

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



**ORAK HÜCRE ANEMİLİ OLGULARDA miRNA EKSPRESYON
DÜZEYLERİ İLE KLİNİK PARAMETRELER ARASINDAKİ
KORELASYONUN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Gizem İNAL

Danışman

Prof. Dr. Abdullah ARPACI

HATAY-2022

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

**ORAK HÜCRE ANEMİLİ OLGULARDA miRNA EKSPRESYON DÜZEYLERİ
İLE KLİNİK PARAMETRELER ARASINDAKİ KORELASYONUN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Gizem İNAL

Danışman

Prof. Dr. Abdullah ARPACI

Bu tez, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından
19.D.013 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY-2022

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

**ORAK HÜCRE ANEMİLİ OLGULARDA miRNA EKSPRESYON
DÜZEYLERİ İLE KLİNİK PARAMETRELER ARASINDAKİ
KORELASYONUN ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Gizem İNAL

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 25/03/2022 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:

Jüri başkanı: Prof. Dr. Abdullah Arpacı

Üye : Prof. Dr. Özlem Gülbahar

Üye : Prof. Dr. Akın Yakan

Üye : Doç. Dr. Selçuk Matyar

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Emre Dirican

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

25/03/2022

Prof. Dr. İbrahim Halil Çerçi
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca, bilimsel ve manevi desteği ile bana yol göstererek yetişmemde önemli katkı sağlayan değerli tez danışmanım Prof. Dr. Abdullah ARPACI'ya şükranlarımı sunarım.

Deneyisel çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen ve her daim birikimlerini sınırsızca sunan Doç. Dr. Meral URHAN KÜÇÜK'e teşekkürü borç bilirim.

Bilgilerini benimle paylaşıp tezimin şekillenmesini sabırla destekleyen Dr. Öğr. Üyesi Emre DİRİCAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamın önemli bölümüne katkı sağlayan, Hatay Eğitim ve Araştırma Hastanesi Talasemi Merkezi sorumlusu Dr. Gönül OKTAY'a ve değerli sağlık personellerine şükranlarımı sunarım.

Eğitimime başladığım ilk günden itibaren iyi ve kötü günlerimde bana destek olan canım arkadaşım Hasret ECEVİT'e teşekkür ederim.

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne tezimin deneyisel çalışmaları için gerekli olan malzemeleri temin edebilmem için sağlamış olduğu bütçeden dolayı teşekkür ederim.

Beni eğitim hayatım boyunca destekleyen canım babam Dt. M. Faruk KARABEYOĞLU ve canım kardeşim M. Rıfat KARABEYOĞLU'na teşekkür ederim.

Tüm zahmetli süreçte bana destek olan ve vizyonumu genişleten, öngörülerini ışığında yol bulduğum sevgili eşim Dr. Levent İNAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Özveri ve özenle beni büyütüp eğitime büyük önem veren ve bugünlere gelmemde en fazla emeğe sahip rahmetli annem Ayşegül KARABEYOĞLU'na en kalbi duygularla şükranlarımı sunarım.

Yoğun doktora eğitimim boyunca beni sabırla bekleyen, yaşama sevincim, gülen yüzüm, kraliçem, canım kızım Laden İNAL'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ÖZET	X
ABSTRACT.....	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Orak Hücre Anemisi	4
2.2 Hemogloblin.....	5
2.3 Epidemiyoloji	8
2.3.1 Tarihçe.....	8
2.3.2 Dağılım.....	8
2.3.3 Prevalans ve İnsidans	9
2.4 Patofizyoloji	9
2.4.1 HbS Polimerizasyonu.....	10
2.4.2 HbF Etkisi	11
2.4.3 Alfa Talasemi Birlikteliği	11
2.4.4 HbS'in Oksijen Afinitesinde Değişim	12
2.4.5 Membran Biyolojisinin Bozulması	13
2.4.6 Hemoliz	16
2.4.7 İmmun Sistem Aktivasyonu ve İnflamasyon	17
2.4.8 Vazooklüzyon	18
2.5 Mikro RNA (miRNA)	19
2.6 miRNA Biyogenezi	20
2.7 miRNA ve Hematopoez	21
2.8 Klinik.....	24
2.9 Tanı	26
2.10 Tedavi.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30

3.1. Çalışma Grubu	30
3.2 Etik Kurul Onayı	30
3.3 Örneklerin Toplanması.....	30
3.4 Kullanılan Cihaz ve Kimyasal Malzemeler	30
3.5 Örneklerin Çalışılması	31
3.5.1 Tam Kan Sayımı Ölçümü.....	31
3.5.2 Hemogloblin Varyant Analizi	32
3.5.3 miRNA Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi.....	32
3.6 Klinik ve Hematolojik Verilerin Toplanması.....	36
3.7 İstatistiksel Analiz	37
4. BULGULAR.....	38
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ	52
7. KAYNAKLAR	54
EKLER.....	62
Ek 1. Gönüllülerin Bilgilendirilmiş Olur / (Rıza) Formu Kontrol Grubu	62
Ek 2. Gönüllülerin Bilgilendirilmiş Olur / (Rıza) Formu Hasta Grubu	65
ÖZGEÇMİŞ	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hemoglobinin yapısı	6
Şekil 2.2. Bohr etkisi adı verilen P_{CO_2} ve pH'ın, oksijen-hemoglobin ayrışma eğrisi üzerindeki etkileri.....	7
Şekil 2.3. Deoksijene HbS polimerizasyonu ve oraklaşmış eritrosit.....	16
Şekil 2.4. OHA'nin patofizyolojisi.....	18
Şekil 2.5. Kodlayan ve kodlamayan RNA sınıflandırması.....	20
Şekil 2.6. miRNA biyogenezi.....	21
Şekil 2.7. Düzenleyici miRNA'ların etkisi ile fetal hemoglobinin yetişkin hemoglobine geçişinin moleküler regülasyonu.....	24

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.....	31
Çizelge 3. 2. Çalışmada kullanılan cihazlar.	31
Çizelge 3. 3. Çalışmada kullanılan ticari kitler.	31
Çizelge 3. 4. cDNA eldesinde kullanılan kimyasal ve hacimleri.	34
Çizelge 3. 5. RT-PCR Reaksiyon hacimleri	35
Çizelge 3. 6. RT-PCR reaksiyon döngüleri.	35
Çizelge 3. 7. Fenotip skorlamasında kullanılan parametreler.....	36
Çizelge 4. 1. Hasta ve kontrol grupların demografik özellikleri.....	38
Çizelge 4. 2. Hasta ve kontrol gruplarında tam kan sayımı parametre düzeylerinin karşılaştırılması.....	39
Çizelge 4. 3. Orak hücre anemisi hastalarında fenotip sınıflarına göre WBC, RBC, Hb, Hct ve eritrosit indisleri.....	39
Çizelge 4. 4. Orak hücre anemisi hastalarında fenotip sınıflarına göre Hct ikili kıyaslamaları.....	40
Çizelge 4. 5. Fenotipe göre nötrofil, lenfosit, monosit ve PLT sayılarının karşılaştırılması.....	40
Çizelge 4. 6. VOK sayısı ile tam kan sayımı parametrelerinin karşılaştırılması.....	41
Çizelge 4. 7. HU kullanımının HbF düzeyine etkisi.....	41
Çizelge 4. 8. HU kullanımının fenotip sınıflarına etkisi.....	42
Çizelge 4. 9. Fenotiplere göre HbF düzeylerinin kıyaslanması.....	42
Çizelge 4. 10. Fenotip sınıfları arasında ikili kıyas.....	42
Çizelge 4.11. Hasta grupta HU kullanımı ve miRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	43
Çizelge 4. 12. HbF düzeyleri ve miRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	43
Çizelge 4. 13. HU kullanmayanlarda HbF düzeyleri ve miRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.....	44
Çizelge 4. 14. Fenotiplere göre miRNA ekspresyon düzeylerinin kıyaslanması.....	44
Çizelge 4. 15. Hasta ve kontrol gruplarında miRNA ekspresyon düzeylerinin kıyaslanması.....	44

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

aa	: Amino Asit
ADMA	: Asimetrik Dimetil Arginin
Ago	: Argonuate
ALK4	: Aktivin Tip I Reseptörü
BCL11A	: B Hücreli Lenfoma 11 A
BMI	: Body Mass Index
β	: Beta
cDNA	: Komplementer DNA
circRNA	: Sirküler RNA
CRISPR-CAS9	: Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats-CAS9
DGCR8	: DiGeorge Syndrome Critical Region 8
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
FDA	: U.S Food and Drug Administration
FOG1	: Friend of GATA 1
GATA1/2	: GATA bağlayıcı protein 1/2
Hb F	: Fetal Hemoglobin
Hb AS	: Orak hücre Anemi Taşıyıcısı
Hb SS	: Orak Hücre Anemi Hastası
HPFH	: Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
HSs	: DNaz I-Aşırı Duyarlı Bölgeler
KL	: Kit Reseptörü Ligandı
KLF1	: Krüppel benzeri faktör 1
Linc RNA	: Uzun İntergenik Kodlanmayan RNA
LCR	: Lokus Kontrol Bölgesi
μL	: Mikrolitre
MCH	: Ortalama Eritrosit Hemoglobini
MCHC	: Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu
MCV	: Ortalama Eritrosit Hacmi
MYB	: Myeloblastosis
miRNA	: Mikro RNA

mRNA	: Mesajcı RNA
ncRNA	: Kodlanmayan RNA
NETs	: Nötrofil Ekstrasellüler Traps
NFE2	: Nuclear Factor, Erythroid 2
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit sentaz
OHA	: Orak Hücre Anemisi
OHH	: Orak Hücre Hastalığı
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PGF	: Placenta Growth Factor
PLT	: Platelet
pre-miRNA	: Prekürsör Mikro RNA
pri-miRNA	: Öncül Mikro RNA
RISC	: RNA İndüklü Sessizleştirici Kompleks
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rRNA	: Ribozomal RNA
RT-PCR	: Real-Time Polymerase Chain Reaction
SH	: Standart Hata
siRNA	: Kısa İnterfering RNA
snoRNA	: Kısa Nükleolar RNA
snoRNP	: Kısa Nükleolar Ribonükleoprotein
SOX6	: SRY-Box Transcription Factor 6
Sp	: Specificity protein
SPSS	: Sosyal Bilimler İçin İstatistik Programı
TLR2	: Toll-like reseptör 2
TLR4	: Toll-like reseptör 4
TRBP	: Transactivation Response Element RNA-Binding Protein
tRNA	: Taşıyıcı RNA
UTR	: Proteine Çevrilemeyen Bölge
VEGFR	: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VOK	: Vazooklüziv Kriz
XPO5	: Exportin 5

ÖZET

Orak Hücre Anemili Olgularda miRNA Ekspresyon Düzeyleri ile Klinik Parametreler Arasındaki Korelasyonun Araştırılması

Bu çalışmada, orak hücre anemili olgularda mikroRNA ve diğer kan parametrelerinin düzeyleri ölçülerek hastalığın klinik şiddetine olan etkisi araştırılmıştır.

Çalışmaya 43 orak hücre anemi hastası ile yaş ve cinsiyet olarak benzer 39 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Tüm bireylerden iki tüp kan alınmıştır. Bir tüpten tam kan sayımı ve HPLC yöntemi ile hemoglobin varyant analizi yapılmıştır. Diğer tüpten ise RNA izolasyonu yapıp cDNA elde edilmiştir. Daha sonra ise RT-PCR yöntemi kullanılarak, olguların miRNA ekspresyon seviyesi ölçülmüştür. Klinik skorlama kriterlerine göre, her hastanın klinik skoru belirlenmiştir. Hastalar skorlarına göre asemptomatik, ılımlı ve ağır olmak üzere üç ana fenotip grubundan birine dahil edilmiştir.

Çalışmada, hasta ve kontrol gruplarının tam kan sayımı parametreleri karşılaştırılmıştır. WBC, RBC, Hb, Hct, HbF düzeyleri hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı bulundu ($p<0,001$). MCV ve MCHC düzeyleri iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,012$, $p=0,028$). Bunun yanı sıra, MCH düzeyleri iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,059$). Ayrıca, HbF seviyeleri ve fenotip sınıflarına göre karşılaştırıldı ve asemptomatik, ılımlı ve ağır grup arasında HbF seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,014$). Hasta ve kontrol grubunun miR-326, miR-144 ve miR-150 ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında hasta grupta anlamlı bir şekilde düşük eksprese edilmiştir ($p=0,004$, $p<0,001$, $p=0,004$).

Bu sonuçlar bize; miRNA'ların orak hücre anemisi patofizyolojisinde, karmaşık düzenleyici yollara katkıda bulunabileceğini ve klinik heterojenitenin tanımlanmasına yardımcı olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Orak hücre anemisi, mikroRNA, Prognoz, Biyobelirteç

ABSTRACT

Investigation of The Correlation Between miRNA Expression Levels and Clinical Parameters in Sickle Cell Anemia Patients

In this study, microRNAs and other blood parameters levels of patients with sickle cell anemia were measured and their effect on the clinical severity of the disease was investigated.

The study included 43 sickle cell anemia patients and 39 age- and gender-matched healthy controls. Two tubes of blood were taken from all individuals. Complete blood count with a complete blood count device from a tube and hemoglobin variant analysis with HPLC method were performed. RNA was isolated from the other tube and cDNA was obtained. Then, the miRNA expression level of the cases was measured using the RT-PCR method. According to clinical scoring criteria, the clinical score of each patient was determined. Patients were included in one of three main phenotype groups according to their scores: asymptomatic, moderate and severe.

In the study, complete blood count parameters of the patient and control groups were compared. WBC, RBC, Hb, Hct, HbF levels were found to be statistically significant between the two groups ($p < 0.001$). MCV and MCHC levels were statistically significant between the two groups ($p = 0.012$, $p = 0.028$). In addition, MCH levels were not statistically significant between the two groups ($p = 0.059$). In addition, HbF levels and phenotype classes were compared, and there was a statistically significant difference in HbF levels between the asymptomatic, moderate and severe groups ($p = 0.014$). When the expression levels of miR-326, miR-144 and miR-150 of the patient and control groups were compared, it was significantly lower in the patient group ($p = 0.004$, $p < 0.001$, $p = 0.004$).

These results show us; miRNAs may contribute to complex regulatory pathways in the pathophysiology of sickle cell anemia and help define clinical heterogeneity.

Key words: Sickle cell anemia, microRNA, Prognosis, Biomarker

1. GİRİŞ

Orak Hücre Hastalığı (OHH) Dünya’da her yıl yaklaşık 176.000 kişinin hayatını kaybetmesine neden olan otozomal resesif geçişli genetik bir hastalıktır (Collaborators 2015). OHH terimi; hemoglobinin beta globin proteinini kodlayan gende, bir grup hastalığa (OHA, HbSC ve HbS β -talasemi vb.) yol açan mutasyonları kapsar. Bu mutasyonun homozigot (orak hücre anemisi- HbSS) veya başka gendeki mutasyonla birlikte kalıtılması OHH’nın klinik formlarını oluşturur.

Hastalık patogenezi oluşturan mutant HbS; 11. kromozomda bulunan, β globin gen lokusunun amino ucunda 6. konumunda yer alan adenin bazı yerine, timin bazının gelmesi ile oluşur. Bunun sonucunda β globin zincirinin 6. pozisyonuna, asidik amino asit (aa) olan glutamik asit yerine nötr valin aa.’i gelir ve mutant globin zincirinin elektriksel yükü değişerek diğer hemoglobin moleküllerine yapışmaya eğilimi artar. Deoksijenize durumda, HbS polimerize olarak eritrositleri rijit hale getirir. Küçük damarlarda vazooklüzyon, organların kronik iskemisi ve bağışıklık sistemindeki değişiklikler hastalığın fizyopatolojisini oluşturarak kliniğini belirler (Kato ve ark. 2018).

OHA, ilk defa Herrick tarafından 1910 yılında tanımlanmıştır. Hastalığın tanımlanmasından yaklaşık 110 yıl geçmesine rağmen, tek nokta mutasyonunun neden bu kadar değişik klinik varyasyon oluşturduğu henüz tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Hastaların klinik ve hematolojik özelliklerindeki büyük değişkenlik, patofizyolojik mekanizmalarının anlaşılmasını da zorlaştırır. Orak hücre anemisinin olguya özgü klinik şiddeti; genetik ve genetik olmayan modifiye ediciler ile açıklanmaktadır. Klinik durum; sosyoekonomik düzey, coğrafi faktörler, soğuk hava, rüzgar hızı, nem oranları, hava kalitesi (atmosferik nitrik oksit, ozon, sülfür) ve enfeksiyonlar gibi genetik olmayan faktörler tarafından etkilenir. Hastalık şiddetini belirleyen genetik modifiye ediciler ise; alfa talasemi birlikteliği, haplotip tipi, gen ifadesinin düzenlenmesi (miRNA vb.) ve polimorfizmler olarak tanımlanır. (Piel ve ark. 2017)

Tüm insan genomunun dizilenmesi ile elde edilen son bulgular, genom dizilerinin çok azının (%2’den az) proteine dönüştüğünü ortaya çıkardı. Bununla birlikte, genom dizilerinin geri kalanı DNA’dan kopyalanır, ancak ncRNA’lar (non-coding RNA- kodlamayan RNA) olarak adlandırılan bu moleküller proteinlere çevrilmez (Doss ve ark. 2015). Başlangıçta, ncRNA’ların protein sentezinde yalnızca ribozomun bütünleyici

bileşenleri (ribozomal RNA) veya reaksiyon substratları (transfer RNA) olarak işlevsel rol oynadığı düşünüldü, ancak yıllar içinde birden fazla ek işlevleri tanımlandı (Hüttenhofer ve ark. 2005). Transkripsiyon, translasyon, RNA işleme, mRNA turnover, DNA replikasyonu, genom stabilitesinin korunması, kromatin yeniden şekillenmesi dahil olmak üzere çeşitli temel süreçlerin düzenlenmesinde yer aldıkları ve hatta proteinlerin stabilitesine ve konumuna katkıda buldukları anlaşıldı (Gebetsberger ve Polacek 2013). Bu anlamda mikro RNA (miRNA)'lar da çok araştırılan moleküllerin başında yer almaktadır.

miRNA'lar, mRNA'ya bağlanarak, gen ekspresyonunu inhibe eden 18-25 bp kısa kodlamayan RNA'lardır. miRNA ailesi, birçok protein kodlayan genin güçlü moleküler düzenleyicileridir (Ardekani ve Naeini 2010). Bir miRNA birden fazla hedef mRNA'yı etkiler ve tek bir mRNA, çoklu miRNA'lar için hedef bölgeler içerebilir. miRNA biyogenezi, Drosha ve Dicer enzimleri tarafından olgun miRNA'ya işlenen pri-miRNA transkriptinin transkripsiyonu ile başlayan iyi tanımlanmış bir süreçtir. Olgun miRNA'lar RISC (RNA İndüklü Sessizleştirici Kompleks) kompleksine dahil edilir ve belirli mRNA'ların 3' UTR bölgesini hedef alır, bu da tamamlayıcılığın derecesine bağlı olarak mRNA bozulmasına veya translasyon bloğuna yol açar (O'Brien ve ark. 2018). Bu biyogenez, post-transkripsiyonel gen düzenlemesinde önemli bir role sahip olan ve hücrel fizyolojiyi etkileyen mRNA-miRNA komplekslerinin oluşumu ile sonuçlanır (Dragomir ve ark. 2018).

Günümüze kadar insan genomunda 2500'den fazla miRNA tanımlanmıştır. Gelişim, hücre döngüsü ve apoptoz dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynadıkları belirtilmiştir. miRNA'ların hastalıkların gelişimindeki önemi, değişen miRNA ekspresyonunun çeşitli bozukluklara eşlik ettiğinin gözlemlenmesi ile anlaşılmıştır. Buna istinaden kanser vb. gibi hastalıkların tanı ve prognozunda miRNA ekspresyon düzeyleri kullanılmaya başlamıştır. Birçok miRNA'nın, hematopoez ve eritropoez sırasında eritroid hücrelerinin farklılaşması ve olgunlaşması için önemli olan genlerin düzenlenmesini sağladığı bildirilmiştir. Orak hücre anemisinde görülen klinik değişkenlik hakkında bilgi edinmek için yapılan miRNA çalışmalarının çoğu, γ globin gen düzenlemesine odaklanmıştır. Miller ve ark., LIN28'in insan primer eritroid hücrelerinde HbF indüksiyonuna aracılık etmek için miRNA let-7'yi susturduğunu bulmuştur. Benzer şekilde miR-15a ve miR-16'nın, MYB (Myeloblastosis)'i inhibe etmek suretiyle γ globin gen ekspresyonunda artış meydana getirdiği belirlenmiştir. Bu çalışmalar, miRNA'ların

OHA'daki klinik şiddeti öngörme potansiyelini göstermektedir (Sankaran ve ark. 2011, Walker ve ark. 2011, Lee ve ark. 2013).

Ülkemizde özellikle Akdeniz Bölgesi'nde sık görülen orak hücre hastalığının hücre bazındaki patofizyolojisini anlamak, yeni tedavi olanaklarını geliştirmek için önemlidir. Bu çalışmada kan örneklerindeki miRNA gen ekspresyon düzeyleri belirlenerek, bu düzeylerin hasta fenotiplerine etkisi araştırmak istenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Orak Hücre Anemisi

Orak hücre hastalığı, dünya çapında en yaygın genetik bozukluktur. OHA, beta globin geninde oluşan nokta mutasyonu sonucu meydana gelir. β -globin zincirinin 6. pozisyonuna glutamik asit yerine valin gelir ve HbS oluşur (Kato ve ark. 2018).

Hemoglobin eritrosit içinde bulunan majör proteindir. Eritrositler, periferik kandaki hücre popülasyonunun %90'ından fazlasını oluşturur ve insan vücudundaki etkin gaz değişiminden sorumludur. Olgun eritrositler; organellerin kademeli olarak kaybını, nükleik asit içeriğinde bir düşüşü ve eritrosit özelliklerinin kademeli olarak edinilmesini içeren oldukça iyi düzenlenmiş bir farklılaşma sürecinin nihai ürünleridir. Eritroid farklılaşmasının çarpıcı bir özelliği ise nükleusun, olgun eritrositlerin öncüsü olan retikülositlere farklılaştıkça hücrelerden ekstrüde edilmesidir. Hemoglobin; eritrosit hücre proteinlerinin çoğunu oluşturduğu için, bu hücrelerin genellikle sadece inert ve pasif hemoglobin kapları olarak hizmet ettiği düşünülmekteydi. Daha sonra ise, eritrositlerin hücresel sinyalleri bağlayabileceği, fizyolojik ve patolojik stres sırasında fonksiyonel yanıtları tetikleyebileceği gösterilmiş ve daha dinamik doğaları olduğu düşünülmüştür (Chen ve ark. 2008). Bu durum, eritrositlerin bilinenden daha karmaşık bir hücre içi ortama sahip olduğunu göstermektedir.

OHA'da; deoksijene hemoglobin molekülünün dış yüzünde bulunan hidrofobik valin rezidüleri yapışkan noktalar oluşturur, böylece hemoglobin molekülleri kümelenir ve fibröz çökeltiler oluşur. HbS polimerizasyonu adı verilen bu fenomen, eritrositlerin, karakteristik orak şekline dönüşmesine yol açar (Kato ve ark. 2018).

OHA'daki RBC anormallikleri; iskemi-reperfüzyon hasarına yol açan vazooklüzyon ve hemolitik anemi ile klinik olarak kendini gösterir. Vazooklüziv olaylar ve intravasküler hemoliz, progresif vaskülopati ile sonuçlanan inflamasyon ve redoks dengesinin bozulmasına yol açar. Yapılan araştırmalar sonucunda OHA patofizyolojisinin; HbS polimerizasyonu, artmış vazooklüzyon, hemoliz aracılı endotelial disfonksiyon ve steril inflamasyonun aktivasyonu arasındaki etkileşim silsilesi olduğu düşünülmektedir (Sundd ve ark. 2019). Orak hücre hastalığının klinik ve hematolojik özelliklerindeki büyük değişkenlik, hastalığın patofizyolojik mekanizmalarının anlaşılmasını zorlaştırır. OHA'lı bireyin fenotipinin yaşamın erken dönemlerinde belirlenmesi; prognoz tahmin edilmesini

sağlayabilir. Bireysel tedavi planlanması ve gereksiz müdahalelerin önüne geçebilmek adına, hastalık seyrinin belirlenmesi önem kazanmaktadır (Byon ve Papayannopoulou 2012).

