh E, Wood B, Arroyo JD, Dougherty KJ ve ark** "Blood Cell Origin of Circulating MicroRNAs: A Cautionary Note for Cancer Biomarker StudiesCirculating MicroRNA Biomarkers and Blood Cells." *Cancer prevention research*(2012). 5(3): 492-497.
148. **Pule GD, Mowla S, Novitzky N and Wonkam A** "Hydroxyurea down-regulates BCL11A, KLF-1 and MYB through miRNA-mediated actions to induce γ -globin expression: implications for new therapeutic approaches of sickle cell disease." *Clinical and translational medicine*(2016). 5(1): 1-15.
149. **Pule GD, Mowla S, Novitzky N and Wonkam A** "Hydroxyurea down-regulates BCL11A, KLF-1 and MYB through miRNA-mediated actions to induce γ -globin expression: implications for new therapeutic approaches of sickle cell disease." *Clin Transl Med*(2016). 5(1): 15.
150. **Quinn CT** "Minireview: clinical severity in sickle cell disease: the challenges of definition and prognostication." *Experimental biology and medicine*(2016). 241(7): 679-688.
151. **Raghupathy R, Manwani D and Little JA** "Iron overload in sickle cell disease." *Advances in hematology*(2010). 2010(
152. **Raisch J, Darfeuille-Michaud A and Nguyen HTT** "Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer." *World journal of gastroenterology: WJG*(2013). 19(20): 2985.
153. **Rao SP, Miller ST and Cohen BJ** "Transient aplastic crisis in patients with sickle cell disease: B19 parvovirus studies during a 7-year period." *American journal of diseases of children*(1992). 146(11): 1328-1330.

154. **Rao X, Huang X, Zhou Z and Lin X** "An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis." *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*(2013). 3(3): 71.
155. **Rashidy FH, Elghar HMA, Eldin SMK and Taha MZ** "Hepcidin and iron regulation in chronic hemolytic anemia." *Menoufia Medical Journal*(2015). 28(2): 463.
156. **Rees DC, Williams TN and Gladwin MT** "Sickle-cell disease." *The Lancet*(2010). 376(9757): 2018-2031.
157. Rehberi HT TC Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu, 2016, Ankara.
158. **Rivella S** "Ineffective erythropoiesis and thalassemias." *Current opinion in hematology*(2009). 16(3): 187.
159. **Rivkin N, Chapnik E, Mildner A, Barshtein G, Porat Z ve ark** "Erythrocyte survival is controlled by microRNA-142." *Haematologica*(2017). 102(4): 676.
160. **Rochette L, Dogon G, Zeller M, Cottin Y and Vergely C** "GDF15 and cardiac cells: current concepts and new insights." *International Journal of Molecular Sciences*(2021). 22(16): 8889.
161. **Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Girelli D ve ark** "Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis." *Nature genetics*(2003). 33(1): 21-22.
162. **Rogers ZR** "Priapism in sickle cell disease." *Hematology/Oncology Clinics*(2005). 19(5): 917-928.
163. **Ross SL, Tran L, Winters A, Lee K-J, Plewa C ve ark** "Molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin internalization requires ferroportin lysines, not tyrosines or JAK-STAT." *Cell metabolism*(2012). 15(6): 905-917.
164. **Saki N, Abroun S, Soleimani M, Kavianpour M, Shahjahani M ve ark** "MicroRNA expression in β -thalassemia and sickle cell disease: a role in the induction of fetal hemoglobin." *Cell Journal (Yakhteh)*(2016). 17(4): 583.
165. **Sangokoya C, LaMonte G and Chi J-T** "Isolation and characterization of microRNAs of human mature erythrocytes." *MicroRNAs and the Immune System: Methods and Protocols*(2010). 193-203.
166. **Sangokoya C, Telen MJ and Chi J-T** "microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*(2010). 116(20): 4338-4348.
167. **Sangokoya C, Telen MJ and Chi JT** "microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease." *Blood*(2010). 116(20): 4338-4348.
168. **Sarakul O, Vattanaviboon P, Tanaka Y, Fucharoen S, Abe Y ve ark** "Enhanced erythroid cell differentiation in hypoxic condition is in part contributed by miR-210." *Blood Cells, Molecules, and Diseases*(2013). 51(2): 98-103.
169. **Saxena R, Banerjee T and Aniyery R** "Thalassemia and its Management during Pregnancy." *World J Anemia*(2017). 1(1): 5-17.
170. **Sayani F, Bansal S, Evans P, Weljie A, Hider RC ve ark** "Disease Specific Modulation of Serum Hepcidin: Impact of GDF-15 and Iron Metabolism Markers in Thalassemia Major, Thalassemia Intermedia and Sickle Cell Disease: A Univariate and Multivariate Analysis." *Blood*(2008). 112(11): 3850.
171. **Sedrak A and Kondamudi NP**. Sickle cell disease. *StatPearls* [Internet], (2021)StatPearls Publishing.
172. **Serjeant GR** "The emerging understanding of sickle cell disease." *British journal of haematology*(2001). 112(1): 3-18.
173. **Shen J, Wongtong N, Noubouossie D, Elsherif L, Zhou Q ve ark** (2015). Lack of difference in hepcidin levels in sickle cell anemia and sickle cell beta thalassemia, *Blood* (2015).126(23):4591-4591