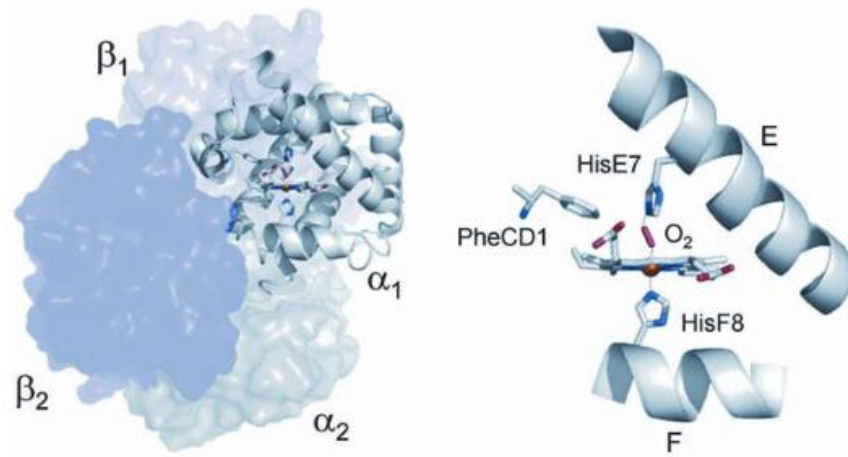
2.2 Hemoglobin

Hemoglobin; oksijene yanıt olarak konformasyonel değişikliklere uğrayan, çevresel etmenler ve allosterik efektörlerden etkilenen karmaşık bir moleküldür. Hemoglobin, küresel yapıda, 6.4 nm çapında ve yaklaşık 64.500 dalton (Da) moleküler ağırlığa sahip bir hemoproteindir. Tetramerik yapıdaki hemoglobin; her biri bir adet hem molekülü içeren, dört globin proteininden oluşur. Hem moleküllerinin her biri de bir molekül oksijen bağlayarak hemoglobin molekülünün ana görevini gerçekleştirmesine aracılık eder. Birçok gen, farklı globin proteinini kodlar. Çeşitli globin protein kombinasyonları, hayatın farklı evrelerinde sentezlenen hemoglobin türlerini (Gower, HbF, HbA₂ vb.) oluşturur (Rifai 2018). Yetişkin hayatta sentezlenen hemoglobin tetrameri, sırasıyla 16. ve 11. kromozomlarda bulunan genler tarafından kodlanan α ve β globin zincirleri olmak üzere iki farklı zincirden oluşur. α gen kümesi; $\zeta 2$, $\alpha 1$, $\alpha 2$ genlerini ve birkaç psödo gen içerir. β gen kümesi ise γ , β , δ , ϵ genleri ve bir psödo gen içerir (Gazouli ve ark. 2009). Fetal hayattan yetişkin hayata geçiş sırasında iki tip globin gen değişimi meydana gelir. Birincisi, γ geninin ϵ ile yer değiştirmesi ve dolayısıyla fetal karaciğerde HbF ($\alpha_2\gamma_2$) üretimidir. Diğeri ise γ yerine β geninin değiştirilmesi için meydana gelir, bu da HbF üretiminin azalmasına neden olarak yetişkin hemoglobinine (HbA- $\alpha_2\beta_2$) geçişi sağlar (Roversi ve ark. 2013).

Hemoglobin sentezi, transkripsiyon sonrası modifikasyonlarla ayarlanır. Transkripsiyon faktörleri, DNA'nın belli bölgelerine bağlanır ve globin genlerinin ekspresyonuna etki ederler (Azzouzi ve ark. 2011). γ globinden β globine geçişteki başlıca transkripsiyon faktörleri; Krüppel benzeri faktör 1 (KLF1), B hücreli lenfoma 11A (BCL11A) ve MYB'dir. Bu faktörler doğrudan ya da dolaylı olarak γ gen susturulmasının düzenlenmesinden sorumludur. Eritropoez sırasında bu faktörlerin ekspresyonundaki değişiklikler, HbF'in sentezinde etkili olabilir (Esteghamat ve ark. 2013, Tallack ve Perkins 2013). Bu yaklaşım, β globin bozukluğu olan hastalarda HbF'i indüklemek için kullanılabilir (Ginder 2015).

Dört globin zinciri, bir merkezi boşluğu çevreleyen kalın duvarlı küresel bir kabuk oluşturur. Bu boşlukta, globin zincirlerinin histidin kalıntıları ile demir elementinin

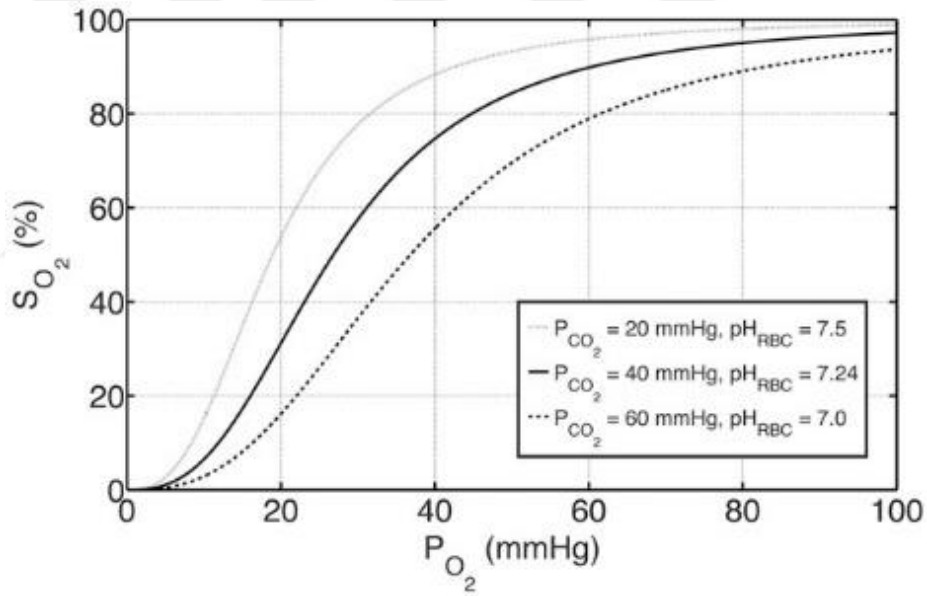
etkileşimiyle bağlanan hem halkası asılıdır. Hem demiri (2^+) normalde okside durumdadır. Yetişkin dönem hemoglobinindeki (HbA) iki çift globin zinciri α ve β olarak adlandırılır. α zinciri 141 amino asit kalıntısı ve β zinciri 146 amino asit kalıntısı içerir. HbF yapısındaki α zinciri, HbA'da bulunan ile aynıdır; ancak diğer zincir β zinciri ile önemli yapısal homolojiye sahip γ zinciridir. HbA₂, α ve δ zincirlerinden oluşur. Normal yetişkinlerde, HbA toplam hemoglobinin yaklaşık %85 ila %95'ini oluşturur, HbF %1'den az ve HbA₂ %3,5'ten azdır. Globin zincirlerinin aminoasit dizisindeki değişiklikler (kalitatif değişiklik) OHA'ya yol açarken, globin zinciri üretimindeki düşüşler (kantitatif değişiklik) talasemi gibi hemoglobinopatilere neden olur (Rifai 2018).



Şekil 2.1. Hemoglobinin yapısı (Storz ve Moriyama 2008)

Hemoglobin; O_2 'yi alveolün kısmi oksijen basıncında (pO_2) verimli bir şekilde bağlamalı, onu dolaşımda tutmalı ve doku kılcak yataklarının düşük pO_2 'sindeki dokulara bırakmalıdır. Oksijen alımı ve dağıtımı, hemoglobin molekülü içindeki hemoglobin alt birimlerinin tetramerik düzenlemesinde bulunan ve kooperatiflik olarak adlandırılan bir özelliğe bağlıdır. Düşük oksijen basıncında, hemoglobin tetrameri oksijensizdir. Bununla birlikte, yüksek oksijen basıncında tetramer tarafından bir miktar oksijen bağlanır bağlanmaz, daha yüksek bir oksijen afinitesi geliştirerek oksijenle birleşme yeteneklerini büyük ölçüde artırır. Bu sebeple dar bir oksijen basınç aralığında önemli miktarlarda oksijen yükleme ve boşaltma meydana gelir. Oksijen afinitesi birkaç faktör tarafından modüle edilir. Bohr etkisi, hemoglobinin dokulara düşük pH'da daha fazla oksijen verme yeteneğidir. Protonlar; deoksihemoglobine, oksihemoglobinden daha kolay bağlanır. Bu

nedenle, hemoglobin, düşük pH'da daha düşük bir oksijen afinitesine sahiptir. İnsanlarda oksijen afinitesini değiştiren ana molekül, hemoglobine bağlandığında oksijen afinitesini düşüren 2,3-bifosfogliserattır (2,3-BPG). HbA, 2,3-BPG için oldukça yüksek bir afiniteye sahiptir. HbF, 2,3-BPG'ye afinitesi az olduğundan, in vivo daha yüksek bir oksijen afinitesine sahip olma eğilimindedir. Hemoglobin ayrıca nitrik oksidi reversibl olarak bağlar; bu etkileşim vasküler tonusu etkiler, ancak bunun klinik önemi tam olarak anlaşılamamıştır. Normal oksijen taşınması bu nedenle; proteinlerin tetramerik yapısına, hidrofilik ve hidrofobik aminoasitlerin uygun düzenlemesine, ortamın pH'ına ve 2,3-BPG ile etkileşime bağlıdır (Ahmed ve ark. 2020).



Şekil 2.2. Bohr etkisi adı verilen P_{CO_2} ve pH'nın, oksijen-hemoglobin ayrışma eğrisi üzerindeki etkileri. Ortadaki eğri, $P_{CO_2} = 40$ mmHg, $pH_{RBC} = 7.24$ ve $P_{50} = 26.8$ mmHg ile standart fizyolojik koşulları temsil ederken, yukarıdaki ve aşağıdaki eğriler sırasıyla bazik ve asidik koşulların örneklerini temsil eder. (Olgac ve Kurtcuoglu 2016)

2.3 Epidemiyoloji

2.3.1 Tarihçe

OHH yüzlerce yıldır Afrika halkı tarafından nwiiwii, nuidudui, ahotuto ve chwechweechwe gibi kabileye özgü farklı isimleri ile bilinmekteydi. OHH olduğu tahmin edilen ilk olguya ait makale Lebby tarafından, siyahi bir kölenin otopsi bulgularında dalak yokluğu ile 1846 yılında yayınlanmıştır (R. 1846). İlk defa Herrick tarafından periferik kan yaymasında armut şekilli ve uzamış hücreler olarak 1910 yılında tanımlanmıştır (Herrick 2001). 1917’de Emmel, petrolatum damlattığı kan örneklerinde, bikonkav şekilli RBC’lerin oraklaştığını gözlemledi ve diagnostik testlerin temelini attı (Ve. 1917). 1922’de ise Mason, 4. vakayı gözlemledi ve hastalığı orak hücre anemisi olarak adlandırdı (Vr. 1922). 1927’de Hanh ve Gillespie oraklaşmış RBC’ler ve düşük O₂ koşulları arasındaki ilişkiyi tanımladı (Hahn ve Gillespie 1927). 1948’de Watson HbF düzeyleri ve hastalık semptomları arasında bir ilişki olabileceğini önerdi (Watson 1948). 1949 yılında Neel, heterozigot bireylerin taşıyıcı, homozigot bireylerin ise hasta olduğunu yayınladı (Neel 1949). Linus Pauling ve Itano ise HbS’i tanımlayarak, orak hücre anemisini ilk moleküler hastalık olarak adlandırmışlardır (Pauling ve Itano 1949).

2.3.2 Dağılım

Orak hücre hastalığı; Sahraaltı Afrika, Akdeniz bölgesi (Türkiye, Yunanistan ve İtalya başta olmak üzere), Arap yarımadası, Hindistan, Amerika Birleşik Devletleri ve Brezilya gibi ülkeleri kapsayan çok geniş bir coğrafi alanda görülür (Piel ve ark. 2010). Hastalığın dağılımı sıtma endemisi ve göç hareketleri ile paralellik gösterir (Piel ve ark. 2014). *HbAS* (taşıyıcı) genotipine sahip bireylerde, *Plasmodium Falciparum* parazitemisinin daha seyrek görüldüğü ve hasta bireylerin parazit ile enfekte olma frekansının çok daha düşük olduğu bildirilmiştir (Allison 1954). Bu veriler malarya hipotezinin ortaya çıkmasına ve *HbS* alel frekansı ile sıtma hastalığı arasında bir ilişki olduğunun düşünülmesine yol açmıştır. Yapılan son çalışmalarda *HbAS*’nin, şiddetli falciparum sıtmasında mortalite ve morbidite yönünde en riskli yaş aralığındaki (2-16 ay) çocuklarda hiperparazitemi ve ağır malaryal anemiye karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (Aidoo ve ark. 2002).

2.3.3 Prevalans ve İnsidans

Türkiye genelindeki *HbAS* alel sıklığı %0,37-0,6 arasında olup Akdeniz Bölgesi'nde (Adana'da %10,0, Antakya'da %10,5 ve Mersin'de %13,6) yüksek prevalansa sahip odak yerleşim yerleri bildirilmiştir (Canatan 2003, Uzun 2006). Amerika Birleşik Devletler'inde yapılan çalışmalar, yaklaşık 100.000 kişinin OHH'dan muzdarip olduğunu göstermektedir (Hassell 2010). Küresel ve ülke bazında güvenilir veriler elde edilemese de, 2010 yılında dünya genelinde 312.302 homozigot bebek ve 5.476.407 heterozigot bebeğin dünyaya geldiği tahmin edilmektedir (Piel ve ark. 2013). Bu doğumların büyük çoğunluğu üç ülkede meydana gelir: Nijerya, Kongo Demokratik Cumhuriyeti ve Hindistan. Geçtiğimiz 40 yıl içinde yüksek gelirli ülkelerde yaşam beklentisi önemli ölçüde artmıştır ve çocukluk ölümleri günümüzde sağlıklı nüfusa yakın sayılardadır ve medyan survi 60 yıldan fazladır (Lê ve ark. 2015, Gardner ve ark. 2016).

Yüksek gelirli ülkelerde OHH'lı çocukların survisi sağlıklı çocuklara yaklaşmışken Sahraaltı Afrika'da beş yaşın altındaki OHH'lı çocukların %90'ı hayatını kaybetmektedir (Telfer ve ark. 2007, Makani ve ark. 2010).

2.4 Patofizyoloji

Deoksijene koşullarda ve asidik pH'da, HbS molekülleri birleşerek rijit polimer formunu oluşturur ve RBC'ler orak şeklini alır. Eritrosit oksijen ile tekrar karşılaştığında bikonkav şekline geri döner fakat polimerizasyon döngüsü tekrarladıkça, membran kalıcı olarak zarar görür. Eritrosit geri dönüşümsüz olarak orak şeklini alır ve yaşam süresi ortalama 12 güne düşer (Quinn 2013).

Eritrositler anormal bir şekilde adhesif özellik kazanır ve damar endoteline yapışarak kan akımını engeller. Bu mikrovasküler tıkanma vazooklüzyon olarak adlandırılır ve iskemiye yol açar (Rees ve ark. 2010).

İntrasellüler HbS veya HbF konsantrasyonunu belirleyen; alfa talasemi ve HPFH (Hereditary persistence of fetal hemoglobin) gibi genetik faktörler, hastalığın ana belirleyicisi olan HbS polimerizasyon oranını etkiler.

OHA, hemoglobin molekülünü etkileyen bir bozukluk olmasına karşın organizmanın bütününde yıkıcı etkilere sahiptir.

2.4.1 HbS Polimerizasyonu

RBC membranında yer alan iskelet proteinlerinin lipit bilayer ile etkileşimini yöneten karmaşık mekanizmalar, RBC'nin dolaşımında maruz kaldığı gerilim altında deforme olmasını ve yeniden bikonkav disk şeklini kazanmasını sağlar (Mohandas ve An 2006).

Orak hemoglobinin polimerizasyonu oldukça dinamik bir olaydır. Düşük oksijen koşullarında deoksijene HbS tetramerleri, β S-globin zincirlerinin hidrofobik motifleri gizlemek için birbirine bağlanır ve tek polimer lifi oluşur. Polimerizasyon, liflerin yoğunlaşması (primer nükleasyon) ile başlar. Lifler büyüdükçe, yeni liflerin nükleasyonu (sekonder nükleasyon) için substrat görevi görürler. Sekonder nükleasyon ile hücreyi klasik orak şekline dönüştüren liflerin büyümesi, dallanması ve hizalanması gerçekleşir (Bunn 1997, Galkin ve Vekilov 2004, Vekilov 2007) (Şekil 2.3).

Dolaşımdaki bir orak eritrositte hemoglobin polimerlerinin oluşum hızı ve kapsamı temel olarak üç bağımsız değişkene bağlıdır: Bunlar; hücrenin deoksijenasyon derecesi, hücre içi HbS konsantrasyonu ve hemoglobin F düzeyidir. Polimerin uyumlu oluşumu için gereken zaman, gecikme süresi (Td-delay time) olarak adlandırılmıştır. Polimerlerin ilk oluşumu için gerekli olan bu süre, orak eritrositlerinin mikrosirkülasyondaki geçiş süresine göre uzundur. Bu yüzden polimerler; arteriyoller ve kılcal damarlardan eritrositlerin geçişi boyunca hücrelerin çoğunda (%80'in üzerinde) oluşamaz (Mozzarelli ve ark. 1987). Venüllerde ise, ortam hipoksik ve akım yavaş olduğu için polimer oluşum ihtimali daha yüksektir.

HbS polimerlerin oluşumu, eritrosit membranında radikal şekil değişikliklerine yol açar. Hücre şeklinin HbS polimerleri tarafından bozulması, SS eritrositlerinin membran yapısını ve işlevini bozmada kritik bir role sahiptir (Hebbel 1991). Bu silsile hücresel dehidrasyona, bozulmuş kan reolojisine, erken hemolize ve vazooklüzyona sebep olur.

2.4.2 HbF Etkisi

Orak hücre hastalığının semptomları, HbF miktarının büyük bir kısmının HbS ile yer değiştirdiği doğumdan birkaç ay sonrasına kadar ortaya çıkmaz. HbF molekülü, iki α iki γ zincirinden oluşur ve seviyeleri gebeliğin midgestasyon döneminde (22.9 ± 2.4 hafta) zirve yapar (Stevens-Simon ve ark. 2000). Plasentada pO_2 daha düşüktür, fetüse oksijen çekebilmek için HbF'in oksijene afinitesi daha yüksektir. Sağlıklı bir bebek 6 aylık olduğunda, HbF toplam hemoglobinin %1'inden daha azını oluşturur, ancak orak hücre hastalığı olan yetişkinlerin çoğunda bu seviyeler daha yüksektir.

Polimerleşme esnasında γ veya β ile α globinlerin oluşturduğu melez tetramerler, HbS'e nazaran birbirlerine ve fiber yapısına daha gevşek bağlanır. Bu olayın nedeni; γ zinciri, β alt birimindeki valin amino asidinin oluşturduğu yapışkan temas noktasını örterek polimerin stabilitesini bozması ve uzamasını engellemesidir (Goldberg ve ark. 1977). Bu mekanizma ile polimerleşme inhibe edilir ve klinik iyileşme görülür. HbF, hastalığın tüm alt fenotiplerini (klinik çeşitlilik) aynı ölçüde iyileştirmez. HbF'in orak hücre hastalığının fenotipi üzerindeki etkisinin kritik belirleyicisi, her bir eritrosit içindeki düzeyidir (Steinberg ve ark. 2014).

2.4.3 Alfa Talasemi Birlikteliği

Alfa zincir yapım azlığı ile karakterize olan α talasemi hastalığı, orak hücre anemisi ile birlikte kalıtılabilir. Bir ya da iki α globin gen delesyonuna sahip HbSS'li bireylerin, bu delesyonu olmayan hasta bireylerden daha az anemik olduğunun bildirilmiştir ve orak hücre hastalığında en önemli genetik modifiye edicilerden birisinin alfa globin gen sayısı olduğu anlaşılmaya başlanmıştır (Embury ve ark. 1982).

Sitozolda az miktarda α zinciri bulunması nedeniyle, βS tetramerleri (dört mutant β -globin alt birimi tarafından oluşturulmuştur) çökelir ve proteolize olur. Bu nedenle hücre içindeki HbS molekül konsantrasyonu azalır. Eritrosit içindeki HbS yoğunluğu oraklaşmanın temel belirleyicisidir. HbS yoğunluğun azalması oraklaşmayı azaltarak eritrositlerin hemolizini azaltır. α -talaseminin ve orak hücreli aneminin birlikte kalıtımında daha az hemoliz gerçekleştiği için, tek başına orak hücreli aneminin kalıtımından daha yüksek hemoglobin seviyeleri görülür. Tersine, akut ağrılı ataklar gibi vazooklüzyon ile ilişkili bazı komplikasyonlar OHA ve α -talasemi birlikteliğinde daha yaygındır. Alfa

talasemi, HbS polimerizasyonunu azaltıp eritrosit ömrünü uzatır bu durum dolaşımında HbS içeren hücre sayısını arttırarak kan viskozitesinin artmasına yol açar. Sonuç olarak hemoliz daha az, vazooklüzyon ile ilgili komplikasyonlar ise daha fazla görülür (Embury ve ark. 1984).

OHA'daki hematolojik ve laboratuvar değişikliklerine nazaran α -talaseminin eşlik ettiği hastalıkta; daha düşük MCV, MCH, retikülosit sayısı, bilirubin ve LDH seviyeleri; daha az irreversibl orak eritrosit (ISC) sayısı bildirilmiştir (Steinberg ve Embury 1986).

Tekrarlayan ve uzamış oraklaşma, membranda ilerleyici olarak hasara yol açar (Smith ve ark. 1982). Oraklaşmış eritrositler, aşırı dehidrasyon sonrasında hücre içi homeostazı sürdürme yeteneklerini kaybederler. ISC, oraklaşmış RBC'nin oksijenasyona rağmen normal yapısına dönememiş formunu tanımlar (Kuypers 2014).

OHA ve α -talaseminin birlikteliği klinik şiddet üzerine etkilidir. İki genetik bozukluğun birlikteliğinde inme, bacak ülserleri, albuminüri sıklığında azalma; ağırlı epizodlar ve osteonekrozisin görülme sıklığında artış bildirilmiştir (Nolan ve ark. 2005, Nolan ve ark. 2006, Darbari ve ark. 2012).

2.4.4 HbS'in Oksijen Afinitesinde Değişim

HbS'in, HbA'ya kıyasla oksijen afinitesi önemli ölçüde azalmıştır. HbS'in O₂ afinitesindeki rölatif azalma, HbS polimerizasyonunu şiddetlendirir ve bunun sonucunda HbS'in oksijen afinitesi daha da azalır (Seakins ve ark. 1973). HbS'in %50'sinin HbA ile yer değiştirmesi, polimerizasyonu yaklaşık 100 kat yavaşlatır (Rotter ve ark. 2011).

Afinitenin azalması büyük ölçüde 2,3-difosfoglisarat (2,3-DPG) düzeylerine bağlıdır. 2,3-DPG hemoglobinin majör allosterik faktörlerinden biridir. 2,3-DPG düşük O₂ basıncında, hemoglobinden O₂ salınımını teşvik ederek dokuların O₂ almasını sağlar. Glikolitik yolda ara ürün olarak sentezlenir. 2,3-DPG, deoksihemoglobinde β alt birimlerin arasındaki pozitif yüklü aminoasitlerin (2. konumdaki histidin, 82. konumdaki lizin, 143. konumdaki histidin) oluşturduğu yarığa bağlanarak hemoglobinin oksijene ilgisini azaltır (Bunn ve Briehl 1970). Bu olay oraklaşmış eritrositlerde hem HbS'in çözünürlüğünü azaltır hem de oluşan fiberlerin stabilizasyonunu sağlar (Poillon ve Kim 1990). Orak hücre anemisi taşıyıcılarında, kalıtsal piruvat kinaz eksikliği bildirilmiştir. Bu olgularda eritrosit 2,3-DPG düzeyleri belirgin artmış olup OHA'lı bireyler kadar şiddetli bir klinik fenotipe sahip oldukları belirtilmiştir (Alli ve ark. 2008).

2.4.5 Membran Biyolojisinin Bozulması

RBC'in oraklaşması; hücre membran fosfolipidlerinin asimetric dağılımında değişiklik, membran iskelet proteinleri ve integral membran proteinleri arasındaki etkileşimlerde zayıflama ve membranın temel integral proteini olan band 3'ün kümelenmesini içeren pek çok anormalliğe neden olur. Membran üzerindeki bu değişimler, hücre hidrasyonunu bozarak polimerizasyonun artmasına neden olur. Özellikle Ca^{++} ve K^+ homeostazının etkilenmesi ile RBC'nin doğal şekli değişir. Bu değişim, orak RBC'nin diğer kan hücreleri ve vasküler endotel ile gereksiz etkileşimlerinde önemli bir rol oynar. Sonuç olarak hemoglobin molekülünün moleküler yapısındaki değişim, RBC'nin ömrünün ksalmasına, apoptozisinin artmasına ve hemolize yol açar (Kuypers 2014).