174. **Shkurnikov MY, Knyazev E, Fomicheva K, Mikhailenko D, Nyushko K ve ark** "Analysis of plasma microRNA associated with hemolysis." *Bulletin of experimental biology and medicine*(2016). 160(748-750).
175. **Sow FB, Florence WC, Satoskar AR, Schlesinger LS, Zwilling BS ve ark** "Expression and localization of hepcidin in macrophages: a role in host defense against tuberculosis." *Journal of leukocyte biology*(2007). 82(4): 934-945.
176. **Söylemez-Gökyer D and Kayaaltı Z** "Türkiye’de orak hücreli anemi dağılımı, patofizyolojisi ve demir toksisitesi." *Marmara Pharmaceutical Journal*(2016). 20(2): 92-99.
177. **Starlard-Davenport A, Gu Q and Pace BS** "Targeting genetic modifiers of HBG gene expression in sickle cell disease: the miRNA option." *Molecular Diagnosis & Therapy*(2022). 26(5): 497-509.
178. **Starlard-Davenport A, Smith A, Vu L, Li B and Pace BS** "MIR 29B mediates epigenetic mechanisms of HBG gene activation." *British journal of haematology*(2019). 186(1): 91-100.
179. **Stein PD, Beemath A, Meyers FA, Skaf E and Olson RE** "Deep venous thrombosis and pulmonary embolism in hospitalized patients with sickle cell disease." *The American journal of medicine*(2006). 119(10): 897. e897-897. e811.
180. **Steinberg MH** "Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia." *The Scientific World Journal*(2009). 9(46-67).
181. **Steinberg MH** "Fetal hemoglobin in sickle cell anemia." *Blood*(2020). 136(21): 2392-2400.
182. **Stuart MJ and Nagel RL** "Sickle-cell disease." *The Lancet*(2004). 364(9442): 1343-1360.
183. **Subha Palaneeswari M, Ganesh M, Karthikeyan T, Manjula Devi A and Mythili S** "Hepcidin—Minireview." *Journal of Clinical & Diagnostic Research*(2013). 7(8).
184. **Sun L, Yu Y, Niu B and Wang D** "Red blood cells as potential repositories of microRNAs in the circulatory system." *Frontiers in genetics*(2020). 11(442).
185. **Tamary H, Shalev H, Perez-Avraham G, Zoldan M, Levi I ve ark** "Elevated growth differentiation factor 15 expression in patients with congenital dyserythropoietic anemia type I." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*(2008). 112(13): 5241-5244.
186. **Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh S-H, Staker P ve ark** "High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin." *Nature medicine*(2007). 13(9): 1096-1101.
187. **Tanno T, Noel P and Miller JL** "Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease." *Current opinion in hematology*(2010). 17(3): 184.
188. **Tantawy AAG, Adly AAM, Ismail EAR, Darwish YW and Zedan MA** "Growth differentiation factor-15 in young sickle cell disease patients: relation to hemolysis, iron overload and vascular complications." *Blood Cells, Molecules, and Diseases*(2014). 53(4): 189-193.
189. **Thom CS, Dickson CF, Gell DA and Weiss MJ** "Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates." *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*(2013). 3(3): a011858.
190. **Thompson MW, McInnes R and Willard H** "Thompson & Thompson." *Genetics in medicine*(1991). 5(53-93).
191. **Torkildson JC and Agrawal AK** (2012). *Handbook of pediatric hematology and oncology*, Blackwell Publishing.
192. **Toxqui L, De Piero A, Courtois V, Bastida S, Sanchez-Muniz F ve ark** "Iron deficiency and overload. Implications in oxidative stress and cardiovascular health." *Nutricion hospitalaria*(2010). 25(3): 350-365.