RBC membranı; Gardos kanalı, K^+/Cl^- kotransporter, band 3, $Na/K^+/2Cl^-$ kotransporter, PIEZO 1 (mekanosensitif iyon kanalı) gibi çok çeşitli iyon kanalları ile donatılmıştır. Her ne kadar bu kanalların birkaçının fizyolojik rolü belirsiz ve dinlenme halindeki hücrede inaktif olarak değerlendirilse de; deneysel olarak aktive edildiğinde, bu iyon kanalları, hızlı dehidrasyon gibi tehlikeli durumlara yol açabilir (Thomas ve ark. 2011).

Oraklaşmış eritrositlerde, aşırı dehidrasyon sonrasında hücre içi yoğunluk artışı meydana gelir ve eritrositler katyon homeostazını sürdürme yeteneklerini kaybederler. Eritrosit içindeki Ca^{2+} konsantrasyonunun çok dar aralıklar içinde sabit tutulması, hücrenin fizyolojik işleyişi açısından önem arz eder. Eritrosit membranında bulunan birçok iyon kanalının işlevi bozulmuştur ve membran geçirgenliğinde artış meydana gelmiştir. P_{sickle} olarak tanımlanan deoksijenasyon kaynaklı ve seçici olmayan bu geçirgenlik, membrandaki kanalların aktif hale geldiği bir olaylar zincirini tetikler. Eritrosit, dehidrasyona uğrar (Bookchin ve ark. 1991) (Şekil 2.3). Bu geçirgenliğe sebebiyet veren; Gardos kanalı, K^+/Cl^- kotransporter, PIEZO 1, band 3 gibi belli başlı yolaklar bulunmaktadır.

Gardos kanalı (KCCN4): Ca^{++} sensitif K^+ kanalıdır, sağlıklı eritrositlerde Gardos kanalı hücreden K^+ kaybını sağlar ve kolloid ozmotik lizisi önler (Gardos 1958). İntrasellüler Ca^{++} seviyesi arttığında Gardos kanalı geçici bir biçimde aktive olarak K^+ ve Cl^- kaybına ve hücre büzülmesine yol açar. Buna Gardos etkisi adı verilir. HbS polimerleri membrana hasar verdikçe hücre içine Ca^{++} girişi artar (Lew ve ark. 1985). Oraklaşma sonucunda oluşan membran hasarı; K^+ iyonları ve suyun, Gardos yolu ve potasyum-klorid kotransportu tarafından hücre dışına hareketine sebep olarak, eritrositlerin dehidrasyona uğramasına neden olur. İntrasellüler Hb konsantrasyonu artar ve polimer oluşumu hızlanır. Hücre

içinden K^+ ve onunla ilişkili su kaybı, ortalama eritrosit içi hemoglobin konsantrasyonunun (MHCH) ve internal viskozitenin artışı yoluyla eritrosit deformabilitesinde belirgin azalmaya sebep olarak eritrosit fragilitelerini arttırır. Artmış hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu $Na^+/K^+/ATPaz$ pompasını da inhibe ederek Na^+ 'un hücre dışına çıkmasını ve K^+ 'un içeri girmesini engeller. İyonik denge iyice bozulur ve eritrositin oraklaşma olasılığında belirgin bir artış meydana gelir (Brugnara 2018).

K^+/Cl^- kotransporter (KCC): Dört homolog polipeptitten oluşan gradyan sensitif katyon transport kanalıdır. Kanal; Cl^- , K^+ ve simport olarak da suyun hücre dışına çıkmasına neden olur ve eritrosit hacminin düzenlenmesinde rol oynar. Çeşitli dokularda bulunur; KCC1, KCC3 ve KCC4 izoformlarının eritrositlerde bulunduğu gösterilmiştir (Arroyo ve ark. 2013). Orak eritrositlerde K-Cl kotransport aktivitesinin artmasının birçok nedeni vardır. Yük değiştirmiş Hb varyantlarının RBC membranına bağlandığı ve bu yolağı etkilediği düşünülmektedir (Romero ve ark. 2004). Bu etkileşim KCC regülasyonunda bir kusur oluşturur ve kanalın gecikmiş inaktivasyonuna yol açar (Bize ve ark. 2003). N-etilmaleimid ve hidrojen peroksit gibi oksidatif ajanlarla kanalın aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (Lauf 1985). Ürenin de bu kanalı uyararak eritrositlerin hızlı dehidrasyona uğramasına neden olduğu in vitro olarak gözlemlenmiştir (Joiner CH 2004).

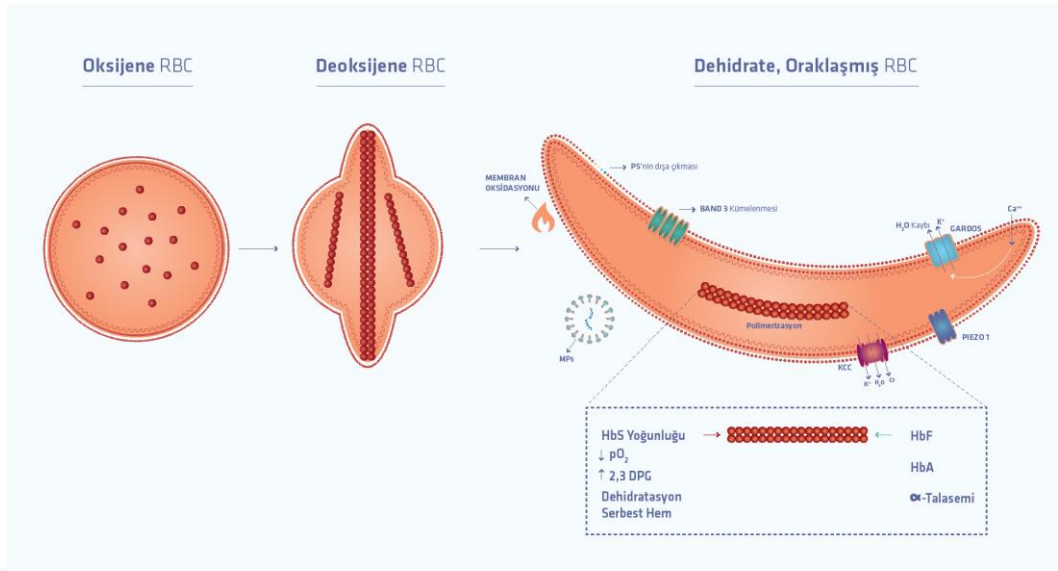
PIEZO 1 (mekanosensitif iyon kanalı): Mekanik uyarıları biyolojik sinyallere çevirirler. İnsanda iki türü bulunur (PIEZO 1 ve 2). Seçici olmayan katyonik (özellikle monovalan, divalan katyonlara daha az) iyon kanallarıdır (Coste ve ark. 2010, Gnanasambandam ve ark. 2015). Dolaşımda karşılaşılan fiziksel güçlerin RBC fizyolojisi üzerindeki etkilerinin çoğu belirsizliğini korumakla beraber, mekanosensitif iyon kanalı PIEZO 1'i aktive ederek bu kuvvetlerin önemli bir etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda; PIEZO 1 kanalından hücre içine Ca^{2+} girişi, mekanik kuvvetler ve RBC hacmi arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir. RBC'lerin mekanik kuvvetlere tepki olarak hacimlerini azaltma yetenekleri, küçük çaplı kılcal damarlar ve dalak sinüzoidlerinden geçme yeteneklerini artırabilir (Cahalan ve ark. 2015). Ek olarak, hacimdeki bu azalmanın, hemoglobini RBC'ler içinde yoğunlaştırarak çevrede O_2/CO_2 değişimine kolaylık sağlaması mümkündür, bu da hemoglobinden oksijen salınımını teşvik edebilir (Rao ve ark. 2009). HbS polimerizasyonun yol açtığı; K^+ kaybı ve Na^+ 'un hücre içine girmesi ile sonuçlanan, membran geçirgenliğinden büyük olasılıkla PIEZO 1 sorumludur (Ge ve ark. 2015).

Band 3: Normal şartlarda hemoglobinin demir atomları ferröz (Fe^{2+}) formdadır. Demir atomu, methemoglobin ve süperoksit (O_2^-) oluşumu sırasında ferrik (Fe^{3+}) forma dönüşür. İçerdiği demir atomları ferrik formda olan methemoglobinin, O_2 taşıma yeteneği yoktur. Methemoglobin yeniden hemoglobine indirgenmedikçe; okside olur ve önce hemikromları, daha sonra da Heinz cisimcikleri olarak tanımlanan denatüre hemoglobin agregatlarını oluşturur (Liu ve ark. 1996). HbS oksidasyonu ve polimerleri özellikle band 3 ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ anyon kanalı) proteininin NH_2^- terminaline bağlanma eğilimi gösterir (Walder ve ark. 1984). Band 3'te anormal anyon transport aktivitesi görülür (hücreye H^+ girişi). Yüzeyde band 3 kümelenmesi meydana gelir ve band 3 proteininin membran yüzeyindeki hareket kabiliyeti kısıtlanır (Spector ve ark. 2016). Band 3'ün kümelenmesi, oraklaşmış RBC'nin ömrünün kısalmasına neden olabilen otolog anti-band 3 antikorlarının bağlanmasını tetikler (Arese ve ark. 2005).

Membran hasarının yarattığı diğer problem ise, eritrosit hücre membranının kimyasındaki değişimlerdir. Lipid organizasyonunun bozulması, normalde iç katmanda lokalize olan negatif yüklü fosfatidilserinin (PS) eritrosit yüzeyinde belirmesine neden olur. PS, membranın dış yüzeyinde yer alır. Membran yüzeyindeki değişiklikler makrofaj yapışmasını artırır. HbS polimerizasyonu, eritrosit membranının lipid çift tabakası ve proteinlerinde değişikliğe yol açar. Bu değişiklik hücresel hidrasyonun azalmasına, hemolize ve anormal hücre-hücre etkileşimlerine sebep olur (Mankelow ve ark. 2015) (Şekil 2.3).

Membranda oluşan tüm değişiklikler mikropartiküller (MP) adı verilen tek lamelli veziküllerin oluşmasına yol açar. MP'lar içlerinde yüzey antijenleri, miRNA ve hem gibi yapıları bulundurup inflamatuvar süreçleri ve oksidatif stresi tetikler (Piccin ve ark. 2007, Camus ve ark. 2015) (Şekil 2.3).

Özetle membran yapısında meydana gelen değişiklikler; anormal katyon homeostazına, lipid çift tabakanın disfonksiyonuna, intravasküler hemolize ve anormal RBC'nin vasküler endotele istenmeyen şekilde yapışmasına yol açarak eritrosit ömrünün azalmasına sebep olur (Hoover ve ark. 1979). Eritrosit özelliklerindeki bu değişiklikler, damar tıkanması ve damar içi tromboz ile sonuçlanarak ağırlı krizlere ve organ yetmezliğine yol açabilir.



Şekil 2.3. Deoksijene HbS polimerizasyonu ve oraklaşmış eritrosit (İnal ve Arpacı 2021).

2.4.6 Hemoliz

Orak eritrositler oldukça kararsızdır ve ömürleri ciddi oranda azalır. OHA’da meydana gelen intravasküler (2/3) ve ekstravasküler hemoliz (1/3) birçok patofizyolojik olayın başlangıcını oluşturur. Hemikromlar ve Heinz cisimcikleri hücre membranına bağlanarak ona zarar verebilirler. Yeterli miktarda olduklarında eritrositin parçalanmasına bile neden olabilirler. Serbest hem ise, hemoglobinler arasındaki çekimi indükleyerek polimer oluşumunu hızlandırır. Hemoliz sonucunda artan plazma hem ve hemoglobin düzeyleri; iskemi-reperfüzyon hasarına, antioksidanların azalmasına, hemikrom, serbest Fe ve oksijen radikallerinin oluşumuna yol açar böylece oksidatif stres yaratır. Hemoliz, oksidatif stresin hem sebebi hem de sonucudur (Pan ve ark. 2009).

Nitrik oksit (NO), çeşitli biyolojik süreçlerde gaz halindeki bir sinyal molekülü ve efektördür. İntravasküler hemoliz, NO metabolizmasına etkili iki faktörü (Arginaz 1 ve Asimetrik dimetil arginin) açığa çıkararak NO’nin tükenmesine yol açar. NO, NO sentaz (NOS) enzimi tarafından üretilir. NO’ye ek olarak, NOS ayrıca süperoksit anyonu da üretir. Bu fenomen, NOS’in kenetlenmemesi (uncoupling) olarak adlandırılır, çünkü süperoksit oluşumu esas olarak NOS, kofaktörü veya substratı ile birleştirilmediğinde meydana gelir. Bu yolla NO üretimini engelleyen faktörler aynı zamanda oksijen radikallerinin oluşumuna aracılık eder (Luo ve ark. 2014). Arginaz 1, arginini ornitine dönüştürerek NO sentezini

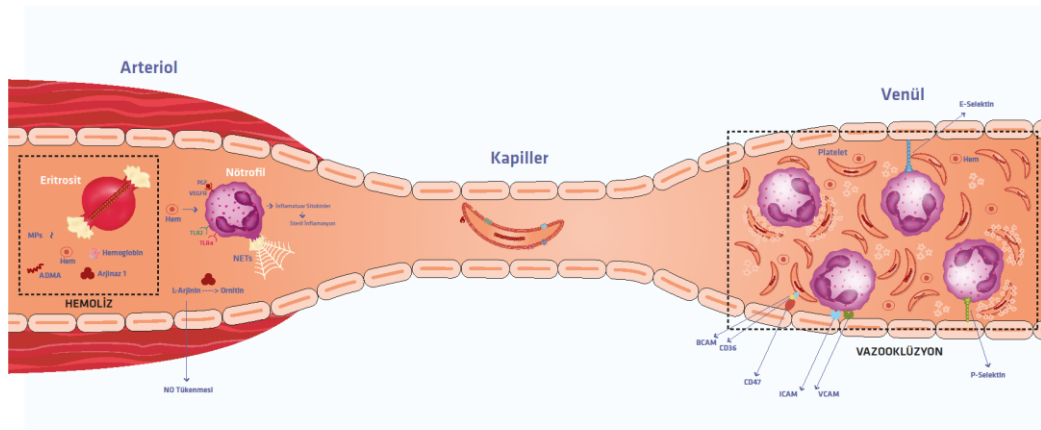
inhibe eder (Morris ve ark. 2005). Asimetrik dimetil arginin (ADMA) endojen bir NOS inhibitörüdür, eritrositlerde bol bulunur ve NO oluşumunu inhibe eder. Ayrıca, ekstrasellüler Hb ile oksijen radikalleri de, NO'nın tükenmesine ve biyoyararlanımının azalmasına yol açar. Bunların yanı sıra, HbS rölatif olarak anstabil ve prooksidan karakterdedir (Hebbel 1990). HbS'in otooksidasyonu oksijen radikallerinin artışına sebep olur. Bütün bu etkenler sonucunda vazokonstriksiyon ve kan hücrelerinin aktivasyonu görülür (Landburg ve ark. 2010) (Şekil 2.4).

2.4.7 İmmun Sistem Aktivasyonu ve İnflamasyon

Hemoliz sonucu hücre dışına çıkan hem ve Hb, doğal bağışıklık sistemini aktive eder (Kato ve ark. 2017). Hem, eritroblastlardan PGF (placenta growth factor) salınımını uyarır. PGF, nötrofil üzerindeki VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) ile birleşerek endotelin 1 ve inflamatuvar sitokin salınımını uyarır ve vazokonstriksiyon oluşur. Hem, nötrofilleri aktive ederek NETs (nötrofil ekstrasellüler traps) oluşumunu indükler (Gladwin ve Ofori-Acquah 2014). Toll-like reseptör 4 ve 2 (TLR4, TLR2), OHA'lı bireylerde yüksek oranda eksprese edilir. Doku hasarı ve platelet aktivasyonu sonucu salınan ligandlar, bu reseptörleri uyararak sitokin salınımına ve NETs oluşumuna neden olur (van Beers ve ark. 2015). Lipopolisakkaritler de bu reseptörlere bağlandığı için enfeksiyonlar da OHA'da vazooklüziv krizleri indükler (Kato ve ark. 2018) (Şekil 2.4).

2.4.8 Vazooklüzyon

Vazooklüzyon patofizyolojisinde; eritrosit-endotel hücresi, lökosit-platelet etkileşimleri merkezi rol oynar. Endotel hücreleri muhtemelen; eritrosit, hem, Hb ve ROS (reaktif oksijen türleri)'un direkt teması sonucu aktive olur (Hebbel 1997). Orak eritrositler normal eritrositlere oranla daha fazla adezyon molekülü eksprese ederler ve endotele yapışma eğilimleri vardır (Wagner ve ark. 2004). Eritrosit ve lökosit adezyonundan; ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin, P-Selektin, CD47, $\alpha V\beta 3$, PS ve heparin sülfat gibi moleküller sorumludur (Setty ve Stuart 1996). Reversibl orak eritrositler irreversible forma göre endotele daha fazla yapışma eğilimindedir. Endotel, inflamatuvar mediyatörleri üretir ve inflamatuvar sürecin önemli bir bileşenidir. Nötrofiller vazooklüzyon patogenezinde önemli bir yere sahiptir. Nötrofiller, aktive endotel tarafından üretilen selektinlere yapışarak eritrositleri bağlar. Trombositler; yüksek seviyelerde P-selektin ve $\alpha IIb\beta 3$ integrin eksprese ederek aktif durumda bulunurlar (Zhang ve ark. 2016). Trombositlerin çeşitli biyomarkerleri OHA'da artar (Trombospondin, CXCL4, β -tromboglobulin). Trombositler, dolaşımdaki heterosellüler agregatlarda bulunurlar (Dominical ve ark. 2014). Ayrıca sitokin salgılayarak immun sistemi uyarırlar (Davila ve ark. 2015) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. OHA'nin patofizyolojisi (İnal ve Arpacı 2021).

2.5 Mikro RNA (miRNA)

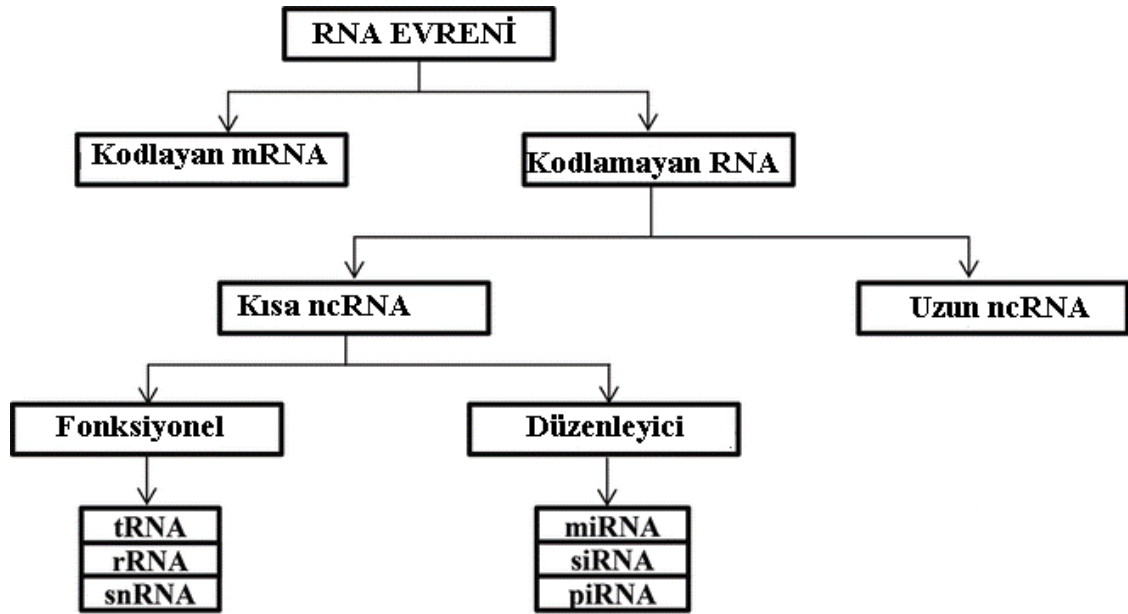
miRNA'lar, 18-25 nükleotid uzunluğunda kodlama yapmayan RNA molekülleridir. Ökaryotlarda gen ekspresyonunun önemli düzenleyicileri olarak kabul edilmektedirler.

On dokuzuncu yüzyılın sonunda, birkaç önemli keşif moleküler biyoloji çağının habercisiydi. 1869'da Friedrich Miescher, "nüklein" adını verdiği ve oldukça asidik olarak tanımladığı bir maddeyi çekirdeklerden izole etti; aslında DNA'yı keşfetmişti (Dahm 2005). 1900'lerin başında, birkaç bilim adamı DNA ve RNA'nın kimyasal bileşimi ve ilk yapıları ortaya koydu, ancak bu iki molekül arasındaki biyolojik farklılıklar hala belirgin değildi.

DNA ve RNA arasındaki bağlantı; 1950'lerin sonlarında Elliot Volkin ve Lawrence Astrachan'ın RNA'yı, DNA'dan sentezlenen DNA benzeri bir molekül olarak tanımlamasıyla kuruldu (Ochoa 1980, JF ve ark. 2000). Nitekim Rosalind Franklin'in X-ışını kristalografik çalışmaları sonucunda ve 1953 senesinde James Watson ile Francis Crick tarafından DNA'nın çift sarmal yapısının tanımlanmasından sonra, 1961'de RNA'nın DNA'dan proteinlere bilgi akışında bir ara molekül olabileceği öne sürülmüştür. İlk olarak 1958'de Francis Crick ve daha sonra François Jacob ve Jacques Monod tarafından tasarlanan moleküler biyolojinin santral dogması, bir DNA geninin nükleustaki RNA'ya transkripsiyonunu ve ardından sitoplazmada gerçekleşen protein sentezini içeriyordu. Bilgi akışının sadece DNA'dan RNA'ya ve daha sonra RNA'dan proteine ilerleyebileceği, proteinden nükleik asitlere asla ilerleyemeyeceği de belirtilmiştir (Cobb 2015). RNA'nın aracılık rolü, modern moleküler biyolojinin gelişimi için çok önemli olan yeni bir araştırma odağı haline geldi.

Modern biyolojinin en büyük sürprizlerinden biri, insan genomunun, toplam genom dizisinin %2'sinden daha azını temsil eden, ~20.000 protein kodlayan genleri içermesi ve bunların çoğunluğunun kodlamayan RNA'lara (ncRNA) kopyalanmasıdır. Kodlamayan RNA'lar, memeli genomundan kopyalanan ancak protein kodlama kapasitesi olmayan fonksiyonel RNA molekülleridir. İnsan genomunun yaklaşık %80'i kodlama yapmayan kısa (miRNA, piRNA, SiRNA, SnRNA, snoRNA, YRNA) ve uzun (linc RNA, NAT, eRNA, circ RNA, ceRNA) RNA'lardan oluşur. 200 nükleotitten büyük olan kodlamayan RNA'lar, uzun kodlamayan RNA olarak adlandırılırken; 200 nükleotitten daha kısa olanlar ise kısa kodlamayan RNA olarak tanımlanır (Ali ve Grote 2020) (Şekil 2.5). Bu ncRNA'lar kapsamlı bir şekilde incelenmiştir ve gen ekspresyonunun düzenlenmesine aracılık ettikleri bilinmektedir. Son yıllarda, lncRNA'lar, transkripsiyondaki rollerine ek olarak bir sinyal,

kılavuz, yapı iskelesi ve tuzak moleküller olarak hareket ederek transkripsiyon sonrası düzenlemeye katılan önemli moleküller olarak ortaya çıkmıştır. ncRNA'ların, DNA metilasyon modellerinin tanımlanmasında, baskılamının yanı sıra kromatin yeniden şekillenmesinde kritik roller oynadığı ve dolayısıyla epigenetik sinyalleşmede önemli bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir. LncRNA'ların ekspresyonu, dokuya ve gelişim aşamasına özgü bir şekilde düzenlenir ve bunların yanlış düzenlenmesi genellikle hastalık oluşumu ile ilişkilendirilir (Chen ve Aravin 2015).

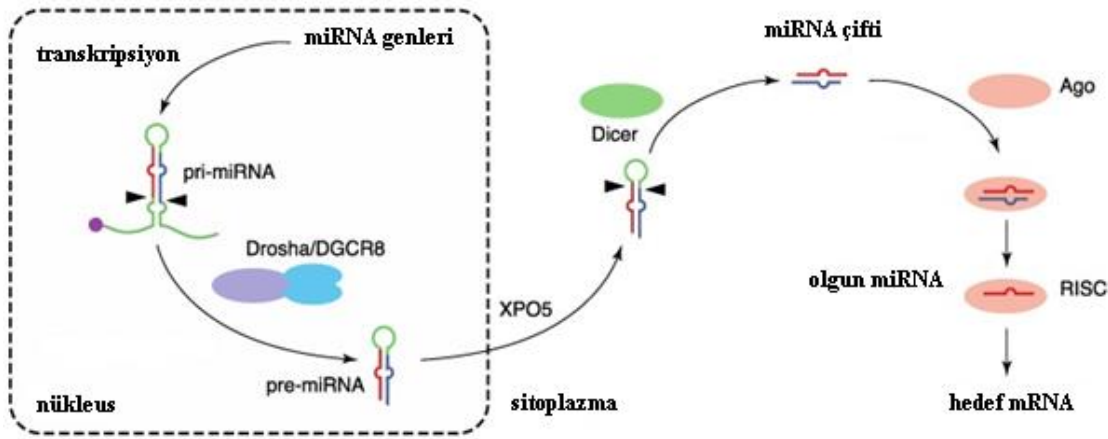


şekil 2.5. Kodlayan ve kodlamayan RNA sınıflandırması

2.6 miRNA Biyogenezi

miRNA'ların ilkin nükleusta, RNA polimeraz II veya RNA polimeraz III enzimleri tarafından ~1000nt uzunluğunda olan pri-miRNA (primer miRNA) adı verilen öncül transkripti sentezlenir. Pri-miRNA transkriptleri, mikroşlemci kompleksi (RNase III Drosha ve DGCR8'den oluşur) tarafından tanınır. Tek zincirden oluşan pri-miRNA'lar kendi üzerinde kıvrılarak sa  tokası (hairpin) şeklini oluşturur. Mikroşlemci, RNA'ları spesifik olarak böler, 3' uçlarında 2 nükleotidlik çıkıntı içeren bir ~60–70 nt  nc  miRNA'yı (pre-miRNA) serbest bırakır. Pre-miRNA, Exportin 5 adı verilen nükleer transport reseptör ile nükleustan sitoplazmaya gider ve Dicer-TRBP-Ago alt birimlerini içeren RISC tarafından

tanınırlar. Dicer, pre-miRNA'yı bölünme bölgesinden ayırır, böylece RISC ile bir ribonükleoprotein kompleksi olarak ilişkili kalan ~22 nt çift iplikli olgun miRNA (3' ucunda 2 nükleotidlik çıkıntılar-overhang) üretir. İki RNA zinciri, ATP'den bağımsız bir şekilde ayrılır. miRNA'nın kılavuz ipliği, aktif RISC kompleksinde Ago ile ilişkili kalır ve hedef mRNA'nın 3' UTR, 5' UTR, ORF veya promotör bölgelerine bağlanır. Bunun sonucunda, translasyonu ya mRNA'yı baskılayarak ya da mRNA'yı degrade ederek engeller (Gregory ve ark. 2005) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. miRNA biyogenezi (Matsuyama ve Suzuki 2019)

2.7 miRNA ve Hematopoez

miRNA'lar, ökaryotlarda özellikle hücre gelişimi, farklılaşma ve apoptoziste önemli rol oynayan gen ekspresyonunun negatif regülatörleridir. Normal hemapotoezde, hemen hemen her basamakta hematopoetik farklılaşmayı düzenlerler. Bu nedenle miRNA'ların anormal ekspresyonu, birçok hematopoetik hastalıkla yakından ilişkilidir (Vasilatou ve ark. 2010).

Çalışmalar; miRNA'ların, nükleusları atılmadan önceki erken farklılaşma aşamalarında yer alan eritroblastlarda oluştuğu ve terminal farklılaşmadan sonra olgun eritrositte kalmaya devam edebileceğini göstermektedir. Olgun *HbSS* ve *HbAA* eritrositlerinin miRNA ifadeleri arasında anlamlı bir fark gözlenmiş ve miRNA seviyelerinin eritroid farklılaşma üzerine etkili olduğu düşünülmüştür (Chen ve ark. 2008).

HbSS eritrositlerinin internal miRNA düzeylerinin sıtma direncinde rol oynadığı gösterilmiştir. Hem *HbAS* hem de *HbSS* eritrositlerinde spesifik miRNA birikiminin artması, *P. falciparum*'un büyümesini önemli ölçüde azaltmıştır. miR-451, parazit büyümesi için gerekli olan *P. falciparum* mRNA'larına kovalent bağlanmış ve translasyonunu baskılamıştır. Bu şekilde yüksek düzeyde antimalaryal etki göstermiştir.

Eritrositler nükleus içermese de, bu hücreler bol miktarda miRNA'ya sahiptir. miRNA'ların gen ekspresyonunu düzenleme potansiyeli göz önüne alındığında, *P. falciparum*'a geçen 100'den fazla farklı miRNA belirlenmiştir. Parazit büyümesini negatif olarak modüle eden, özellikle iki miRNA'nın (let-7i ve miR-451) orak hücre eritrositlerinde zenginleştirildiği gösterilmiştir (LaMonte ve ark. 2012).

Eritrosit miRNA'ları ayrıca *Plasmodium* enfeksiyonu sırasında konakçı hücreler arası iletişimde önemli bir rol oynar. Enfekte eritrosit, kan dolaşımında fonksiyonel miRNA'lar (miR-451 ve let-7b) ile zenginleştirilmiş Ago kompleksleri taşıyan ekstrasellüler vezikül (EVs)'leri serbest bırakır. Bu EVs'ler endotel hücreler tarafından hücre içine alınır. miRNA'lar girdikleri endotel hücresinin gen ekspresyonunu değiştirerek bariyer özelliklerinin değişimine neden olur. Ayrıca makrofajlar tarafından etkili bir şekilde internalize edilen EVs'lerin güçlü bir inflamatuvar yanıtı indükledikleri gösterilmiştir (Mantel ve ark. 2016).

Düzenleyici miRNA'lar, fetal hemoglobinin yetişkin hemoglobine geçişinin moleküler regülasyonunda rol oynarlar. γ zincirinin üretiminden β zincirine geçişte dört ana transkripsiyon faktörü; γ ve β genlerinin susturulmasına neden olabilen KLF1, BCL11A, MYB ve SOX6'dır. Sp/KLF3 ayrıca γ globin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi olan β globin ekspresyonunda önemli transkripsiyon faktörleridir. KL, eritropoezi ve ayrıca globin genlerinin geçişini etkiler; işlevi NFE2/GATA1 kompleksi tarafından indüklenen, miR-221/222 ve miR-199b yoluyla inhibe edilir. GATA 1/2, FOG 1 globin lokusuna bağlanır ve γ globin ekspresyonunu inhibe eder. Fetal hemoglobini artırmak için kullanılan HU, miR-26b/-151-3 düzeylerini doğrudan arttırır. ALK4, β globin ekspresyonunu arttırarak eritroid farklılaşmasına katkıda bulunur (Saki ve ark. 2016) (Şekil 2.7).

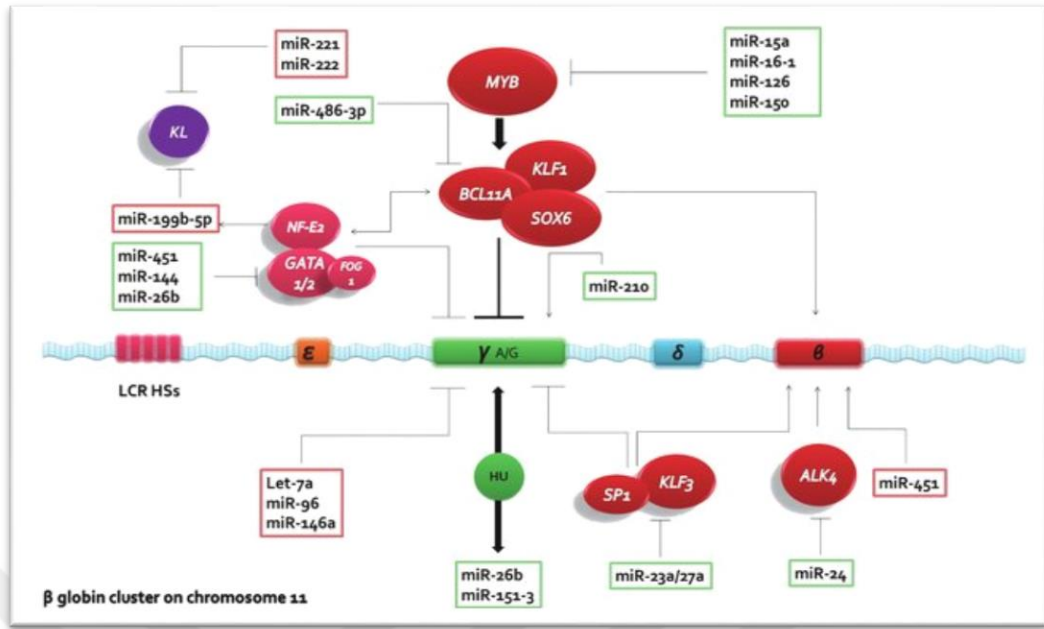
miR-146a'nın, γ globin gen ekspresyonunun baskılanmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Kordon kanında ve yetişkin kan retikülositlerinde miRNA ekspresyonunun karşılaştırılması sonucu, miR-146a'nın ekspresyon seviyelerinde farklılık saptanmıştır. miR-146a; yetişkin retikülositlerinde, kordon kan retikülositlerine kıyasla

önemli ölçüde daha yüksek miktarda olduğu bulunmuştur ve dolayısıyla γ globin gen ekspresyonunun potansiyel inhibitörü olarak tanımlanmıştır (Azzouzi ve ark. 2011).

Eritropoezin ana düzenleyicisi olan eritroid Krüppel benzeri faktör (EKLF/KLF1), γ globin/ β globin gen geçişinde rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür (Siatecka ve Bieker 2011). Yapılan bir çalışmada; miR-326'nın, EKLF aracılığıyla hemoglobin değişimi ve eritroid farklılaşmada rol oynadığı tespit edilmiştir. EKLF ekspresyonu, translasyon düzeyinde 3'UTR'ye bağlanan miR-326 tarafından down regüle edilir. K562 hücrelerinde veya CD34+ hematopoetik progenitör hücrelerde miR-326 aşırı ekspresyonu, EKLF protein seviyelerinin düşmesine neden olmuş ve yüksek γ globin ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir. Buna karşın fizyolojik miR-326 seviyelerinin inhibisyonu EKLF'yi arttırdığı ve böylece γ globin ekspresyonunu azalttığı belirtilmiştir (Li ve ark. 2018). OHA'da yapılan çalışma olmamasına rağmen miR-326 özellikle onkoloji alanında daha fazla araştırılan bir moleküldür. miR-326'nın bir tümör baskılayıcı gen olarak hareket edebileceğine ve birçok kanser türünde tümör prognozu ile ilişkili olduğuna dair önemli çalışmalar vardır (Pan ve ark. 2019).

Nükleer ilişkili faktör 2 (NRF2), oksidatif stres yanıtında ve hücrel antioksidan savunma sisteminde ana faktördür (Lee ve Johnson 2004). NRF2'nin azalması, hücrel glutatyon seviyelerinin azalmasına yol açar ve hücreler oksidatif strese daha duyarlı hale getirir. miR-144, NRF2 inhibe etmek suretiyle sürece katkıda bulunur. Orak eritrositlerdeki yüksek miR-144 ekspresyonu seviyeleri, NRF2 seviyesini düşürür ve bu hücrelerin oksidatif strese karşı toleransını azaltır (Sangokoya ve ark. 2010). miR-144/NRF2 düzenleyici mekanizması, orak eritrositleri oksidatif stres, hemoliz ve daha şiddetli anemiye yatkın hale getirir. Yapılan bir çalışmada; miR-144'ün aşırı ekspresyonu ile NRF2 gen sessizleştirilmesi gözlemlenmiş ve γ globin gen transkripsiyonunun paralel olarak baskılandığı bulunmuştur. (Li ve ark. 2019).

Myb, çeşitli dokularda hücre çoğalmasını ve olgunlaşmasını düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Yapılan araştırmalarda; miR-150'nin MYB mRNA'sını inhibe ederek α globin sentezini ve eritropoezi baskıladığı gösterilmiştir (Lu ve ark. 2008, Byon ve Papayannopoulou 2012). K562 hücrelerinde, miR-150 down regülasyonunun eritroid olgunlaşmayı etkilediği gözlemlenmiştir (Bruchova-Votavova ve ark. 2010). Ayrıca miR-150 dolaylı olarak γ globin sentezini artırarak HbF seviyelerini yükseltir (Saki ve ark. 2016).



Şekil 2.7. Düzenleyici miRNA'ların etkisi ile fetal hemoglobinin yetişkin hemoglobine geçişinin moleküler regülasyonu. Artan ve azalan γ globin ekspresyonu sırasıyla yeşil ve kırmızı kutularda gösterilmiştir. (Saki ve ark. 2016)

2.8 Klinik

Membranın değişmiş ve katılaşmış yapısı, eritrositlerin venül endotelyumuna yapışmasını kolaylaştırır. Bu anormallikler vazooklüzyon ve hemolizi başlatarak doku iskemisi, organ harabiyeti gibi hastalığın kliniğini oluşturan yıkıcı olaylara neden olurlar. Vazooklüziv bileşen genellikle klinik gidişata hakimdir.

Vazooklüzyon, değişken klinik belirtilere neden olur. Aralıklı vazooklüzyon epizotları; bağ doku, kas ve iskelet sisteminde akut ağrı, hassasiyet, ateş, taşikardi ve anksiyete ile kendini gösteren iskemik bozukluklar oluşturur. Ağrılı krizler olarak adlandırılan bu tekrarlayan ataklar, en yaygın klinik belirtilerdir. Sıklıkları ve şiddetleri büyük ölçüde değişir. Ağrı vücudun hemen hemen her yerinde gelişebilir ve birkaç saatten 2 haftaya kadar sürebilir. Hastaneye yatmayı gerektiren tekrarlayan krizler (yılıda > 3 atak), kronik end organ hasarı oluşturarak sağkalımı azaltır. Krizleri tetikleyici faktörler arasında enfeksiyon, ateş, aşırı egzersiz, anksiyete, ani sıcaklık değişiklikleri ve hipoksi bulunur (Darbari ve ark. 2020).

Tekrarlayan iskemik ataklar, oraklaşmaya yatkın mikrovasküler yataklara sahip dokuları yok edebilir. Bu nedenle, dalak işlevi sıklıkla yaşamın ilk 18-36 ayında kaybolur

ve bu olay özellikle pnömokoklara karşı enfeksiyon duyarlılığına sebep olur. Erken çocukluk döneminde nadir görülen dalağın akut venöz tıkanıklığını (dalak sekestrasyon krizi) tedavi etmek için acil transfüzyon ve/veya splenektomi gerekebilir. Retina damarlarının tıkanması kanama, neovaskülarizasyon ve nihayetinde retina dekolmanına neden olabilir. Renal nekroz yaygın olarak görülür ve böbrek yetmezliğine yol açar. Kemik ve eklem iskemisi, özellikle femoral veya humerus başlarının aseptik nekrozuna, kronik artropatiye ve diğer ortamlarda nadiren karşılaşılan *Salmonella* gibi organizmaların neden olabileceği osteomyelite yol açabilir. El-ayak sendromu, parmakların ağrılı enfarktüsü sonucu oluşur. İnme çocuklarda daha sık görülmesine karşın yetişkinlerde daha az yaygındır ve genellikle hemorajiktir. Erkeklerde önemli bir komplikasyon, penil venöz çıkış yollarının enfarktüsüne bağlı priapizmdir; kalıcı impotans sık görülen bir sonuçtur. Kronik alt bacak ülserleri muhtemelen iskemi ve distal dolaşımdaki süper enfeksiyondan kaynaklanmaktadır (Jameson ve ark. 2018).

Akut göğüs sendromu; göğüs ağrısı, taşipne, ateş, öksürük ve arteriyel oksijen satürasyonunun azalması ile karakterize tipik bir klinik durumdur. Pnömoni, pulmoner emboli, kemik iliği enfarktüsü, kemik iliği embolisi ve miyokardiyal iskemiyi taklit edebilir. Akut göğüs sendromunun; akciğer ve/veya kemik iliğinde oraklaşmaya bağlı olduğu, ağrıya ve geçici pulmoner disfonksiyona neden olduğu düşünülmektedir. Çoğu zaman ayırıcı tanı yapılamaz. Akciğer enfarktüsü ve pnömoni, bu hastalarda altta yatan veya eşlik eden en sık durumlardır. Tekrarlayan akut göğüs ağrısı atakları, sağkalımın azalması ile ilişkilendirilmiştir. Akut olarak, arteriyel oksijen satürasyonundaki azalma özellikle kötü prognoz göstergesidir çünkü büyük ölçekte oraklaşmayı arttırıp tablonun kötüleşmesini sağlar. Tekrarlayan pulmoner krizler; pulmoner hipertansiyona ve kor pulmonaleye yol açarak ölüm riskini arttırır (Jain ve ark. 2017, Sundd ve ark. 2019).

Orak hücre sendromları, klinik bulguları bakımından çok çeşitlilik gösterir. Bazı hastalar yetişkin yaşamı boyunca neredeyse asemptomatik kalırken, diğerleri erken çocukluktan itibaren hastaneye yatmayı gerektiren tekrarlayan krizlerden muzdariptir. Orak-talasemi ve orak-HbE hastaları, RBC içindeki diğer hemoglobinlerin varlığının iyileştirici etkileri nedeniyle daha hafif semptomatik olma eğilimindedir. Orak hücre anemisinin yaygın varyantlarından biri olan HbSC hastalığı, sıklıkla daha az hemolitik anemi ve daha fazla retinopati ve aseptik kemik nekrozu gelişme eğilimi ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte,

çoğu bakımdan, klinik belirtiler orak hücre anemisine benzerdir. Bazı nadir hemoglobin varyantlarının oraklaşma fenomenini şiddetlendirdiği saptanmıştır (Jameson ve ark. 2018).

Bazı çalışmalarda; OHA'lı olgular fenotip sınıflandırması yapmak amacıyla, klinik ve laboratuvar ölçümler kullanılarak değerlendirilmiştir. Klinik kriterler olarak; yıl içinde hastanedeki yatış gün sayısı, yıl içinde ağır vazooklüziv kriz sıklığı, yıl içerisinde aldığı kan transfüzyon sayısı, kalça komplikasyonları varlığı, bacak ülseri varlığı, hepatobiliyer komplikasyon varlığı, nörolojik olayların varlığı, renal bozuklukların varlığı ve BMI değerleri belirlenmiştir. Belirlenen klinik kriterlere göre puanlama yapılmış ve her olgu için bir fenotip puanı oluşturulmuştur. Bu puanlara göre hastalar asemptomatik, ılımlı ve ağır fenotipe ayrılmıştır (Mikobi ve ark. 2017). Fenotip sınıflaması, hastaları ana gruplara ayırarak genotip ile fenotip arasında daha sağlıklı bir bağlantı kurmamıza olanak sağlayabilir.

Orak Hücre Taşıyıcılığı Klinik Belirtileri: Orak hücre özelliği genellikle asemptomatiktir. Anemi ve ağrılı krizler nadirdir. Nadir görülen ancak oldukça belirgin bir semptom, muhtemelen papiller nekroz nedeniyle ergen erkeklerde sıklıkla ortaya çıkan ağrısız hematüridir. İzostenüri, aynı sürecin daha yaygın bir tezahürüdür (Jameson ve ark. 2018).

2.9 Tanı

Orak hücre sendromlarından; hemolitik anemi, periferik yaymada görülen orak hücreler veya Howell-Jolly cisimcikleri veya derece 2 veya 3 eliptositler, şistositler, hedef hücreleri, dakriyosit, polikromazi, anizositoz, poikilositoz ve aralıklı iskemik ağrı atakları varlığında şüphelenilmektedir (Losek ve ark. 1992). Laboratuvar tanıda özellikle elektroforez ve HPLC altın standarttır. HPLC yönteminde; bir sıvıda çözünmüş bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan sabit faz ile etkileşime girerek kolon içinde farklı hızlarla hareket eder. Bileşenlerin değişik zamanlarda kolonu terk ederek birbirlerinden ayrılması prensibine dayanır. HPLC; gıda endüstrisi, çevre mühendisliği, tıp, kimya, ziraat, farmakoloji gibi, çok çeşitli alanlarda saflaştırma, tespit etme ve miktar belirlemek için kullanılır. Tek bir analizde HbA₂ ve HbF'in belirlenmesi ve mevcut herhangi bir hemoglobin varyantının tanımlanmasını sağlar (Rifai ve ark. 2017). Bu analizlerde anormal HbS bandının görülmesi OHA tanısının konulmasını sağlar. Moleküler yöntemler ile de tanı doğrulanabilir. OHA, talasemi ve HbSC hastalığı farklı prognozlara veya klinik özelliklere

sahip olduğundan, hastanın hemoglobin profilinin tam olarak karakterize edilmesi önemlidir. Teşhis genellikle çocuklukta konulur, ancak ara sıra, genellikle bileşik heterozigot durumları olan hastalar, ergenlik, hamilelik veya erken yetişkin yaşamın başlangıcına kadar semptom geliştirmez. Aile üyelerinin ve potansiyel ebeveynlerin genotipinin belirlenmesi, genetik danışmanlık için kritik öneme sahiptir (Hoppe 2013).

2.10 Tedavi

OHH, akut ve kronik komplikasyonlarla seyreden ve vücudun tüm sistemlerini etkileyen bir hastalıktır. Günümüzdeki tedavi yaklaşımları öncelikle bu komplikasyonların önlenmesine yönelik yapılmaktadır. Terapotik yaklaşımlar; ilaç tedavisi, eritrosit transfüzyonu, kök hücre transplantasyonu, enfeksiyonların engellenmesi ve organ hasarının (renal, santral sinir sistemi, pulmoner sistem vb.) önüne geçmek olarak sıralanabilir.

OHA'nın patofizyolojisinin iyi anlaşılmasına rağmen, mevcut ilaç tedavileri sınırlıdır. Uzun yıllar boyunca HU, OHA tedavisi için kullanılan tek seçenek olarak kalmıştır (Charache ve ark. 1995). Bununla birlikte, FDA (U.S Food and Drug Administration) tarafından L-glutamin, crizanlizumab ve volekselotore onay verilmesinin ardından ilaç tedavilerinde ilerleme kaydedilmiştir.

Hidroksiüre kandaki HbF düzeylerinde artışa sebep olur, eritrosit deformabilitesi ve hidrasyonunu iyileştirir ayrıca eritrositlerin vasküler endotele adezyonunu da azaltır. Hidroksiüre çoğu hastada HbF düzeylerini artırmasına rağmen, orak eritrositlerde dağılımı heterojendir. Bu yüzden tedaviden tüm eritrositler aynı şekilde fayda göremez (Telen 2016).

L-glutamin, 5 yaş ve üzeri pediatrik ve yetişkin hastalarda homozigot OHA'nın akut komplikasyonlarını azaltmak için 2017 yılında FDA tarafından onaylanmıştır (Kaufman 2017). L-glutamin, orak eritrositlerin oksidatif hasara duyarlılığını azaltmakla ilgili olabilecek karmaşık, dolaylı bir etki mekanizmasına sahiptir.

Crizanlizumab, hümanize, anti-P-selektin monoklonal bir antikordur. Vazooklüziv krizleri önlediği bildirilmiştir (Ataga ve ark. 2017).

Volekselotor, Hb ve oksijen arasındaki afiniteyi değiştirerek etki eder. Hb'nin α zincirinin N terminalinde yer alan valin amino asidi ile bir kovalent bağ (doğada tersinir) oluşumu yoluyla etki eder. Hb'nin allosterik modifikasyonu ile sonuçlanır ve oksijen ile Hb arasındaki afiniteyi artırır (Vichinsky ve ark. 2019).

Diğer kronik hastalık durumlarında olduğu gibi, başlangıç tedavisine karar verirken ilacın maliyetini göz önünde bulundurmak önemlidir. Hidroksiüre; L-glutamin, crizanlizumab ve vokselotordan çok daha ucuzdur. Vazooklüziv komplikasyonlar ve hemolitik anemi için başlangıç tedavisi olarak muhtemelen daha uygundur. Ancak OHA'nın karmaşık patofizyolojisi ve mevcut farmakolojik tedavilerin sınırlı klinik etkinliği nedeniyle, tek bir ilacın OHA ile ilişkili tüm komplikasyonları iyileştirmesi pek olası değildir. Bu nedenle, birden fazla ilacın mevcudiyeti, farklı etki mekanizmalarına ve örtüşmeyen yan etki profillerine dayalı kombinasyon tedavileri ön plana çıkar. Potansiyel faydalarına rağmen, çoklu ilaç kullanımını içeren kombinasyon tedavisi, çoklu ilaç kullanımına bağlı olarak tedavi planına uyum olasılığını azaltır (Rai ve Ataga 2020).

Eritrosit transfüzyonu, hiperviskoziteyi ve demir yüklenmesini arttırdığı için total Hb miktarı ve hastalığın şiddeti göz önüne alınarak uygulanır (Kapoor ve ark. 2018).