193. **Uwaezuoke SN, Ayuk AC, Ndu IK, Eneh CI, Mbanefo NR ve ark** "Vaso-occlusive crisis in sickle cell disease: current paradigm on pain management." *Journal of pain research*(2018). 3141-3150.
194. **van Vliet ME, Kerkhoffs J-LH, Harteveld CL and Houwink EJ** "Hemoglobinopathy prevention in primary care: a reflection of underdetection and difficulties with accessibility of medical care, a quantitative study." *European Journal of Human Genetics*(2022). 30(7): 790-794.
195. **Vardiman J, Thiele J, Arber D, Brunning R, Borowitz M ve ark** "Does HbF induction by hydroxycarbamide work through MIR210 in sickle cell anaemia patients?" *British Journal of Haematology*(2016). 173(786-803).
196. **Verma HK, Ratre YK, Bhaskar L and Colombatti R** "Erythrocyte microRNAs: a tiny magic bullet with great potential for sickle cell disease therapy." *Annals of Hematology*(2021). 100(607-614).
197. **Vichinsky EP, Styles LA, Colangelo LH, Wright EC, Castro O ve ark** "Acute chest syndrome in sickle cell disease: clinical presentation and course." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*(1997). 89(5): 1787-1792.
198. **Voskou S, Aslan M, Fanis P, Phylactides M and Kleanthous M** "Oxidative stress in β -thalassaemia and sickle cell disease." *Redox biology*(2015). 6(226-239).
199. **Wahidiyat PA, Iskandar SD and Sekarsari D** "Evaluation of iron overload between age groups using magnetic resonance imaging and its correlation with iron profile in transfusion-dependent thalassemia." *Acta Med Indones*(2018). 50(3): 230-236.
200. **Walter PB, Fung EB, Killilea DW, Jiang Q, Hudes M ve ark** "Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with β -thalassaemia or sickle cell disease." *British journal of haematology*(2006). 135(2): 254-263.
201. **Walter PB, Harmatz P and Vichinsky E** "Iron metabolism and iron chelation in sickle cell disease." *Acta Haematologica*(2009). 122(2-3): 174-183.
202. **Wang C-Y and Babitt JL** "Liver iron sensing and body iron homeostasis." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*(2019). 133(1): 18-29.
203. **WHO C** "Assessing the Iron Status of Populations. Geneva." *World Health Organization*(2007).
204. **Wightman B, Ha I and Ruvkun G** "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*." *Cell*(1993). 75(5): 855-862.
205. **Williams TN and Thein SL** "Sickle cell anemia and its phenotypes." *Annual review of genomics and human genetics*(2018). 19(113-147).
206. **Wu CJ, Krishnamurti L, Kutok JL, Biernacki M, Rogers S ve ark** "Evidence for ineffective erythropoiesis in severe sickle cell disease." *Blood*(2005). 106(10): 3639-3645.
207. **Yadin D, Knaus P and Mueller TD** "Structural insights into BMP receptors: Specificity, activation and inhibition." *Cytokine & growth factor reviews*(2016). 27(13-34).
208. **Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T and Kato T** "Micromanaging iron homeostasis: hypoxia-inducible micro-RNA-210 suppresses iron homeostasis-related proteins." *Journal of Biological Chemistry*(2012). 287(41): 34110-34119.
209. **Yüksel R** "Homozigot Hbss Erişkin Orak Hücre Anemili Hastalarda Serum PEDF Düzeyleri ile hsCRP Arasındaki ilişkinin incelenmesi." *Uzmanlık Tezi, Hatay: Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD*(2014).
210. **Zemel BS, Kawchak DA, Fung EB, Ohene-Frempong K and Stallings VA** "Effect of zinc supplementation on growth and body composition in children with sickle cell disease." *The American journal of clinical nutrition*(2002). 75(2): 300-307.
211. **Zhang L, Sankaran V and Lodish H** "MicroRNAs in erythroid and megakaryocytic differentiation and megakaryocyte–erythroid progenitor lineage commitment." *Leukemia*(2012). 26(11): 2310-2316.

212. **Zheng W, Li Z-Y, Zhao D-L, Li X-L and Liu R** "RETRACTED ARTICLE: microRNA-26a Directly Targeting MMP14 and MMP16 Inhibits the Cancer Cell Proliferation, Migration and Invasion in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma." *Cancer Management and Research*(2020). 7087-7095.
213. **Zhu X, Li B and Pace BS** "NRF2 mediates γ -globin gene regulation and fetal hemoglobin induction in human erythroid progenitors." *Haematologica*(2017). 102(8): e285.
214. **Zhu Y, Wang D, Wang F, Li T, Dong L ve ark** "A comprehensive analysis of GATA-1-regulated miRNAs reveals miR-23a to be a positive modulator of erythropoiesis." *Nucleic acids research*(2013). 41(7): 4129-4143.
215. **Zúñiga P, Martínez C, González LM, Rendón DS, Rojas N ve ark** "Sickle cell disease: A diagnosis to keep in mind." *Revista Chilena de Pediatría*, (2018).89(4):525-529



ÖZGEÇMİŞ

Çiğdem EL

İlk, orta ve lise öğrenimini Adana’da tamamladı. 2006 yılında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi’nden mezun oldu. 2013 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında uzmanlık eğitimini tamamladı. 2013-2016 yılları arasında Hakkari Devlet Hastanesi’nde uzman hekim olarak çalıştı. 2017 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi, Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında öğretim üyesi olarak göreve başladı. 2018 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyokimya ve Genetik Anabilim Dalı’nda doktora öğrenimine başladı. 2020 yılında Doçentlik ünvanını aldı. Aynı yıl Anadolu Üniversitesi Sağlık Kurumları İşletmeciliği Bölümünden mezun oldu. 2021 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi Dekanlığı tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı olarak atandı. 2023 yılında Atatürk Üniversitesi Çocuk Gelişimi Bölümünden mezun oldu. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanlığı ve öğretim üyeliği görevlerine halen devam etmektedir.