Kök hücre transplantasyonu sonra, transplant ilişkili mortalite %5-10 civarında olup asıl neden enfeksiyonlar ve graft versus host hastalığıdır. Uyumlu donör bulunmuş küçük çocuklarda transplantasyona bağlı ölüm oranı hala oldukça yüksek olması sebebiyle, OHA hastalarında transplantasyon kararını vermek zordur. İmmünesupresif ilaç kullanımının ilerde görülen kanser vakalarını arttırdığı gözlemlenmiştir (Hsieh ve ark. 2011). Ne yazık ki, sınırlı endikasyonlar, prosedür riskleri ve uygun donör bulunmasındaki zorluklar nedeniyle OHA'lı hastaların sadece %8,9'u kök hücre prosedürleri için uygundur (Hsieh ve ark. 2009, Özdoğu ve Boğa 2015).

Enfeksiyonlara, uygun antibiyotik tedavisi ile müdahale edilir. Vazooklüziv kriz ve oluşan komplikasyonlar ise hidrasyon, oksijenasyonun sağlanması ve analjezikler yolu ile tedavi edilir (Bauer ve ark. 2017).

Orak hücre hastalığı için geliştirilmekte olan genetik stratejiler; oraklaşma önleyici protein kodlayan gen ilavesi, γ globin gen baskılayıcılarının susturulması yoluyla HbF indüksiyonu ve CRISPR/Cas9 gibi yöntemlerle mutasyonun düzeltilmesi OHA için ana yaklaşımlardır. Bununla birlikte, gen transfer yöntemlerinin düşük verimli oluşu ve genotoksitite gibi yan etki potansiyelleri klinik deneylere başlamadan önce ele alınması gereken kritik konulardır (Demirci ve ark. 2018).

OHA'da klinik şiddeti ortaya koyacak biyobelirteçlerin tanımlanması tedavi yaklaşımı açısından klinisyenlere ışık tutacaktır. Dolaşımdaki miRNA'lar, vasküler belirtilerle ilişkili hastalıkların şiddetini işaret edebilen biyobelirteçler olarak tanımlanmıştır

(Hakimzadeh ve ark. 2015). miRNA'lar, tanısal veya prognostik belirteçler olarak birçok hastalıkta incelenmesine rağmen OHA'da çok az çalışma yapılmıştır. Çalışmamızın amacı; OHA hastalarının miRNA ekspresyon düzeylerinin fenotipi belirleyebilme potansiyellerini ve sağlıklı kontrollerle arasındaki farkı ölçmektir. Çalışmamızda eritropoez ile bağlantılı olan miRNA'lar; miR-146, miR-326, miR-144 ve miR-150 araştırılmıştır.

Sonuç olarak; OHA tanımlanan ilk moleküler hastalık olmasına rağmen patofizyolojisinde etkin olan faktörler ve klinik çeşitliliğin anlaşılması çok yenidir. Genetik bilimi hakkında bilgilerimiz arttıkça, OHH'lı hastalar için umut verici gelişmeler yaşanmaktadır. Etkin tedavi yaklaşımları geliştirilmesi için hastalığın ardındaki moleküler mekanizmaların tam olarak aydınlatılması ve daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Bu çalışmaya Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Hematoloji polikliniğinde takip edilen 43 orak hücre anemi tanılı hasta ve 39 sağlıklı kontrol dâhil edildi.

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alındı ve onay belgesi Ek 1'de verildi. Hasta grubu, daha önce orak hücre anemisi tanısı konulmuş, en az 120 gün transfüzyon almamış ve vazooklüziv kriz epizodunda olmayan bireylerden oluştu. Kontrol grubu ise; benzer yaş aralığına sahip, akut veya kronik hastalık tanısı olmayan, sağlıklı bireylerden (16 yaş üstü, 65 yaş altı ve gebe olmayan) oluştu. Hasta ve kontrol grubunu oluşturan kişilerden onam formu alındı ve formların örneği Ek 2'de verildi.

3.2 Etik Kurul Onayı

Çalışmaya dâhil edilen orak hücre anemisi hastalarından ve sağlıklı kontrollerden Helsinki etik konular bildirgesi şartlarına uygun olarak tıbbi onam alınmıştır. Etik onay için, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığı tarafından 27.06.2019 tarih ve 2019/84 protokol kodu ile etik onay alınmıştır.

3.3 Örneklerin Toplanması

Sağlıklı kontrollerden ve hasta grubundan, sabah aç karnına ve toplam iki (2) tüp olacak şekilde flebotistler tarafından venöz kan alındı. Örnekler EDTA'lı tüplere alındıktan sonra, aynı gün tam kan sayım cihazı vasıtasıyla hemogram çalışılıp HPLC ile hemoglobinin tiplendirilmesi yapıldı ve sonuçlar kaydedildi. RNA izolasyonu için kullanılacak kan örnekleri; alındıktan en geç 2 saat içinde, RNA Saver solüsyonu ile karıştırıldı ve etiketlenerek -20°C'de derin dondurucuya koyularak çalışma gününe kadar muhafaza edildi.

3.4 Kullanılan Cihaz ve Kimyasal Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve ticari isimleri Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.

Kullanılan Kimyasallar	Markası
İzopropanol	Thermo Scientific
Etanol	Thermo Scientific
DNAaz/RNAaz free water	Thermo Scientific
RNA save solüsyonu	BI

Çalışmamızda kullanılan cihazlar ve ticari isimleri Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3. 2. Çalışmada kullanılan cihazlar.

Kullanılan Cihazlar	Markası
Real-Time PCR Cyclers	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

Çalışmamızda kullanılan ticari kitler Çizelge 3.3’te verilmiştir.

Çizelge 3. 3. Çalışmada kullanılan ticari kitler.

Ticari kitin adı	Markası	Katalog No
Quick-RNA™ Miniprep Plus Kit	ZymoResearch	R1057T, R1057, &R1058
ID3EAL miRNA qPCR Assay	MiRXES	-

3.5 Örneklerin Çalışılması

3.5.1 Tam Kan Sayımı Ölçümü

Tam kan sayımı, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında bulunan tam kan sayımı cihazı kullanılarak yapılmıştır.

3.5.2 Hemoglobin Varyant Analizi

3.5.2.1 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

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

3.5.3 miRNA Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

3.5.3.1 Ayraç Hazırlama

1. RNA Wash Buffer: 24 ml RNA Wash Buffer' a, 96 ml %100 etanol eklendi.
2. DNAaz 1: Lipofilize DNAaz 1'e 275 ml DNAaz/RNAaz free su eklendi ve -20°C'de saklandı.
3. Proteinaz K: Proteinaz K hazırlandı ve -20°C'de saklandı (1040 µl Proteinaz K digestion buffer + 275 µl DNAaz/RNAaz free water kullanıldı).

Örnekler daha önce adlandırıldıkları şekilde, uygun yerlere yazıldı ve etiketleme yapıldı.

3.5.3.2 Örnek Hazırlama

1. OHA hastalarının ve sağlıklı kontrollerin kan örneklerinde miRNA ekspresyon düzeyleri ölçülmüştür. Eritrosit miRNA düzeyleri, tam kan miRNA düzeylerinin çoğunu oluşturur; lökosit miRNA'ları ise tam kan miRNA'larının nispeten küçük bir bölümünü temsil eder. (Chen ve ark. 2008). Bu nedenle, bu tez çalışmasında en doğru sonuca ulaşabilmek adına tam kan örnekleri analiz edilmiştir. Örnekler +4 °C'de 15 dk. bekletilir.
2. 200 µl kan örneği + 200 µl su* + 800 µl RNA lysis buffer vortekslenir.
3. 200 µl DNA/RNA Shield + 200 µl kan örneği + 8 µl Proteinaz K karıştırılarak oda sıcaklığında (20-30 °C) 25 dk. inkübe edilir.
4. Kan örneğine 1:1 volüm izopropanol eklendi ve vortekslendi (408 µl kan + 408 µl izopropanol).

Örneklerimiz ilk alındığında RNA saver solüsyonu içinde bekletildiği için 3 ve 4. Adım atlandı. Doğrudan RNA izolasyonuna geçildi.

*Su, daima DNAaz/RNAaz free water'ı ifade etmektedir.

3.5.3.3 RNA İzolasyonu

Genomik RNA ekstraksiyonu ticari kit kullanılarak yapıldı. Ticari izolasyon kiti ile *HbSS*'li ve *HbAA*'lı olguların tam kanından miRNA izole edilmiştir.

1. Hazırlanan örnekten 800 µl, içinde Spin-Away filter (sarı) toplama tüpü içine konuldu ve 13000xg 30 sn. santrifüj edildi.
2. Santrifüj sonrası toplama tüpü içindeki filtre atılarak alt kısımda kalan örnek ile çalışmaya devam edildi.
3. Örnek üzerine 200 µl etanol eklenerek iyice karıştırıldı.
4. Karışım, toplama tüpü içindeki Zymo-Spin III CG Column (yeşil)'e aktarıldı ve 13000xg'de 30 sn. santrifüj edildi. Column tutuldu, altta kalan kısım atıldı.
5. DNAaz I uygulaması yapıldı.
6. D1: 400 µl RNA Wash buffer Column üzerine eklendi ve santrifüj edildi (13000xg 30 sn). Toplama tüpünde kalan kısım atıldı.
7. D2: 5 µl DNAaz 1 + 75 µl DNA digestion buffer bir tüpte karıştırıldı ve karışım Column'a eklendi.
8. D3: 15 dk. oda sıcaklığında bekletildi.
9. 400 µl RNA Prep Buffer, Column'a eklendi ve santrifüj yapıldı (13000xg 30 sn). Toplama tüpünde kalan kısım atıldı.
10. 700 µl RNA Wash Buffer, Column'a eklendi ve santrifüj yapıldı (13000xg 30 sn). Toplama tüpünde kalan kısım atıldı.
11. 400 µl RNA Wash Buffer, Column'a eklendi ve 13000xg 2 dk santrifüj yapıldı. Column dikkatlice bir ependorf tüpe transfer edildi.
12. Column üzerine 50 µl su eklendi ve 13000xg 30 sn santrifüj edildi Column atıldı, kalan karışım cDNA elde etmek üzere kullanıldı (Kullanılınca kadar <-70 °C'de saklanabilir).

3.5.3.4 RNA Kantitasyonu

Saflaştırılan RNA örneklerinin konsantrasyonu, nükleik asit ölçer (Thermo, Multiskan GO) ile örneklerden 1 µl alınarak belirlendi. cDNA oluşturmak için aynı oranda RNA miktarı kullanıldı.

3.5.3.5 cDNA Elde Edilmesi

Elde edilen RNA'ların cDNA'ya dönüştürülmesi için MiRXES cDNA sentez kiti kullanılmıştır.

1. Mültipleks olarak çalışıldı. Soğuk blok üzerine PCR tüpleri etiketlenerek konuldu.
2. Kite bulunan miRNA cDNA buffer ve RT primerler oda sıcaklığında çözüldü. Çizelge 3.4.'deki oranlara uyularak ayrı bir tüpe konuldu ve vortekslendi.

Çizelge 3. 4. cDNA eldesinde kullanılan kimyasal ve hacimleri.

Reagents	Hacim
Template RNA	12 µL'ye kadar (4µl eklendi.)
miRNA cDNA buffer	5 µL
RT primer-1	1 µL
RT primer-2	1 µL
Revers Transkriptaz	1 µL
Nükleaz içermeyen su	20 µL'e kadar (8 µL kullanıldı.)
Total Volüm	20 µL

3. Oluşturulan master mix'e en son olarak revers transkriptaz eklenerek pipetaj yapıldıktan sonra kısa bir spin yapıldı ve 42 °C'de 30 dk. sonrasında ise 95 °C'de 5 dakika inkübe edildi.

3.5.3.6 RT- PCR Analizi

Kantitatif real-time PCR (qPCR) veya kinetik PCR olarak da adlandırılır. DNA'nın amplifikasyonu, reaksiyonda PCR ürününün miktarıyla doğru orantılı olarak artan bir floresan raportör sinyalinin saptanması ve nicelenmesiyle izlenir. Floresan raportör, floresans algılayan bir termocycler olan RT-PCR makinesinden gelen ışıkla uyarılır ve her döngüde floresan emisyon miktarını kaydeder. Ek olarak, yüksek hassasiyeti nedeniyle, RT-PCR, hedef DNA'nın başlangıç konsantrasyonunu geniş bir dinamik aralıkta ve yüksek derecede bir hassasiyetle ölçebilir (Green and Sambrook, 2018).

Orak hücre anemili ve sağlıklı kontrollerden elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak miR-146, miR-326, miR-144, miR-150 gen ekspresyon düzeyleri RT-PCR

yöntemi ile saptanmıştır. RT-PCR deneyleri üretici talimatları doğrultusunda ticari kit (Mirxes) kullanılarak yapıldı. Housekeeping gen olarak U6 geni kullanıldı. Primer ise, ticari olarak (Mirxes) satın alındı. Spesifik olmayan ürünler ve primer-dimer varlığı, melting curve analizi yapılarak kontrol edildi. Deneyler üç tekrarlı yapıldı ve her örnek duplike çalışıldı. Deney sonuçları $2^{-\Delta CT}$ olarak verildi.

1. cDNA'yı 1:10 hacim olacak şekilde dilüe edildi (5µl cDNA:50 µl nükleaz içermeyen su).
2. Karışım vortekslendi.
3. Çizelge 3.5'e göre karışım hazırlayıp toplam hacim 20 µl olacak şekilde ayarlanarak vortekslendi.
4. Her örnek için çalışılan miRNA sayısı kadar PCR tüpü etiketlendi.
5. İçlerine 15 µl (master mix, su, miRNA assay) ve 5 µl dilüe edilmiş cDNA eklendi.
6. PCR plate'i 30 sn 200g'de santrifüj edildi.
7. Tüpler cihaza yerleştirilerek aşağıda belirtilen koşullarda inkübe edildi (Çizelge 3.7).

Çizelge 3. 5. RT-PCR reaksiyon hacimleri

Reagents	Eklenen Hacim/µl (96 well)	Eklenen Hacim/µl(384 well)
miRNA qPCR Master Mix	10	5
Nükleaz içermeyen su	3	1
miRNA qPCR Assay	2	1
Dilüe cDNA	5	3
Toplam Hacim	20	10

Çizelge 3. 6. RT-PCR reaksiyon döngüleri.

Döngü Sayısı	Sıcaklık °C	Zaman	Açıklama
1×	95	10 dk.	Polimeraz aktivasyonu
	40	5 dk.	
4×	95	10 sn.	Denatürasyon
	60	30 sn.	Kaynaşma ve uzama

3.6 Klinik ve Hematolojik Verilerin Toplanması

Hastaların anamnezleri ve fizik muayene bulguları kaydedildi. Yaş, cinsiyet, BMI gibi demografik bulguları; tam kan sayımı, hemoglobin elektroforezi ve fetal hemoglobin seviyeleri dahil olmak üzere laboratuvar sonuçları toplandı. Seçilen her hasta için boy (cm) ve ağırlık (kg) ölçüldü ve BMI hesaplandı ($BMI = \text{ağırlık} / (\text{boy})^2$ (Kg/m²)).

Çizelge 3.7’de yer alan parametrelere göre, ilgili bireysel puanlar kaydedilerek bir klinik fenotip skoru oluşturuldu (Mikobi ve ark. 2017). Bu kriterler, çalışma süresince hastane kayıtları esas alınarak belirlendi. Hastalar; asemptomatik klinik fenotip (skor≤5), ılımlı klinik fenotip (skor 6 ile 15 arasında) ve ağır klinik fenotip (skor≥16) olarak üç gruba ayrıldı.

Çizelge 3. 7. Fenotip skorlamasında kullanılan parametreler

Parametre	Değişken	Skor
Hospitalizasyon (gün/yıl)	<1	0
	2-7	2
	>8	5
Ağır VOK (yıl)	0	0
	1-2	2
	>3	5
Kan Transfüzyonu (yıl)	0	0
	1-2	2
	>3	5
Kalça Komplikasyonları	Yok	0
	Var	5
Bacak Ülseri	Yok	0
	Var	5
Hepatobiliyer Komplikasyonlar	Yok	0
	Kolesistektomi(+)	2
	Var	5
Nörolojik Olaylar	Yok	0
	Var	5
Renal Bozukluklar	Yok	0
	Var	5
BMI	19-27	0
	<19	2
Toplam	≤5: Asemptomatik	
	6-15: Ilımlı	
	≥16: Ağır	

3.7 İstatistiksel Analiz

Çalışma sonucunda elde edilen veriler SPSS 21,0 (Armonk, NY:IBM Corp.) paket 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 (Pearson, Yates düzeltmeli, Fisher's Exact ve çok gözlü düzenler için Pearson, Likelihood ratio), sürekli değişkenler için Student-t, Mann Whitney U, ANOVA ve Kruskal Wallis testleri kullanıldı. ANOVA sonrası ikili kıyas için LSD testi, Kruskal Wallis sonrası Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi yapıldı. Sürekli değişkenlerin ilişkisinin analizinde Spearman rank korelasyon katsayısı kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Hasta ve kontrol örneklerimizde Çizelge 4.1’de görüleceği üzere demografik verileri inceledik. Çalışmamıza 43 (%52,4) orak hücre anemi hastası ve 39 (%47,6) sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 82 birey dâhil edilmiştir. Grubun cinsiyet dağılımının %58,5’ini kadınlar oluştururken %41,5’ini de erkekler oluşturmuştur ve yaş ortalaması $33,12 \pm 9,73$ olarak bulunmuştur. Çizelgemizde görüldüğü üzere hasta ve kontrol grubumuzda yaş ve cinsiyet açısından istatistiksel farklılık yoktu ($p=0,856$, $p=0,330$).

Çizelge 4. 1. Hasta ve kontrol grupların demografik özellikleri.

Değişkenler	Gruplar				p
	Orak Hasta		Kontrol		
Cinsiyet	n (%)				
Kadın	23 (47,9)		25 (52,1)		0,33
Erkek	20 (58,8)		14 (41,2)		
Yaş	Ort ± SH	Min - Max	Ort ± SH	Min - Max	0,856
	32,44 ± 7,99	16 - 59	33,87 ± 11,41	19 - 69	
Pearson Chi Square, Mann Whitney U					

Çizelge 4.2’de, çalışmaya dâhil edilen hasta ve kontrol gruplarının tam kan sayımı parametreleri karşılaştırılmıştır. WBC, RBC, Hb, Hct, HbF düzeyleri iki grup arasında istatistiksel olarak önemli derecede anlamlı bulundu ($p<0,001$). MCV ve MCHC düzeyleri iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,012$, $p=0,028$). Bunun yanı sıra, MCH düzeyleri iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,059$).

Çizelge 4. 2. Hasta ve kontrol gruplarında tam kan sayımı parametre düzeylerinin karşılaştırılması.

Analitler	Grup				p
	Hasta (n=43)		Kontrol (n=39)		
	Ort±SH	Min-Maks	Ort±SH	Min-Maks	
WBC	10,99 ± 4,01	1,97 - 17,64	7,66 ± 1,65	4,49-11,94	<0,001
RBC	3,07 ± 0,82	1,54 - 4,89	4,78 ± 0,56	3,64-5,99	<0,001
Hb	9,21 ± 1,76	4,8 - 13,2	14,08 ± 2,00	9,4-18,20	<0,001
Hct	28,28 ± 5,02	15,6 - 39,1	42,04 ± 5,74	30,7-54,50	<0,001
MCV	95,12 ± 16,34	64,9 - 135,5	88,01 ± 8,33	70-125,00	0,012
MCH	31,02 ± 5,84	19,7 - 44	29,5 ± 3,17	20,5-41,80	0,059
MCHC	32,57 ± 2,18	25 - 39,7	33,49 ± 1,41	29,2-36,00	0,028
HbF	10,15 ± 7,21	1,1 - 32,9	0,47 ± 0,33	0-1,60	<0,001

Student-t ve Mann Whitney U

Çalışmaya dahil edilen hasta bireyler arasında yapılan fenotip sınıflaması sonucu üç grup ortaya çıktı (asemptomatik, ılımlı ve ağır). Hasta grubun tam kan sayımı parametreleri (WBC, RBC, Hb, Hct, MCV, MCH ve MCHC), fenotip sınıfları ile karşılaştırıldı (Çizelge 4.3). Hct düzeyleri ve üç grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,045). Bunun yanı sıra, WBC, RBC, Hb, MCV, MCH ve MCHC düzeyleri ve üç grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=0,431, p=0,327, p=0,061, p=0,051, p=0,379, p=0,352).

Çizelge 4. 3. Orak hücre anemisi hastalarında fenotip sınıflarına göre WBC, RBC, Hb, Hct ve eritrosit indisleri.

Analitler	Fenotip						p
	Aseptomatik (n=10)		İlımlı (n=14)		Ağır (n=19)		
	Ort±SH	Min-Max	Ort±SH	Min-Max	Ort±SH	Min-Max	
WBC	9,88± 5,01	3,27-17,30	10,62 ± 3,85	1,97-15,01	11,84± 3,57	4,42-17,64	0,431
RBC	3,397± 1,11	1,54-4,81	3,12± 0,66	2,19-4,28	2,85± 0,72	1,83-4,89	0,327
Hb	10,33± 2,51	4,8-13,20	8,72± 1,16	7,2-10,40	8,98± 1,46	6,3-11,20	0,061
Hct	31,46± 7,23	15,6-39,10	26,39± 2,79	21,1-31,80	28,01± 4,32	19,2-35,50	0,045
MCV	97± 21,85	69-135,50	86,67± 13,10	64,9-110,30	100,34±13,19	72,5-125,10	0,051
MCH	31,8± 7,39	21,7-44,00	28,80± 5,56	19,7-35,30	32,24± 4,91	23-40,60	0,379
MCHC	32,76± 0,97	31-33,90	33,07± 2,87	28,3-39,70	32,11± 2,06	25-35,30	0,352

ANOVA ve Kruskal Wallis

Çalışmaya dahil edilen hastaların fenotip grupları ile Hct düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p=0,045$). Üç grubun Hct ile ikili kıyaslanması Çizelge 4.4’de gösterilmiş olup asemptomatik grup ve ılımlı grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,014$).

Çizelge 4. 4. Orak hücre anemisi hastalarında fenotip sınıflarına göre Hct ikili kıyaslamaları.

Fenotip		<i>p</i>
Asemptomatik	Ilımlı	0,014
	Ağır	0,071
Ilımlı	Asemptomatik	0,014
	Ağır	0,340
Ağır	Asemptomatik	0,071
	Ilımlı	0,340

LSD Pairwise Comparison

Çalışmaya dahil edilen hasta grubunda yer alan üç fenotip sınıfı; nötrofil, lenfosit, monosit ve platelet düzeyleri ile karşılaştırıldı (Çizelge 4.5). Nötrofil, lenfosit, monosit ve platelet düzeyleri bakımından üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,467$, $p=0,943$, $p=0,348$, $p=0,139$).

Çizelge 4. 5. Fenotipe göre nötrofil, lenfosit, monosit ve PLT sayılarının karşılaştırılması

Fenotip		Neu	Lym	Mon	PLT
Asemptomatik (n=10)	Median	6,0450	2,8700	0,6650	309,0000
	Ort±SH	5,87± 3,19	3,05± 1,30	0,75± 0,50	374,1± 234,57
	Min-Maks	1,51- 11,02	1,48-4,64	0,22-1,65	110-794,00
Ilımlı (n=14)	Median	6,7200	3,2600	1,0200	533,0000
	Ort±SH	6,64± 2,26	3,18± 0,96	1,00± 0,45	566,92± 273,67
	Min-Maks	2,56-9,98	1,63-5,09	0,27-1,50	124-1139,00
Ağır (n=19)	Median	6,7200	3,3600	0,9500	590,0000
	Ort±SH	7,17± 2,61	3,18± 0,92	1,02± 0,51	629,89± 422,96
	Min-Maks	3,14-12,15	1,07-4,56	0,14-1,86	188-1974,00
<i>p</i>		0,467	0,943	0,348	0,139

ANOVA ve Kruskal Wallis

Çalışmaya dahil edilen hasta grubu; VOK sayısına göre üç ana gruba ayrıldı ve tam kan sayımı parametreleri ile karşılaştırıldı (Çizelge 4.6). WBC, RBC, Hb, Hct, MCV, MCH

ve MCHC değerleri üç grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,712$, $p=0,178$, $p=0,911$, $p=0,467$, $p=0,375$, $p=0,262$, $p=0,238$).

Çizelge 4. 6. VOK sayısı ile tam kan sayımı parametrelerinin karşılaştırılması

VOK Sayısı		WBC	RBC	Hb	Hct	MCV	MCH	MCHC
0 (n=8)	Median	11,00	2,73	9,20	26,75	96,65	31,55	33,55
	Ort±SH	10,87±4,93	2,88±0,94	9±2,54	27,01±6,99	96,55±18,39	31,97±6,03	33,13±1,86
	Min-Maks	4,35-17,30	1,54-4,74	4,8-13,20	15,6-39,10	78,4-135,50	23,6-44,00	30,1-35,70
1-2 (n=13)	Median	11,15	3,14	8,80	27,80	92,80	29,90	32,20
	Ort±SH	10,28±3,67	3,42±0,83	9,46±1,81	29,64±4,90	89,79±19,01	28,79±7,08	31,89±1,70
	Min-Maks	3,27-15,78	2,37-4,81	7,7-12,90	23,1-38,60	64,9-122,80	19,7-41,20	28,3-34,40
>3 (n=22)	Median	11,85	2,98	9,30	28,40	96,60	32,05	32,65
	Ort±SH	11,45±3,98	2,93±0,72	9,14±1,43	27,94±4,30	97,74±13,75	31,99±4,78	32,77±2,50
	Min-Maks	1,97-17,64	1,83-4,89	6,3-11,20	19,2-35,50	72,5-125,10	23-40,60	25-39,70
<i>p</i>		0,712	0,178	0,911	0,467	0,375	0,262	0,238

ANOVA ve Kruskal Wallis

Çalışmaya dahil edilen hasta grubu hidroksiüre ilacı kullanımına göre iki gruba ayrıldı ve bu grupların HbF düzeyleri birbiri ile karşılaştırıldı (Çizelge 4.7). Hidroksiüre kullanan ve hidroksiüre kullanmayan grupların HbF düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,025$).

Çizelge 4. 7. HU kullanımının HbF düzeyine etkisi

Hidroksiüre Kullanımı							
Hidroksiüre Kullanan				Hidroksiüre Kullanmayan			
	Ort ± SH	Median	N		Ort ± SH	Median	N
HbF	11,24 ± 7,64	11,40	32		5,95 ± 3,38	6,00	11
				<i>P</i>			
				0,025*			

Mann Whitney U

Çalışmaya dahil edilen hasta grubunda hidroksiüre ilaç kullanımının fenotip sınıflarına etkisi karşılaştırıldı (Çizelge 4.8). Hidroksiüre kullanan ve hidroksiüre kullanmayan iki grup ile üç fenotip grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,394$).

Çizelge 4. 8. HU kullanımının fenotip sınıflarına etkisi

Hidroksiüre					
enotip			Hidroksiüre Kullanan	Hidroksiüre Kullanmayan	Total
Aseptomatik	N	7 (21,9%)	3 (27,3%)	10(23,3%)	0,394
İlmlı	N	9 (28,1%)	5 (45,5%)	14(32,6%)	
Ağır	N	16 (50,0%)	3(27,3%)	19(44,2%)	
Total	N	32(100,0%)	11(100,0%)	43(100,0%)	

Ki-kare test

Çalışmaya dahil edilen hasta grup HbF seviyeleri ve fenotip sınıflarına göre karşılaştırılması Çizelge 4.9’da gösterildi. Aseptomatik, ilmlı ve ağır grup arasında HbF seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,014$).

Çizelge 4. 9. Fenotiplere göre HbF düzeylerinin kıyaslanması

Fenotip	HbF		<i>p</i>
	Ort±SH	Min-Maks	
Aseptomatik (n=10)	15,64 ± 10,43	1,9-32,90	0,014
İlmlı (n=14)	9,6 ± 5,14	1,1-19,90	
Ağır (n=19)	7,68 ± 4,92	1,4-16,70	

ANOVA

Çizelge 4.10’da, HbF düzeylerinin fenotip sınıflarına göre ikili kıyası yapıldı. Aseptomatik grup, ilmlı grupla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0,034$). Aseptomatik grup, ağır grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,004$). İlmlı grup, ağır grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,417$).

Çizelge 4. 10. Fenotip sınıfları arasında ikili kıyas.

Fenotip		<i>p</i>
Aseptomatik	İlmlı	0,034
	Ağır	0,004
İlmlı	Aseptomatik	0,034
	Ağır	0,417
Ağır	Aseptomatik	0,004
	İlmlı	0,417

LSD Pairwise Comparison

Çalışmaya dahil edilen hasta grubundaki olguların miRNA ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplandı. Hidroksiüre kullanan hastalar ve kullanmayan hastalar arasında miRNA seviyeleri değerlendirildi (Çizelge 4.11). miR-146, miR-326, miR-144, miR-150 iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,607$, $p=0,178$, $p=0,480$, $p=0,974$).

Çizelge 4.11. Hasta grupta HU kullanımı ve miRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.

Hidroksiüre					
	HU Kullanan (n=32)		HU Kullanmayan (n=11)		
	Ort $\pm$ SS	Median	Ort $\pm$ SS	Median	<i>p</i>
miR-146	0,21 $\pm$ 0,38	0,11	0,20 $\pm$ 0,29	0,12	0,607
miR-326	0,11 $\pm$ 0,25	0,01	0,15 $\pm$ 0,24	0,06	0,178
miR-144	1,66 $\pm$ 3,27	0,43	1,53 $\pm$ 2,18	0,01	0,480
miR-150	1,49 $\pm$ 2,43	0,36	0,97 $\pm$ 1,00	0,57	0,974

Mann-Whitney U

Hasta grubun, HbF seviyeleri ve miRNA ekspresyon düzeyleri arasında korelasyon analizi yapıldı (Çizelge 4.12). HbF ile miRNA (miR-146, miR-326, miR-144, miR-150) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,634$, $p=0,721$, $p=0,794$, $p=0,465$).

Çizelge 4. 12. HbF düzeyleri ve miRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.

Korelasyon					
	HbF	miR-146	miR-326	miR-144	miR-150
Korelasyon Katsayısı	1,000	0,079	-0,064	-0,046	-0,121
HbF <i>P</i>		0,634	0,721	0,794	0,465
N	43	39	34	35	39

Spearman's rho

HU kullanmayan hastaların, HbF seviyeleri ve miRNA ekspresyon düzeyleri arasında korelasyon analizi yapıldı (Çizelge 4.13). HbF ile miRNA (miR-146, miR-326,

miR-144, miR-150) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,751$, $p=0,406$, $p=0,61$, $p=0,777$).

Çizelge 4. 13. HU kullanmayanlarda HbF düzeyleri ve miRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması.

		HbF	miR-146	miR-326	miR-144	miR-150
HbF	Korelasyon katsayısı	1,000	0,115	-0,317	-0,214	0,103
	<i>p</i>		0,751	0,406	0,61	0,777
	N	11	10	9	8	10

Spearman's rho

Fenotip gruplarının miRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı (Çizelge 4. 14). miR-146, miR-326, miR-144 ve miR-150'nin ekspresyon seviyeleri üç grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,853$, $p=0,831$, $p=0,914$ $p=0,586$).

Çizelge 4. 14. Fenotiplere göre miRNA ekspresyon düzeylerinin kıyaslanması.

	Fenotip						<i>p</i>
	Aseptomatik		İlmlı		Ağır		
	Ort±SH	Median	Ort±SH	Median	Ort ±SH	Median	
miR-146	0,26 ± 0,41	0,12	0,11 ± 0,09	0,11	0,25 ± 0,44	0,08	0,853
miR-326	0,10 ± 0,24	0,01	0,06 ± 0,09	0,04	0,20 ± 0,34	0,02	0,831
miR-144	1,97 ± 4,12	0,62	1,79 ± 2,41	0,01	1,30 ± 3,04	0,20	0,914
miR-150	0,88 ± 1,56	0,32	1,29 ± 2,06	0,54	1,71 ± 2,57	0,35	0,586

Mann Whitney U test

Hasta ve kontrol grubunun miRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı (Çizelge 4. 15). miR-146'nin ekspresyon seviyeleri iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,232$). miR-326, miR-144 ve miR-150'nin ekspresyon seviyeleri iki grup arasında anlamlı bulundu ($p=0,004$, $p<0,001$, $p=0,004$).

Çizelge 4. 15. Hasta ve kontrol gruplarında miRNA ekspresyon düzeylerinin kıyaslanması.

	Hasta		Kontrol		<i>p</i>
	Ort ± SH	Median	Ort ± SH	Median	
miR-146	0,21± 0,36	0,11	0,43 ± 0,82	0,14	0,232
miR-326	0,12± 0,25	0,01	0,4 ± 0,63	0,11	0,004
miR-144	1,63± 3,03	0,31	5,35 ± 6,02	4,22	<0.001
miR-150	1,00± 1,53	0,36	1,72 ± 1,76	1,00	0,004

Mann Whitney U test

5. TARTIŞMA

Orak hücre hastalığı, beta globin genindeki mutasyonun neden olduğu ve yaşam beklentisinde önemli derecede azalmaya neden olan ciddi bir kalıtsal kan hastalığıdır. OHA, tekrarlayan iskemi-reperfüzyon epizodları ve buna bağlı olarak çok sayıda hayati organda lezyon gelişimi ve kronik hemolitik anemi ile karakterizedir. Tam olarak anlaşılmayan mekanizmalar nedeniyle hastalığın seyrinde fenotipik çeşitlilik görülür (Pecker ve Lanzkron 2021).

OHA en yaygın kalıtsal hastalıklardan biridir ve dünya çapında milyonları etkiler. Hb AS insidansı Türkiye'nin güneyindeki Çukurova bölgesinde (Adana, Hatay ve Mersin) yaklaşık %10.0'dır (Yuregir ve ark. 1995). Bölgemizde yaşayan Eti Türkü olarak adlandırılan etnik grupta taşıyıcılık insidansı %3-42 gibi büyük oranlar arasında değişkenlik göstermektedir (Aluoch ve ark. 1986, Yüregir ve ark. 1987). Hatay ili, Türkiye'de OHA'nın en sık görüldüğü yerlerden biridir. Bu sebeple OHA ilimiz için büyük bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır.

Bu tez çalışmasında OHA hastalarının ve sağlıklı kontrollerin kanlarında miRNA ekspresyon düzeyleri ölçülmüştür. Eritrositlerin miRNA ekspresyonu, retikülositlerin ve lökositlerinkinden farklıdır ancak tam kandaki miRNA ekspresyonunun çoğuna katkıda bulunur (Chen ve ark. 2008, Juzenas ve ark. 2017). Bu nedenle, bu çalışmada doğru sonuca ulaşabilmek için tam kan örneklerini analiz edilmiştir.

Mikobi ve arkadaşlarının çalışmalarında kullandığı klinik skorlama sistemine dayanarak fenotip sınıfları oluşturulmuştur ve hastalar asemptomatik, ılımlı, ağır olmak üzere üç gruba ayrılmıştır (Mikobi ve ark. 2017). miRNA ekspresyon düzeyleri; fenotip sınıfları ile karşılaştırılıp miRNA'ların potansiyel biyobelirteç olup olamayacağı araştırılmıştır. Ayrıca hastaların ve sağlıklı kontrollerin hematolojik parametreleri ölçülüp VOK sayısı, fenotip sınıfları gibi değişkenlerle karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda yer alan 43 kişilik hasta popülasyonu; birçok araştırmaya göre daha fazla olgu içermesi nedeniyle, elde edilen verilerin sağlıklı değerlendirilebilmesi için bir avantaj olabilir (Li ve ark. 2019). Hasta grubun ortalama yaşı 32,44 olarak belirlenmiştir; bu veri bize hasta survi açısından yüksek gelirli ülkelere benzer hasta popülasyonuna sahip olduğumuzu göstermiştir (Gardner ve ark. 2016). Yaşa bağlı değişiklikleri minimuma indirmek amacı ile sağlıklı kontroller, hasta grubun yaşlarına benzer olacak şekilde seçilmiştir ($p=0,856$, Çizelge 4.1).

Bu çalışmada, hasta ve kontrol gruplarında tam kan sayımı parametre düzeylerinin karşılaştırıldığında; WBC, RBC, Hb, Hct, HbF, MCV ve MCHC diğer çalışmalarla (Teixeira ve ark. 2017) paralel olarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. MCH değerleri ise iki grup arasında anlamlı farklı bulunmamıştır (Çizelge 4.2).

Mikobi ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada belirlediği klinik skorlama sistemine (Mikobi ve ark. 2017) dayanarak oluşturulan fenotip sınıfları arasında tam kan sayımı parametrelerini karşılaştırdığımızda, Hct dışında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Hct değerleri, fenotip sınıfları arasında anlamlı olarak farklı bulunmuştur ($p=0,045$, Çizelge 4.3). Hct'in yapılan ikili kıyas sonucu, asemptomatik ve ılımlı grup arasında anlamlı fark olduğu bulunmuştur ($p=0,014$) (Çizelge 4.4). Yapılan benzer bir çalışmada; farklı klinik parametrelerle oluşturulan fenotip sınıfları ve tam kan sayım parametreleri karşılaştırılmış ve bizim çalışmamızla uyumlu bir şekilde WBC, Hb, Hct, PLT düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Khalyfa ve ark. 2016).

Nötrofiller doğal bağışıklık sisteminin kritik bir bileşenidir. Dolaşımda en bol bulunan bağışıklık hücreleri olduklarından, istilacı patojenlere karşı bağışıklık koruması sağlarlar ama aynı zamanda inflamatuvar hastalıkları da destekleyebilirler (Nauseef ve Borregaard 2014). Nötrofillerin OHA patogeneze doğrudan katılabildiğine dair ilk kanıt, orak eritrositlerin in vitro olarak nötrofillere bağlandığı gözleminden gelir (Hofstra ve ark. 1996). Nötrofillerin başlangıçta klinik epidemiyolojik çalışmalarla OHA'da hastalık ilerlemesini teşvik ettiği öne sürülmüştür. OHA hastalarının hastalık şiddetinde nötrofil sayılarının belirgin farklılıklar gösterdiği bulunmuştur (Platt ve ark. 1991). Aynı ırka sahip hastalar arasında yapılan bir çalışmada; özellikle şiddetli klinik belirtileri olan hastalarda daha yüksek nötrofil sayıları gözlemlenmiştir (Anyaegebu ve ark. 1998). Yapılan çalışmalarda; ilginç bir şekilde, HU tedavisi, HbF'de saptanabilir bir artış sağlamazken, buna karşın HU tedavisine klinik olarak iyi yanıt veren tüm hastalarda nötrofil sayısı azalmıştır (Charache ve ark. 1996, Charache 1997, Saleh ve ark. 1999).

Trombositler, hemostaz için gereklidir ancak aynı zamanda inflamasyonu da destekleyebilir (Semple ve ark. 2011). OHA hastalarında klinik açıdan stabil durumda bile trombosit aktivasyonu yükselir, bu aktivasyon VOK sırasında daha da artar (Villagra ve ark. 2007). Aktive trombositler, orak eritrositlerin insan vasküler endoteliumuna yapışmasını trombospodin salgılayarak teşvik edebilir. Bu yolla, OHA'da tromboz ve pulmoner hipertansiyona katkıda bulunabilirler (Brittain ve ark. 1993, Villagra ve ark. 2007).

Trombositler ayrıca kümeler oluşturmak için eritrositlere, monositlere ve nötrofillere bağlanabilir ve klinik şiddeti daha arttırabilir (Zarbock ve ark. 2007).

Çalışmamızda nötrofil, lenfosit, monosit gibi bağışıklık sistemi bileşenleri ve trombositlerin OHA patogeneğinde etken olması sebebiyle; hastalığın klinik şiddeti üstündeki etkisi araştırıldı. Bu amaçla, fenotip sınıflarına göre nötrofil, lenfosit, monosit ve platelet sayıları karşılaştırılmış fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 4.5). HU tedavisinin kan hücrelerinin düzeyleri üzerindeki etkisi, çalışmamızın sonuçlarını etkilemiş olabilir. HU interferansını ortadan kaldırmak daha sağlıklı bir değerlendirme yapılmasını sağlayabilir.

OHA'da kronik vasküler inflamasyon; makrofajların, mast hücrelerinin ve trombositlerin salınmasına, multisellüler adezyona, endotel ve kan hücrelerinin aktivasyonuna neden olarak vazooklüzyon oluşturur (Kaul ve ark. 1989). Vazooklüziv kriz sayısı klinik şiddeti arttıran parametrelerden biridir. Yapılan bir çalışmada, hemoglobin konsantrasyonu, WBC, trombosit ve nötrofil sayısı gibi hematolojik parametrelerin ortalama değerleri; yılda 3 ve daha fazla VOK görülen hasta grubunda, yılda 0-2 VOK görülen hasta grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Ugwu ve ark. 2017). Ayrıca VOK patofizyolojisinde kan hücrelerinin önemli rol oynaması sebebiyle, bu çalışmada VOK sayısının tam kan sayımı parametreleri ile olan ilişkisini araştırılmış fakat anlamlı bir fark bulunamamıştır (Turhan ve ark. 2002, Zhang ve ark. 2016) (Çizelge 4.6).

Çalışma esnasında, hasta grupta bulunan 32 olgu HU tedavisi alırken 11 olgu HU tedavisi almıyordu. HU'nin HbF düzeylerini arttırdığı kanıtlanmış olsa da hangi mekanizma ile bu artışı gerçekleştirdiği tam anlamıyla açıklık kazanmamıştır (Lou ve ark. 2009). Yapılan bir çalışmada HU kullanımının HbF düzeylerine etkisi olmadığı gözlemlenmiş (Teixeira ve ark. 2017) olsa da, çalışmamızda; hasta grupta, HU kullanımı HbF düzeyleri ile karşılaştırıldığında, bir çok çalışmaya paralel olarak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,025$, Çizelge 4.7) (Mabaera ve ark. 2008, Ware 2010).

Yapılan çalışmalarda HU'nin hospitalizasyonu, VOK sayısını, AGS'nu, transfüzyon ihtiyacını, inme riskini ve kronik böbrek hastalığı riskini azalttığı gösterilmiştir (Charache ve ark. 1995, Wang ve ark. 2011). Diğer bir çalışmada; HU kullanımının hospitalizasyon gün sayısı, kan transfüzyon sıklığı, AGS sayısı gibi parametrelere etkisi gösterilememiştir (Teixeira ve ark. 2017). Bizim çalışmamızda HU kullanımının fenotip sınıflarına göre kullanım oranları karşılaştırıldı ancak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Çizelge 4.8).

Çalışmamızda yaptığımız fenotip sınıflandırmasında VOK, transfüzyon sıklığı, hospitalizasyon gün sayısı gibi diğer araştırmalarda HU'nin iyileştirdiği kanıtlanan kriterler olmasına rağmen; fenotip sınıflarına etkisi olduğu gözlemlenememiştir. HU; çoğu hastada HbF düzeylerini artırmasına rağmen, orak eritrositlerde dağılımı heterojendir. Bu yüzden tedaviden tüm eritrositler aynı şekilde fayda göremez (Telen 2016). Steinberg ve ark.'ı (2014), toplam HbF seviyelerinin pansellüler dağılımla %30'a ulaştığı takdirde, OHA'nın fenotipik tedavisinin sağlanabileceğini öne sürmüşlerdir (Steinberg ve ark. 2014). Çalışmamızdan çıkan sonuçlar ışığında, HU'nin çoklu faydaları olmasına karşın her hastada aynı klinik iyileşme yanıtını göstermeyebileceği kanaatine varıldı.

HbF konsantrasyonu, orak hücre hastalığında klinik seyrin ana genetik modifikatörüdür. HbF'in yüksek seviyeleri, HbS'in hücre içi polimerizasyonunu engellemek suretiyle, vazooklüziv ve hemolitik komplikasyonları azaltarak sağkalımı artırır (Powars ve ark. 1984). Bu çalışmada, HbF düzeyinin OHA hastalığı üzerindeki klinik iyileştirici etkisini belirlemek için fenotip sınıflarına göre HbF düzeyleri kıyaslandı (Çizelge 4.9). Asemptomatik, ılımlı ve ağır grup arasında HbF seviyeleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,014$). İkili kıyas yapıldığında ise asemptomatik grubun HbF düzeyleri, ılımlı ve ağır gruba göre anlamlı derecede yüksekti ($p=0,034$, $p=0,004$, Çizelge 4.10). Bu sonuçlar bize yapılan diğer çalışmalara benzer şekilde HbF düzeylerinin klinik seyre etkili olduğunu göstermiştir. Hastalığın daha hafif seyrettiği asemptomatik grupta da, HbF düzeyleri belirgin olarak artmış olduğu gözlemlenmiştir.

Tolu ve ark.'nın yaptığı çalışmada, HbF seviyeleri ile komplikasyon sayısı arasında bir korelasyon bulunamamıştır. Kalıtsal olarak yüksek HbF seviyelerinin, hatta %30'a varan oranlarda bile OHA ile ilgili komplikasyonları tamamen ortadan kaldırmadığını, ancak sadece başlangıçlarını geciktirebileceğini ve/veya şiddetini azaltabileceğini kanaatine varılmıştır. Diğer yandan, eritrosit içindeki HbF dağılımının, değerlendirilen hastaların çoğunda heterosellüler olduğu ve birçoğunun yaşam boyu HbF'i %30 düzeylerinde fazla sürdüremediğidir (Tolu ve ark. 2020). Çalışmamızda; hasta grupta yer alan, HbF düzeyleri %30'dan yüksek sadece iki olgu bulunmakta idi. Bu iki olgunun da asemptomatik grupta yer alması, yapılan diğer çalışmaları destekler nitelikteydi.

On hasta ile yapılan bir çalışmada, HU'nin indüklediği miR-210 gibi bazı miRNA'ların HbF düzeyini arttırdığı bildirilmiştir (Sawant ve ark. 2016). Çalışmamızda; hasta grupta HU kullanımı, miRNA ekspresyon seviyeleri ile karşılaştırıldı (Çizelge 4.11).

miR-146, miR-326, miR-144, miR-150 iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,607$, $p=0,178$, $p=0,480$, $p=0,974$).

Bu çalışmada araştırılan miRNA'lar; miR-146, miR-326, miR-144, miR-150'in, γ globin sentezini inhibe etmek veya inhibisyonunu ortadan kaldırmak suretiyle HbF düzeylerini etkilediği gösterilmiştir (Saki ve ark. 2016, Li ve ark. 2018, Li ve ark. 2019). Çalışmamızda; HU kullanan ve kullanmayan hasta gruplarının HbF seviyeleri ve miRNA ekspresyon düzeyleri arasında korelasyon araştırıldı, anlamlı fark bulunamadı ($p=0,634$, $p=0,721$, $p=0,794$, $p=0,465$, Çizelge 4.12). Bu sonucun çalışma grubunda yer alan hastaların çoğunluğu HU kullanmasından doğan, HU interferansı olduğu düşünüldü ve daha sağlıklı sonuçlar elde edilebilmesi için bu karşılaştırma HU kullanmayanlar arasında da yapıldı fakat anlamlı fark bulunamadı ($p=0,751$, $p=0,406$, $p=0,61$, $p=0,777$, Çizelge 4.13).

Literatürde, OHA hastalığında genotip ve fenotip arasındaki ilişkiyi araştıran çalışma sayısı çok azdır. Şimdiye kadar miRNA ekspresyon seviyelerinin klinik fenotiplere etkisini ele alan, bizim çalışmamıza benzer tek çalışma olduğu tespit edilmiştir. HU kullanmayan ve akut epizotta olmayan OHA hastası çocuklar (8-16 yaş) arasında yapılmış olan araştırmada vakalar klinik olarak ılımlı, intermediate ve ağır olarak belirlenmiştir. Olguların eksozomal miRNA profilinin sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, ağır grubun ($n=8$) ılımlı gruptan ($n=8$) farklı olduğu bulunmuştur. Üç miRNA çeşidi ağır grupta fazla eksprese edilirken, 141 miRNA çeşidi ılımlı grupta daha fazla eksprese edilmiştir. Diğer hematolojik parametrelerde (WBC, PLT, Hb, HbF, retikülosit sayısı, Hct), bizim çalışmamıza benzer şekilde üç grup arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Khalyfa ve ark. 2016).

Eritropoez; hematopoetik kök hücre popülasyonunun farklılaşmasını içeren, sinyal yolları, transkripsiyon faktörleri ve miRNA'lar dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden etkilenen çok adımlı bir süreçtir. miRNA'lar, çoklu genlerin transkripsiyon sonrasında yer alan karmaşık yollarını kontrol ederek eritropoezi düzenler. Hematopoetik kök hücrelerden matür eritrositlerin gelişiminde miRNA'lar, farklılaşma aşamasına bağlı olarak değişik şekillerde eksprese edilir ve HbF üretiminde önemli olan transkripsiyon faktörleri üzerinde etkilidirler (Svasti ve ark. 2010). HbSS nedeniyle eritrositler, HbAA eritrositlerinden daha gençtir ve ömürleri daha kısadır, bu yüzden miRNA ekspresyon paternlerinde farklılık görülmesi olasıdır. Daha önceki çalışmalarda, normal ve orak eritrositler arasındaki miRNA havuzunda dikkate değer bir farklılık gösterilmiştir (Chen ve ark. 2008). Bizim çalışmamızda; hasta ve kontrol grubunun miRNA ekspresyon düzeyleri

karşılaştırıldı (Çizelge 4. 15). miR-146'nin ekspresyon seviyeleri iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,232$). miR-326, miR-144 ve miR-150'nin ekspresyon seviyeleri iki grup arasında anlamlı bulunmuştur ($p=0,004$, $p<0.001$, $p=0,004$).

Şu anki bilgimizle; miR-326 ve OHA'nın ilişkisini belirleyen herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bizim çalışmamız minvalinde yapılan tek çalışmada; miR-326'nin, insan eritroid hücrelerinde EKLF'yi hedefleyerek HbF sentezini düzenlediği ve fizyolojik miR-326 seviyelerinin, γ globin ekspresyonunu azaltarak sağlıklı insanlarda globin geçişini sağladığı belirtilmiştir (Li ve ark. 2018). Aynı çalışmada; retikülositlerde artan miR-326 ekspresyonunun, β -talasemi majör hastalarında HbF seviyesi ile pozitif korelasyon gösterdiği fakat sağlıklı kontrollerde herhangi bir korelasyon gözlenmediği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda; hasta grupta HbF seviyeleri ve miR-326 ekspresyon düzeyleri arasında korelasyon bulunmamasına rağmen hasta grupta miR-326, sağlıklı kontrollere göre daha az eksprese olmuştur ($p=0,004$, Çizelge 4.15). Bu veri ağır fenotipe sahip hasta sayısının çokluğuna ($n=19$) ve düşük HbF seviyelerine işaret edebilir. Çalışma sayısı çok kısıtlı olduğu için sağlıklı değerlendirme yapılması adına daha fazla çalışma yapılmalıdır.

Artmış miR-144 ekspresyonu, NRF2'nin ekspresyon düzeylerini azalttığı araştırmalarda öne sürülmüştür. NRF2'nin ekspresyon düzeylerinin azalması, orak eritrositlerin glutatyon seviyelerinde, antioksidan kapasitelerinde ve oksidatif stres toleranslarında azalmaya yol açar (Chen ve ark. 2008, Sangokoya ve ark. 2010, LaMonte ve ark. 2012). Chen ve ark. yaptığı bir araştırmada; HbAA eritrositler ile karşılaştırıldığında HbSS eritrositlerde, miR-144 ekspresyon düzeyleri belirgin yüksek saptanmıştır (2008). Bizim çalışmamızda ise hasta grubun miR-144 ekspresyon düzeyleri, kontrol gruba göre belirgin azalmıştı ($p<0.001$, Çizelge 4.15). HU'nin miRNA ekspresyon düzeylerine etkisini araştıran bir çalışmada; miR-144 seviyeleri, HU kullanımı ile ilişkili bulunmuştur. Bir hastanın HU almaya başlamadan önceki miR-144 düzeyleri, HU aldıktan sonraki düzeylerinden yüksek bulunmuştur (Mnika ve ark., 2019). Mnika ve ark.'nın (2019) yaptığı çalışmaya dayanarak; hasta grubun büyük çoğunluğunun ($n=32$) HU kullanmasından dolayı, HU'nin hasta grupta miR-144 ekspresyon seviyelerini azaltabileceği kanaatine varıldı.

Kök hücreler, kendine benzeyen hücreler yapabilen, farklı seride hücreler oluşturabilen hiç değişime uğramamış veya çok az farklılaşmış ana hücrelerdir. Kemik iliğinde yer alan hematopoetik kök hücreler uygun koşullar ve uyaranlar altında kanda yer alan lenfositler, miyelositler ve trombositler hücre hatlarını oluştururlar. Yapılan bir

çalışmada; saflaştırılmış insan göbek kordonu kanında, miR-150'nin eritroid progenitörlerine göre megakaryosit-eritroid progenitör hücrelerde ve megakaryosit progenitörlerinde daha fazla eksprese edildiği bulunmuştur (Lu ve ark. 2008). Ayrıca, miR-150'nin megakaryosit oluşumunu desteklediği; miR-150'nin aşırı ekspresyonunun megakaryositlerde 415 kat artış ve eritroid progenitör hücrelerinde %60 azalma ile sonuçlanan hücre kültürü deneylerinden elde edilen verilerle de desteklenmiştir. Buna karşılık, antagomiR uygulaması miR-150'nin fonksiyon kaybı tetiklenmiş ve megakaryosit oluşumu azalmıştır. Birlikte, bu sonuçlar, miR-150'nin megakaryosit-eritroid progenitör hücrelerde soy belirlemesini teşvik etmek için önemli bir molekül olduğunu göstermektedir. Ayrıca, hızlı eritropoezin gerekli olduğu fenilhidrazin ile indüklenen akut anemi sırasında miR-150 seviyesi çarpıcı bir şekilde azalmış, bu veri de miR-150 ekspresyonunun fizyolojik ortam tarafından düzenlendiğini düşündürmüştür (Lu ve ark. 2008). β -talasemi hastalarında yapılan bir çalışmada; stres eritropoezinde olduğu gibi, eritroid progenitör hücrelerin anemiyi telafi etmek için artışı ve miR-150 seviyeleri ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Talasemi hasta grubuna oranla, sağlıklı bireylerin oluşturduğu kontrol grupta daha yüksek miktarda miR-150'nin eksprese olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, hasta grupta daha düşük miR-150 seviyeleri, anemiyi kompanse etmek için eritroid progenitör üretimini arttırdığı çıkarımı yapılmıştır (Hojjati ve ark. 2017). OHA ve miR-150 ilişkisini araştıran şu anki bilgimize göre herhangi bir çalışma yayınlanmamıştır. Bizim çalışmamızda da, Hojjati ve ark.'na (2017) benzer şekilde sağlıklı kontrol grubuna oranla hasta grupta miR-150 ekspresyon seviyeleri daha düşük bulunmuştur ($p=0,004$, Çizelge 4.15). Bu veri bize, eritroid progenitör hücreleri arttırmak amacı ile hasta grupta, miR-150 ekspresyon düzeylerinin düşmüş olabileceğini düşündürmüştür.

6. SONUÇ

Sonuç olarak; bu çalışmada miR-326, miR-144 ve miR-150'nin hasta grupta, sağlıklı kontrollere göre daha az eksprese olduğunu bulduk. Günümüze kadar, özellikle miR-326 ve miR-150 ile OHA arasındaki ilişkiyi irdeleyen çalışma yapılmamış olması bizim araştırmamızın özgünlüğünü desteklemektedir. Bu gözlemler, miRNA'ların OHA patofizyolojisinde karmaşık düzenleyici yollara katkıda bulunabileceğini ve klinik heterojenitenin tanımlanmasına yardımcı olabileceğini göstermektedir. miRNA ekspresyon profillerinin; komplikasyon riskini ve hastalık şiddetini tanımlama becerilerimizi geliştirmesi muhtemeldir.

Bunun yanı sıra çalışmamızda; HU kullanan hastalarda HbF düzeylerinin anlamlı derecede yüksek olduğunu gözlemlendi. Bu veriler bize HU'nin HbF düzeylerine olan etkisini gösterdi. Ayrıca, asemptomatik grupta, ağır ve ılımlı gruba göre daha yüksek HbF düzeyleri tespit edildi. Bu bulgular ışında klinik şiddeti belirleyen ana unsurlardan birinin HbF düzeyleri olduğu tespit edildi.

HU tedavisi; çalışmamızda kullanılan farklı parametrelerin düzeylerini etkilediği için gelecek çalışmalarda HU interferansının dikkate alınması gerekmektedir.

Kısıtlı olan tedavi seçeneklerinin yan etki potansiyelini en aza indirmek amacı ile akılcı yaklaşımlar benimsenmelidir. OHA gibi hastalıkların moleküler tanısı konulduğu anda genotip-fenotip arasındaki ilişkiyi açığa çıkaracak testler yapılmalıdır. Bizim çalışmamız minvalinde, fazla olgu ile yapılan araştırmalar; miRNA/hedef mRNA ağlarının tam olarak tanımlanmasına izin vererek yeni teşhis ve prognostik belirteçlerin yanı sıra yeni terapötiklerin tasarlanmasını sağlayacaktır. miRNA antisens teknolojisine veya miRNA taklitlerine dayalı yaklaşımlar ile HbF indüksiyonu; orak hücreli anemide olası bir terapötik seçenek olarak gelecek vadetmektedir. Bireysel tedavi planlanması ve gereksiz müdahalelerin engellenmesi için, hastalık seyrinin belirlenmesi ön plana çıkmalıdır.

Çalışmamızdaki Kısıtlılıklar:

HU tedavisi; çalışmamızda kullanılan farklı parametrelerin düzeylerini etkilemektedir. Bu çalışmanın kısıtlılıklarından biri de, HU kullanmayan popülasyondaki bireylerin sayısının azlığıdır.

Çalışılan miRNA'ların ilgili hedef genin ekspresyon analizlerinin bütçe yetersizliğinden dolayı yapılamamış olması çalışmamızın önemli kısıtlılıklarından biridir. Aynı şekilde bütçe yetersizliği nedeniyle gerçekleştirilemeyen miRNA mimikleri ve anti-miR uygulamaları ile miRNA yolaklarının sağlamalı olarak belirlenmesi, hastalık fizyopatolojisindeki miRNA'ların rollerinin anlaşılmasında önemli katkı sağlayacaktır.



7 KAYNAKLAR

1. **Ahmed MH, Ghatge MS, Safo MK.** Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. *Subcell Biochem*, **2020**, 94: s.345-382
2. **Aidoo M, Terlouw DJ, Kolczak MS, McElroy PD, ter Kuile FO ve ark.** Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet*, **2002**, 359(9314): s.1311-1312
3. **Ali T, Grote P.** Beyond the RNA-dependent function of LncRNA genes. *Elife*, **2020**, 9
4. **Alli N, Coetzee M, Louw V, van Rensburg B, Rossouw G ve ark.** Sickle cell disease in a carrier with pyruvate kinase deficiency. *Hematology*, **2008**, 13(6): s.369-372
5. **ALLISON AC.** Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *Br Med J*, **1954**, 1(4857): s.290-294
6. **Aluoch JR, Kilinç Y, Aksoy M, Yüregir GT, Bakioglu I ve ark.** Sickle cell anaemia among Eti-Turks: haematological, clinical and genetic observations. *Br J Haematol*, **1986**, 64(1): s.45-55
7. **Anyaegbu CC, Okpala IE, Akren'Ova YA, Salimonu LS.** Peripheral blood neutrophil count and candidacidal activity correlate with the clinical severity of sickle cell anaemia (SCA). *Eur J Haematol*, **1998**, 60(4): s.267-268
8. **Ardekani AM, Naeini MM.** The Role of MicroRNAs in Human Diseases. *Avicenna J Med Biotechnol*, **2010**, 2(4): s.161-179
9. **Arese P, Turrini F, Schwarzer E.** Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell Physiol Biochem*, **2005**, 16(4-6): s.133-146
10. **Arroyo JP, Kahle KT, Gamba G.** The SLC12 family of electroneutral cation-coupled chloride cotransporters. *Mol Aspects Med*, **2013**, 34(2-3): s.288-298
11. **Ataga KI, Kutlar A, Kanter J, Liles D, Cancado R ve ark.** Crizanlizumab for the Prevention of Pain Crises in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*, **2017**, 376(5): s.429-439
12. **Azzouzi I, Moest H, Winkler J, Fauchère JC, Gerber AP ve ark.** MicroRNA-96 directly inhibits γ -globin expression in human erythropoiesis. *PLoS One*, **2011**, 6(7): s.e22838
13. **Bauer DE, Brendel C, Fitzhugh CD.** Curative approaches for sickle cell disease: A review of allogeneic and autologous strategies. *Blood Cells Mol Dis*, **2017**, 67: s.155-168
14. **Bize I, Taher S, Brugnara C.** Regulation of K-Cl cotransport during reticulocyte maturation and erythrocyte aging in normal and sickle erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, **2003**, 285(1): s.C31-38
15. **Bookchin RM, Ortiz OE, Lew VL.** Evidence for a direct reticulocyte origin of dense red cells in sickle cell anemia. *J Clin Invest*, **1991**, 87(1): s.113-124
16. **Brittain HA, Eckman JR, Swerlick RA, Howard RJ, Wick TM.** Thrombospondin from activated platelets promotes sickle erythrocyte adherence to human microvascular endothelium under physiologic flow: a potential role for platelet activation in sickle cell vaso-occlusion. *Blood*, **1993**, 81(8): s.2137-2143
17. **Bruchova-Votavova H, Yoon D, Prchal JT.** miR-451 enhances erythroid differentiation in K562 cells. *Leuk Lymphoma*, **2010**, 51(4): s.686-693
18. **Brugnara C.** Sickle cell dehydration: Pathophysiology and therapeutic applications. *Clin Hemorheol Microcirc*, **2018**, 68(2-3): s.187-204
19. **Bunn HF.** Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med*, **1997**, 337(11): s.762-769
20. **Bunn HF, Briehl RW.** The interaction of 2,3-diphosphoglycerate with various human hemoglobins. *J Clin Invest*, **1970**, 49(6): s.1088-1095
21. **Byon JC, Papayannopoulou T.** MicroRNAs: Allies or foes in erythropoiesis? *J Cell Physiol*, **2012**, 227(1): s.7-13

22. **Cahalan SM, Lukacs V, Ranade SS, Chien S, Bandell M ve ark.** Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volume. *Elife*, **2015**, 4
23. **Camus SM, De Moraes JA, Bonnin P, Abbyad P, Le Jeune S ve ark.** Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vasoocclusions in sickle cell disease. *Blood*, **2015**, 125(24): s.3805-3814
24. Canatan D (2003). Orak hücre anemisi. XXX. Ulusal Hematoloji Kongresi, İstanbul-Türkiye.
25. **Charache S.** Mechanism of action of hydroxyurea in the management of sickle cell anemia in adults. *Semin Hematol*, **1997**, 34(3 Suppl 3): s.15-21
26. **Charache S, Barton FB, Moore RD, Terrin ML, Steinberg MH ve ark.** Hydroxyurea and sickle cell anemia. Clinical utility of a myelosuppressive "switching" agent. The Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *Medicine (Baltimore)*, **1996**, 75(6): s.300-326
27. **Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB ve ark.** Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med*, **1995**, 332(20): s.1317-1322
28. **Chen SY, Wang Y, Telen MJ, Chi JT.** The genomic analysis of erythrocyte microRNA expression in sickle cell diseases. *PLoS One*, **2008**, 3(6): s.e2360
29. **Chen YA, Aravin AA.** Non-Coding RNAs in Transcriptional Regulation: The review for. *Curr Mol Biol Rep*, **2015**, 1(1): s.10-18
30. **Cobb M.** Who discovered messenger RNA? *Curr Biol*, **2015**, 25(13): s.R526-532
31. **Collaborators GMAcOD.** Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, **2015**, 385(9963): s.117-171
32. **Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S ve ark.** Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science*, **2010**, 330(6000): s.55-60
33. **Dahm R.** Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Dev Biol*, **2005**, 278(2): s.274-288
34. **Darbari DS, Onyekwere O, Nouraie M, Minniti CP, Luchtman-Jones L ve ark.** Markers of severe vaso-occlusive painful episode frequency in children and adolescents with sickle cell anemia. *J Pediatr*, **2012**, 160(2): s.286-290
35. **Darbari DS, Sheehan VA, Ballas SK.** The vaso-occlusive pain crisis in sickle cell disease: Definition, pathophysiology, and management. *Eur J Haematol*, **2020**, 105(3): s.237-246
36. **Davila J, Manwani D, Vasovic L, Avanzi M, Uehlinger J ve ark.** A novel inflammatory role for platelets in sickle cell disease. *Platelets*, **2015**, 26(8): s.726-729
37. **Demirci S, Uchida N, Tisdale JF.** Gene therapy for sickle cell disease: An update. *Cytotherapy*, **2018**, 20(7): s.899-910
38. **Dominical VM, Samsel L, Nichols JS, Costa FF, McCoy JP ve ark.** Prominent role of platelets in the formation of circulating neutrophil-red cell heterocellular aggregates in sickle cell anemia. *Haematologica*, **2014**, 99(11): s.e214-217
39. **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: s.952
40. **Dragomir M, Mafra ACP, Dias SMG, Vasilescu C, Calin GA.** Using microRNA Networks to Understand Cancer. *Int J Mol Sci*, **2018**, 19(7)
41. **Embury SH, Clark MR, Monroy G, Mohandas N.** Concurrent sickle cell anemia and alpha-thalassemia. Effect on pathological properties of sickle erythrocytes. *J Clin Invest*, **1984**, 73(1): s.116-123
42. **Embury SH, Dozy AM, Miller J, Davis JR, Kleman KM ve ark.** Concurrent sickle-cell anemia and alpha-thalassemia: effect on severity of anemia. *N Engl J Med*, **1982**, 306(5): s.270-274
43. **Esteghamat F, Gillemans N, Bilic I, van den Akker E, Cantù I ve ark.** Erythropoiesis and globin switching in compound Klf1::Bcl11a mutant mice. *Blood*, **2013**, 121(13): s.2553-2562
44. **Galkin O, Vekilov PG.** Mechanisms of homogeneous nucleation of polymers of sickle cell anemia hemoglobin in deoxy state. *J Mol Biol*, **2004**, 336(1): s.43-59

45. **Gardner K, Douiri A, Drasar E, Allman M, Mwirigi A ve ark.** Survival in adults with sickle cell disease in a high-income setting. *Blood*, **2016**, 128(10): s.1436-1438
46. **Gardos G.** The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, **1958**, 30(3): s.653-654
47. **Gazouli M, Katsantoni E, Kosteas T, Anagnou NP.** Persistent fetal gamma-globin expression in adult transgenic mice following deletion of two silencer elements located 3' to the human Agamma-globin gene. *Mol Med*, **2009**, 15(11-12): s.415-424
48. **Ge J, Li W, Zhao Q, Li N, Chen M ve ark.** Architecture of the mammalian mechanosensitive Piezo1 channel. *Nature*, **2015**, 527(7576): s.64-69
49. **Gebetsberger J, Polacek N.** Slicing tRNAs to boost functional ncRNA diversity. *RNA Biol*, **2013**, 10(12): s.1798-1806
50. **Ginder GD.** Epigenetic regulation of fetal globin gene expression in adult erythroid cells. *Transl Res*, **2015**, 165(1): s.115-125
51. **Gladwin MT, Ofori-Acquah SF.** Erythroid DAMPs drive inflammation in SCD. *Blood*, **2014**, 123(24): s.3689-3690
52. **Gnanasambandam R, Bae C, Gottlieb PA, Sachs F.** Ionic Selectivity and Permeation Properties of Human PIEZO1 Channels. *PLoS One*, **2015**, 10(5): s.e0125503
53. **Goldberg MA, Husson MA, Bunn HF.** Participation of hemoglobins A and F in polymerization of sickle hemoglobin. *J Biol Chem*, **1977**, 252(10): s.3414-3421
54. **Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R.** Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, **2005**, 123(4): s.631-640
55. **Hahn Ev, Gillespie Eb.** SICKLE CELL ANEMIA: REPORT OF A CASE GREATLY IMPROVED BY SPLENECTOMY. EXPERIMENTAL STUDY OF SICKLE CELL FORMATION. *Archives of Internal Medicine*, **1927**, 39(2): s.233-254
56. **Hakimzadeh N, Nossent AY, van der Laan AM, Schirmer SH, de Ronde MW ve ark.** Circulating MicroRNAs Characterizing Patients with Insufficient Coronary Collateral Artery Function. *PLoS One*, **2015**, 10(9): s.e0137035
57. **Hassell KL.** Population estimates of sickle cell disease in the U.S. *Am J Prev Med*, **2010**, 38(4 Suppl): s.S512-521
58. **Hebbel RP.** The sickle erythrocyte in double jeopardy: autoxidation and iron decompartmentalization. *Semin Hematol*, **1990**, 27(1): s.51-69
59. **Hebbel RP.** Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology. *Blood*, **1991**, 77(2): s.214-237
60. **Hebbel RP.** Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. *J Clin Invest*, **1997**, 100(11 Suppl): s.S83-86
61. **Herrick JB.** Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. 1910. *Yale J Biol Med*, **2001**, 74(3): s.179-184
62. **Hofstra TC, Kalra VK, Meiselman HJ, Coates TD.** Sickle erythrocytes adhere to polymorphonuclear neutrophils and activate the neutrophil respiratory burst. *Blood*, **1996**, 87(10): s.4440-4447
63. **Hojjati MT, Azarkeivan A, Pourfathollah AA, Amirizadeh N.** Comparison of MicroRNAs Mediated in Reactivation of the gamma-Globin in beta-Thalassemia Patients, Responders and Non-Responders to Hydroxyurea. *Hemoglobin*, **2017**, 41(2): s.110-115
64. **Hoover R, Rubin R, Wise G, Warren R.** Adhesion of normal and sickle erythrocytes to endothelial monolayer cultures. *Blood*, **1979**, 54(4): s.872-876
65. **Hoppe CC.** Prenatal and newborn screening for hemoglobinopathies. *Int J Lab Hematol*, **2013**, 35(3): s.297-305
66. **Hsieh MM, Fitzhugh CD, Tisdale JF.** Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease: the time is now. *Blood*, **2011**, 118(5): s.1197-1207
67. **Hsieh MM, Kang EM, Fitzhugh CD, Link MB, Bolan CD ve ark.** Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for sickle cell disease. *N Engl J Med*, **2009**, 361(24): s.2309-2317
68. **Hüttenhofer A, Schattner P, Polacek N.** Non-coding RNAs: hope or hype? *Trends Genet*, **2005**, 21(5): s.289-297

69. **İnal G, Arpacı A** (2021). Orak Hücre Anemisinin Moleküler ve Hücresel Patofizyolojisi, *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*. **19**: 089-098.
70. **Jain S, Bakshi N, Krishnamurti L**. Acute Chest Syndrome in Children with Sickle Cell Disease. *Pediatr Allergy Immunol Pulmonol*, **2017**, 30(4): s.191-201
71. **Jameson J, A.S. F, D.L. K, S.L. H, D.L. L ve ark**. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 20. McGraw Hill, **2018**,
72. **JF GA, HMJ, T SD, al. e**. *An Introduction to Genetic Analysis*. 7. W. H. Freeman, New York, **2000**,
73. **Joiner CH RR, Jiang M, Franco RS**. Activation of KCl cotransport by urea induces dehydration in both sickle and normal reticulocytes. *Blood*, **2004**, 104(11): s.3591-3591
74. **Juzenas S, Venkatesh G, Hübenthal M, Hoepfner MP, Du ZG ve ark**. A comprehensive, cell specific microRNA catalogue of human peripheral blood. *Nucleic Acids Res*, **2017**, 45(16): s.9290-9301
75. **Kapoor S, Little JA, Pecker LH**. Advances in the Treatment of Sickle Cell Disease. *Mayo Clin Proc*, **2018**, 93(12): s.1810-1824
76. **Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K ve ark**. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Primers*, **2018**, 4: s.18010
77. **Kato GJ, Steinberg MH, Gladwin MT**. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *J Clin Invest*, **2017**, 127(3): s.750-760
78. **Kaufman MB**. Pharmaceutical Approval Update. *P T*, **2017**, 42(10): s.620-621
79. **Kaul DK, Fabry ME, Nagel RL**. Microvascular sites and characteristics of sickle cell adhesion to vascular endothelium in shear flow conditions: pathophysiological implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1989**, 86(9): s.3356-3360
80. **Khalyfa A, Khalyfa AA, Akbarpour M, Connes P, Romana M ve ark**. Extracellular microvesicle microRNAs in children with sickle cell anaemia with divergent clinical phenotypes. *Br J Haematol*, **2016**, 174(5): s.786-798
81. **Kuypers FA**. Hemoglobin s polymerization and red cell membrane changes. *Hematol Oncol Clin North Am*, **2014**, 28(2): s.155-179
82. **LaMonte G, Philip N, Reardon J, Lacsina JR, Majoros W ve ark**. Translocation of sickle cell erythrocyte microRNAs into Plasmodium falciparum inhibits parasite translation and contributes to malaria resistance. *Cell Host Microbe*, **2012**, 12(2): s.187-199
83. **Landburg PP, Teerlink T, Biemond BJ, Brandjes DP, Muskiet FA ve ark**. Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in sickle cell disease are related to the hemolytic phenotype. *Blood Cells Mol Dis*, **2010**, 44(4): s.229-232
84. **Lauf PK**. K⁺:Cl⁻ cotransport: sulfhydryls, divalent cations, and the mechanism of volume activation in a red cell. *J Membr Biol*, **1985**, 88(1): s.1-13
85. **Lê PQ, Gulbis B, Dedeken L, Dupont S, Vanderfaeillie A ve ark**. Survival among children and adults with sickle cell disease in Belgium: Benefit from hydroxyurea treatment. *Pediatr Blood Cancer*, **2015**, 62(11): s.1956-1961
86. **Lee JM, Johnson JA**. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol*, **2004**, 37(2): s.139-143
87. **Lee YT, de Vasconcellos JF, Yuan J, Byrnes C, Noh SJ ve ark**. LIN28B-mediated expression of fetal hemoglobin and production of fetal-like erythrocytes from adult human erythroblasts ex vivo. *Blood*, **2013**, 122(6): s.1034-1041
88. **Lew VL, Hockaday A, Sepulveda MI, Somlyo AP, Somlyo AV ve ark**. Compartmentalization of sickle-cell calcium in endocytic inside-out vesicles. *Nature*, **1985**, 315(6020): s.586-589
89. **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: s.85-96.e85
90. **Li Y, Liu D, Zhang X, Li Z, Ye Y ve ark**. miR-326 regulates HbF synthesis by targeting EKLF in human erythroid cells. *Exp Hematol*, **2018**, 63: s.33-40.e32

91. **Liu SC, Yi SJ, Mehta JR, Nichols PE, Ballas SK ve ark.** Red cell membrane remodeling in sickle cell anemia. Sequestration of membrane lipids and proteins in Heinz bodies. *J Clin Invest*, **1996**, 97(1): s.29-36
92. **Losek JD, Hellmich TR, Hoffman GM.** Diagnostic value of anemia, red blood cell morphology, and reticulocyte count for sickle cell disease. *Ann Emerg Med*, **1992**, 21(8): s.915-918
93. **Lou TF, Singh M, Mackie A, Li W, Pace BS.** Hydroxyurea generates nitric oxide in human erythroid cells: mechanisms for gamma-globin gene activation. *Exp Biol Med (Maywood)*, **2009**, 234(11): s.1374-1382
94. **Lu J, Guo S, Ebert BL, Zhang H, Peng X ve ark.** MicroRNA-mediated control of cell fate in megakaryocyte-erythrocyte progenitors. *Dev Cell*, **2008**, 14(6): s.843-853
95. **Luo S, Lei H, Qin H, Xia Y.** Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling. *Curr Pharm Des*, **2014**, 20(22): s.3548-3553
96. **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. *Exp Hematol*, **2008**, 36(9): s.1057-1072
97. **Makani J, Komba AN, Cox SE, Oruo J, Mwamtemi K ve ark.** Malaria in patients with sickle cell anemia: burden, risk factors, and outcome at the outpatient clinic and during hospitalization. *Blood*, **2010**, 115(2): s.215-220
98. **Mankelov TJ, Griffiths RE, Trompeter S, Flatt JF, Cogan NM ve ark.** Autophagic vesicles on mature human reticulocytes explain phosphatidylserine-positive red cells in sickle cell disease. *Blood*, **2015**, 126(15): s.1831-1834
99. **Mantel PY, Hjelmqvist D, Walch M, Kharoubi-Hess S, Nilsson S ve ark.** Infected erythrocyte-derived extracellular vesicles alter vascular function via regulatory Ago2-miRNA complexes in malaria. *Nat Commun*, **2016**, 7: s.12727
100. **Matsuyama H, Suzuki HI.** Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. *Int J Mol Sci*, **2019**, 21(1)
101. **Mikobi TM, Lukusa Tshilobo P, Aloni MN, Akilimali PZ, Mvumbi-Lelo G ve ark.** Clinical phenotypes and the biological parameters of Congolese patients suffering from sickle cell anemia: A first report from Central Africa. *J Clin Lab Anal*, **2017**, 31(6)
102. **Mohandas N, An X.** New insights into function of red cell membrane proteins and their interaction with spectrin-based membrane skeleton. *Transfus Clin Biol*, **2006**, 13(1-2): s.29-30
103. **Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC ve ark.** Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA*, **2005**, 294(1): s.81-90
104. **Mozzarelli A, Hofrichter J, Eaton WA.** Delay time of hemoglobin S polymerization prevents most cells from sickling in vivo. *Science*, **1987**, 237(4814): s.500-506
105. **Nauseef WM, Borregaard N.** Neutrophils at work. *Nat Immunol*, **2014**, 15(7): s.602-611
106. **Neel JV.** The Inheritance of Sickle Cell Anemia. *Science*, **1949**, 110(2846): s.64-66
107. **Nolan VG, Adewoye A, Baldwin C, Wang L, Ma Q ve ark.** Sickle cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF-beta/BMP pathway. *Br J Haematol*, **2006**, 133(5): s.570-578
108. **Nolan VG, Wyszynski DF, Farrer LA, Steinberg MH.** Hemolysis-associated priapism in sickle cell disease. *Blood*, **2005**, 106(9): s.3264-3267
109. **O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C.** Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **2018**, 9: s.402
110. **Ochoa S.** The pursuit of a hobby. *Annu Rev Biochem*, **1980**, 49: s.1-30
111. **Olgac U, Kurtcuoglu V.** The Bohr Effect Is Not a Likely Promoter of Renal Preglomerular Oxygen Shunting. *Front Physiol*, **2016**, 7: s.482
112. **Özdoğu H, Boğa C.** Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Adult Sickle Cell Disease: Problems and Solutions. *Turk J Haematol*, **2015**, 32(3): s.195-205

113. **Pan W, Uzunova VV, Vekilov PG.** Free heme in micromolar amounts enhances the attraction between sickle cell hemoglobin molecules. *Biopolymers*, **2009**, 91(12): s.1108-1116
114. **Pan YJ, Wan J, Wang CB.** MiR-326: Promising Biomarker for Cancer. *Cancer Manag Res*, **2019**, 11: s.10411-10418
115. **Pauling L, Itano HA.** Sick cell anemia a molecular disease. *Science*, **1949**, 110(2865): s.543-548
116. **Pecker LH, Lanzkron S.** Sick Cell Disease. *Ann Intern Med*, **2021**, 174(1): s.ITC1-ITC16
117. **Piccin A, Murphy WG, Smith OP.** Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev*, **2007**, 21(3): s.157-171
118. **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. *Lancet*, **2013**, 381(9861): s.142-151
119. **Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW ve ark.** Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nat Commun*, **2010**, 1: s.104
120. **Piel FB, Steinberg MH, Rees DC.** Sick Cell Disease. *N Engl J Med*, **2017**, 376(16): s.1561-1573
121. **Piel FB, Tatem AJ, Huang Z, Gupta S, Williams TN ve ark.** Global migration and the changing distribution of sickle haemoglobin: a quantitative study of temporal trends between 1960 and 2000. *Lancet Glob Health*, **2014**, 2(2): s.e80-89
122. **Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, Milner PF, Rosse WF ve ark.** Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med*, **1991**, 325(1): s.11-16
123. **Poillon WN, Kim BC.** 2,3-Diphosphoglycerate and intracellular pH as interdependent determinants of the physiologic solubility of deoxyhemoglobin S. *Blood*, **1990**, 76(5): s.1028-1036
124. **Powars DR, Weiss JN, Chan LS, Schroeder WA.** Is there a threshold level of fetal hemoglobin that ameliorates morbidity in sickle cell anemia? *Blood*, **1984**, 63(4): s.921-926
125. **Quinn CT.** Sick cell disease in childhood: from newborn screening through transition to adult medical care. *Pediatr Clin North Am*, **2013**, 60(6): s.1363-1381
126. **R. L (1846).** Case of Absence of the Spleen, Southern Journal of Medical Pharmacology. **1**: 83.
127. **Rai P, Ataga KI.** Drug Therapies for the Management of Sick Cell Disease. *F1000Res*, **2020**, 9
128. **Rao S, Bálint S, Cossins B, Guallar V, Petrov D.** Raman study of mechanically induced oxygenation state transition of red blood cells using optical tweezers. *Biophys J*, **2009**, 96(1): s.209-216
129. **Rees DC, Williams TN, Gladwin MT.** Sick-cell disease. *Lancet*, **2010**, 376(9757): s.2018-2031
130. **Rifai N.** *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 6th. Elsevier, United States of America, **16th January 2017**, s.1888
131. **Rifai N, Horvath, A. R., & Wittwer, C.** *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. Sixth edition. Elsevier, St. Louis, Missouri, **2018**,
132. **Romero JR, Suzuka SM, Nagel RL, Fabry ME.** Expression of HbC and HbS, but not HbA, results in activation of K-Cl cotransport activity in transgenic mouse red cells. *Blood*, **2004**, 103(6): s.2384-2390
133. **Rotter M, Yosmanovich D, Briehl RW, Kwong S, Ferrone FA.** Nucleation of sickle hemoglobin mixed with hemoglobin A: experimental and theoretical studies of hybrid-forming mixtures. *Biophys J*, **2011**, 101(11): s.2790-2797
134. **Roversi FM, da Cunha AF, Brugnerotto AF, Carazzolle MF, de Albuquerque DM ve ark.** Gene expression analysis of the Brazilian type of hereditary persistence of fetal hemoglobin: identification of genes that could be related to γ -globin activation. *Hemoglobin*, **2013**, 37(6): s.516-535

135. **Saki N, Abroun S, Soleimani M, Kavianpour M, Shahjahani M ve ark.** MicroRNA Expression in β -Thalassemia and Sick Cell Disease: A Role in The Induction of Fetal Hemoglobin. *Cell J*, **2016**, 17(4): s.583-592
136. **Saleh AW, Hillen HF, Duits AJ.** Levels of endothelial, neutrophil and platelet-specific factors in sickle cell anemia patients during hydroxyurea therapy. *Acta Haematol*, **1999**, 102(1): s.31-37
137. **Sangokoya C, Telen MJ, Chi JT.** microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. *Blood*, **2010**, 116(20): s.4338-4348
138. **Sankaran VG, Menne TF, Šćepanović D, Vergilio JA, Ji P ve ark.** MicroRNA-15a and -16-1 act via MYB to elevate fetal hemoglobin expression in human trisomy 13. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2011**, 108(4): s.1519-1524
139. **Sawant M, S C, Colah R, Ghosh K, Nadkarni A.** Does HbF induction by hydroxycarbamide work through MIR210 in sickle cell anaemia patients? *Br J Haematol*, **2016**, 173(5): s.801-803
140. **Seakins M, Gibbs WN, Milner PF, Bertles JF.** Erythrocyte Hb-S concentration. An important factor in the low oxygen affinity of blood in sickle cell anemia. *J Clin Invest*, **1973**, 52(2): s.422-432
141. **Semple JW, Italiano JE, Freedman J.** Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol*, **2011**, 11(4): s.264-274
142. **Setty BN, Stuart MJ.** Vascular cell adhesion molecule-1 is involved in mediating hypoxia-induced sickle red blood cell adherence to endothelium: potential role in sickle cell disease. *Blood*, **1996**, 88(6): s.2311-2320
143. **Siatecka M, Bieker JJ.** The multifunctional role of EKLF/KLF1 during erythropoiesis. *Blood*, **2011**, 118(8): s.2044-2054
144. **Smith CM, Krivit W, White JG.** The irreversibly sickled cell. *Am J Pediatr Hematol Oncol*, **1982**, 4(3): s.307-315
145. **Spector J, Kodippili GC, Ritchie K, Low PS.** Single Molecule Studies of the Diffusion of Band 3 in Sick Cell Erythrocytes. *PLoS One*, **2016**, 11(9): s.e0162514
146. **Steinberg MH, Chui DH, Dover GJ, Sebastiani P, Alsultan A.** Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: a glass half full? *Blood*, **2014**, 123(4): s.481-485
147. **Steinberg MH, Embury SH.** Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. *Blood*, **1986**, 68(5): s.985-990
148. **Stevens-Simon C, Barrett J, McGregor JA, French J, Persutte W.** Short cervix: a cause of preterm delivery in young adolescents? *J Matern Fetal Med*, **2000**, 9(6): s.342-347
149. **Storz JF, Moriyama H.** Mechanisms of hemoglobin adaptation to high altitude hypoxia. *High Alt Med Biol*, **2008**, 9(2): s.148-157
150. **Sundd P, Gladwin MT, Novelli EM.** Pathophysiology of Sick Cell Disease. *Annu Rev Pathol*, **2019**, 14: s.263-292
151. **Svasti S, Masaki S, Penglong T, Abe Y, Winichagoon P ve ark.** Expression of microRNA-451 in normal and thalassemic erythropoiesis. *Ann Hematol*, **2010**, 89(10): s.953-958
152. **Tallack MR, Perkins AC.** Three fingers on the switch: Krüppel-like factor 1 regulation of γ -globin to β -globin gene switching. *Curr Opin Hematol*, **2013**, 20(3): s.193-200
153. **Teixeira RS, Terse-Ramos R, Ferreira TA, Machado VR, Perdiz MI ve ark.** Associations between endothelial dysfunction and clinical and laboratory parameters in children and adolescents with sickle cell anemia. *PLoS One*, **2017**, 12(9): s.e0184076
154. **Telen MJ.** Beyond hydroxyurea: new and old drugs in the pipeline for sickle cell disease. *Blood*, **2016**, 127(7): s.810-819
155. **Telfer P, Coen P, Chakravorty S, Wilkey O, Evans J ve ark.** Clinical outcomes in children with sickle cell disease living in England: a neonatal cohort in East London. *Haematologica*, **2007**, 92(7): s.905-912
156. **Thomas SL, Bouyer G, Cuff A, Egée S, Glogowska E ve ark.** Ion channels in human red blood cell membrane: actors or relics? *Blood Cells Mol Dis*, **2011**, 46(4): s.261-265

157. **Tolu SS, Reyes-Gil M, Ogu UO, Thomas M, Bouhassira EE ve ark.** Hemoglobin F mitigation of sickle cell complications decreases with aging. *Am J Hematol*, **2020**, 95(5): s.E122-E125
158. **Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS, Frenette PS.** Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2002**, 99(5): s.3047-3051
159. **Ugwu AO, Ibegbulam OG, Nwagha TU, Madu AJ, Ocheni S ve ark.** Clinical and Laboratory Predictors of Frequency of Painful Crises among Sickle Cell Anaemia Patients in Nigeria. *J Clin Diagn Res*, **2017**, 11(6): s.EC22-EC25
160. Uzun B (2006). Ağrılı kriz nedeniyle acil servise başvuran orak hücre hastalarında Tramadol ile Meperidin'in etkinliğinin karşılaştırılması, Çukurova Üniversitesi.
161. **van Beers EJ, Yang Y, Raghavachari N, Tian X, Allen DT ve ark.** Iron, inflammation, and early death in adults with sickle cell disease. *Circ Res*, **2015**, 116(2): s.298-306
162. **Vasilatou D, Papageorgiou S, Pappa V, Papageorgiou E, Dervenoulas J.** The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Eur J Haematol*, **2010**, 84(1): s.1-16
163. VE. E (1917). A study of the erythrocytes in a case of severe anemia with elongated and sickle-shaped red blood corpuscles, *Arch Intern Med.*; 586-598.
164. **Vekilov PG.** Sickle-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia? *Br J Haematol*, **2007**, 139(2): s.173-184
165. **Vichinsky E, Hoppe CC, Ataga KI, Ware RE, Nduba V ve ark.** A Phase 3 Randomized Trial of Voxelotor in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*, **2019**, 381(6): s.509-519
166. **Villagra J, Shiva S, Hunter LA, Machado RF, Gladwin MT ve ark.** Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. *Blood*, **2007**, 110(6): s.2166-2172
167. VR. M (1922). Sickle cell anemia, *JAMA*. 79(16):1318-1320.
168. **Wagner MC, Eckman JR, Wick TM.** Sickle cell adhesion depends on hemodynamics and endothelial activation. *J Lab Clin Med*, **2004**, 144(5): s.260-267; discussion 227-268
169. **Walder JA, Chatterjee R, Steck TL, Low PS, Musso GF ve ark.** The interaction of hemoglobin with the cytoplasmic domain of band 3 of the human erythrocyte membrane. *J Biol Chem*, **1984**, 259(16): s.10238-10246
170. **Walker AL, Steward S, Howard TA, Mortier N, Smeltzer M ve ark.** Epigenetic and molecular profiles of erythroid cells after hydroxyurea treatment in sickle cell anemia. *Blood*, **2011**, 118(20): s.5664-5670
171. **Wang WC, Ware RE, Miller ST, Iyer RV, Casella JF ve ark.** Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: a multicentre, randomised, controlled trial (BABY HUG). *Lancet*, **2011**, 377(9778): s.1663-1672
172. **Ware RE.** How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. *Blood*, **2010**, 115(26): s.5300-5311
173. **Watson J.** A study of sickling of young erythrocytes in sickle cell anemia. *Blood*, **1948**, 3(4): s.465-469
174. **Yuregir GT, Arpacı A, Aksoy K, Tuli A, Dikmen N ve ark.** Population at risk for hemoglobinopathies in Cukurova, Türkiye: Need for prenatal diagnosis. *Annals of Medical Sciences*, **1995**, 4(2): s.61-69
175. **Yüregir GT, Donma O, Dikmen N, Isbir T, Cinar M.** Population studies of hemoglobin S and other variants in Cukurova, the southern part of Turkey. *Nihon Ketsueki Gakkai Zasshi*, **1987**, 50(4): s.757-765
176. **Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K.** Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev*, **2007**, 21(2): s.99-111
177. **Zhang D, Xu C, Manwani D, Frenette PS.** Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. *Blood*, **2016**, 127(7): s.801-809

EKLER

Ek 1. Gönüllülerin Bilgilendirilmiş Olur / (Rıza) Formu Kontrol Grubu

T.C.

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ ETİK KURULU

Gönüllülerin Bilgilendirilmiş Olur / (Rıza) Formu Kontrol Grubu

Araştırmanın Konusu: "Orak Hücre Anemili olgularda miRNA ekspresyon düzeyleri ile klinik parametreler arasındaki korelasyonun araştırılması"

Araştırmanın Amacı: Çalışmamızda orak hücre anemili hastaların kanlarında miRNA, HbS ve HbF düzeylerini ölçmeyi ve olguların klinik şiddetiyle bu verileri karşılaştırmayı amaçladık.

Araştırmaya Katılma Süresi: Örnek alım süresince

Araştırmaya Katılacak Yaklaşık Gönüllü Sayısı: 80 (40 hasta, 40 kontrol)

Sayın Gönüllü;

"Orak Hücre Anemili olgularda miRNA ekspresyon düzeyleri ile klinik parametreler arasındaki korelasyonun araştırılması" başlıklı münferit bilimsel araştırma projemize örnek sağlamak amacıyla rızanızla sizden iki (2) tüp kan örneği alınacak. Çalışmamızın orak hücre anemi hastalığı ile ilgili yeni tedavi olanaklarına ışık tutmasını amaçlıyoruz. Çalışmaya katılmanız rutin tetkiklerinize herhangi bir etkisi olmayacak. Kan örnekleri uzman hemşireler tarafından alınacaktır. Kan örneği alınırken kan alınan bölgede kızarıklık sonrasında ise morluk oluşabilir.

Kanınızda miRNA adı verilen genetik yapınızla ilgili molekül ve HbS, HbF (hemoglobin tipleri) düzeyleri bakılacaktır. Bu düzeyleri, orak hücre anemisi hastalarının kan düzeyleri ile karşılaştırılıp değerlendirilecektir. Yapılan tetkikler sonucunda laboratuvar değerlerinde anormallik tespit edilmesi durumunda ilgili bölüme yönlendirileceksiniz.

Çalışmaya gönüllü olmanız durumunda size herhangi bir ücret ödenmeyecek veya sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katılmak istememeniz durumunda veya çalışmanın herhangi bir aşamasında çalışmadan çıkmak istemeniz durumunda tedavinizde bir değişiklik olmayacaktır.

Sağlayacağınız katkı için teşekkür eder, acil şifalar dilerim.

Yukarıdaki, araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri içeren metni okudum. Bana, tanık huzurunda yukarıda konusu belirtilen araştırmayla ilgili yazılı ve sözlü açıklama yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı ve katılmama hakkımın olduğunu, araştırma başladıktan sonra devam etmeyi istememe hakkına sahip olduğum gibi kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum. Bu koşullarda söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın, kendi rızam ile katılmayı kabul ediyorum.

GÖNÜLLÜ	
Adı Soyadı:	Telefon: (0)
Adresi:	Faks: (0)
	İmza
Bilgi Verebilecek Kişi:	
VELİ, VASİ VEYA VEKİL (Kendi rızası alınamayan hastalar için)	
Adı Soyadı:	Telefon: (0)
Adresi:	Faks: (0)
	İmza:
Yakınlığı:	
ARAŞTIRMACI	

Adı Soyadı:	Telefon: (0)
Adresi:	Faks: (0)
	İmza
GEREKTİĞİNDE GÖNÜLLÜ VEYA YAKINININ BAŞVURABİLECEĞİ KİŞİ:	
Adı Soyadı:	Telefon: (0)
Adresi:	Faks: (0)
	İmza
TANIK:	
Adı Soyadı:	Telefon: (0)
Görevi	Faks: (0)
Adresi:	İmza:

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ ETİK KURULU
Gönüllülerin Bilgilendirilmiş Olur / (Rıza) Formu

Araştırmanın Konusu: "Orak Hücre Anemili olgularda miRNA ekspresyon düzeyleri ile klinik parametreler arasındaki korelasyonun araştırılması"

Araştırmanın Amacı: Çalışmamızda orak hücre anemili hastaların kanlarında miRNA, HbS ve HbF düzeylerini ölçmeyi ve olguların klinik şiddetiyle bu verileri karşılaştırmayı amaçladık.

Araştırmaya Katılma Süresi: Örnek alım süresince

Araştırmaya Katılacak Yaklaşık Gönüllü Sayısı: 80 (40 hasta, 40 kontrol)

Sayın Gönüllü;

"Orak Hücre Anemili olgularda miRNA ekspresyon düzeyleri ile klinik parametreler arasındaki korelasyonun araştırılması" başlıklı münferit bilimsel araştırma projemize örnek sağlamak amacıyla rızanızla sizden iki (2) tüp kan örneği alınacak. Çalışmamızın yeni tedavi olanaklarına ışık tutmasını amaçlıyoruz. Çalışmaya katılmanız rutin tetkiklerinize herhangi bir etkisi olmayacak. Kan örnekleri uzman hemşireler tarafından alınacaktır. Kan örneği alınırken kan alınan bölgede kızarıklık sonrasında ise morluk oluşabilir.

Kanınızda miRNA adı verilen genetik yapınızla ilgili molekül ve HbS, HbF (hemoglobin tipleri) düzeyleri bakılacaktır. Bu düzeylerin, hastalıkla ilgili şikayetleriniz ve klinik durumunuzla ilgisi değerlendirilecektir. Yapılan tetkikler sonucunda laboratuvar değerlerinde anormallik tespit edilmesi durumunda ilgili bölüme yönlendirileceksiniz.

Çalışmaya gönüllü olmanız durumunda size herhangi bir ücret ödenmeyecek veya sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katılmak istememeniz durumunda

veya çalışmanın herhangi bir aşamasında çalışmadan çıkmak istemeniz durumunda tedavinizde bir değişiklik olmayacaktır.

Sağlayacağınız katkı için teşekkür eder, acil şifalar dilerim.

Yukarıdaki, araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri içeren metni okudum. Bana, tanık huzurunda yukarıda konusu belirtilen araştırmayla ilgili yazılı ve sözlü açıklama yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı ve katılmama hakkımın olduğunu, araştırma başladıktan sonra devam etmeyi istememe hakkına sahip olduğum gibi kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum. Bu koşullarda söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın, kendi rızam ile katılmayı kabul ediyorum.

GÖNÜLLÜ	
Adı Soyadı:	Telefon: (0)
Adresi:	Faks: (0)
	İmza
Bilgi Verebilecek Kişi:	
VELİ, VASİ VEYA VEKİL (Kendi rızası alınamayan hastalar için)	
Adı Soyadı:	Telefon: (0)
Adresi:	Faks: (0)
	İmza:
Yakınlığı:	
ARAŞTIRMACI	

Adı Soyadı:	Telefon: (0)
Adresi:	Faks: (0)
	İmza
GEREKTİĞİNDE GÖNÜLLÜ VEYA YAKINININ BAŞVURABİLECEĞİ KİŞİ:	
Adı Soyadı:	Telefon: (0)
Adresi:	Faks: (0)
	İmza
TANIK:	
Adı Soyadı:	Telefon: (0)
Görevi	Faks: (0)
Adresi:	İmza:

ÖZGEÇMİŞ

İlkokulu Dört Yol'da Atatürk İlkokulu'nda tamamladıktan sonra İskenderun Demir Çelik Anadolu Lisesi'ne girmeye hak kazanıp 1999 yılında mezun oldu. 2000-2006 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde öğrenim gördü ve tıp doktoru unvanını aldı. 2006 yılında devlet hizmeti yükümlülüğü kapsamında Hatay'ın Altınözü ilçesinde görev yapmaya başladı. 2016 yılında H.M.K.Ü. Moleküler Biyokimya ve Genetik AD.'da doktora eğitimine başladı. 2020 yılında, görev yaptığı T.C Sağlık Bakanlığı'ndan istifa etti. İyi derecede İngilizce bilen Gizem İNAL evli ve bir kız çocuk annesidir.

