



**T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE  
HASTALIKLARI ANABİLİM  
DALI**

**VAZOOKLUZİV KRİZ İLE BAŞVURAN ORAK HÜCRE  
ANEMİLİ HASTALARDA mikroRNA DÜZEYLERİNİN  
KRİZLE İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. İKBAL TÜRKER**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. YURDANUR KILINÇ**

**ADANA-2016**



**T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE  
HASTALIKLARI ANABİLİM  
DALI**

**VAZOOKLUZİV KRİZ İLE BAŞVURAN ORAK HÜCRE  
ANEMİLİ HASTALARDA mikroRNA DÜZEYLERİNİN  
KRİZLE İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. İKBAL TÜRKER**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. YURDANUR KILINÇ**

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Fonu  
tarafından desteklenmiştir.

**PROJE NO: TTU-2016-6025**

**ADANA-2016**

## TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasının her aşamasında yanımda olan, yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini paylaşan ve bana karşı her zaman anlayışlı olan tez danışmanım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Yurdanur KILINÇ'a;

Uzmanlık eğitimime katkıda bulunan bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tüm hocalarıma ve yan dal uzmanlarına;

4 yıl boyunca acı, tatlı pek çok anı paylaştığım, yardımlaşmayı öğrendiğim ve bana emekleri geçen Dr. Suzan İCİL, Dr. Nilgün BAHAR, Dr. Çağrı ÖZÇELİK'e teze birlikte başlangıç yaptığım Dr.Kadir ORTAKÖYLÜ'ye ve tüm asistan arkadaşlarıma;

Hastalara hizmet amacıyla ekip halinde çalıştığım ve her konuda yardımlarını gördüğüm pediatri bölümünün tüm servis, poliklinik ve laboratuvar çalışanlarına;

Tez çalışmalarında bana yardımcı olan Gülşen YÜKSEL, tüm Çocuk Acil ve Hematoloji servis, poliklinik ve laboratuvar çalışanlarına;

Tez kanlarımın çalışılmasını sağlayan Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Bölümü'nden Prof. Dr. Abdullah TÜLİ ve Uzm.Dr.Ebru Dünder YENİLMEZ'e ve laboratuvar çalışanlarına;

Beni her türlü fedakarlıkla büyüten, her konuda her zaman yanımda olan, bugünlere gelmemi sağlayan sevgili aileme;

En içten duygularıyla teşekkürlerimi sunuyorum.

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER .....	II
TABLolar DİZİNİ.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	V
ÖZET .....	VI
ABSTRACT.....	VII
KISALTMALAR.....	VIII
1. GİRİŞ AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Orak Hücre Anemisi .....	2
2.1.1. Tanım .....	2
2.1.2. Prevelansı ve Coğrafi Dağılımı.....	2
2.1.3. Patogenez .....	4
2.1.4. Genetik.....	6
2.1.5. Klinik .....	6
2.1.6. Tanı .....	11
2.1.7. Tedavi .....	13
2.2.MikroRNA .....	19
2.2.1. MikroRNA'ların Biyogenezi .....	20
2.2.2. MikroRNA İzolasyonu ve Tesbiti.....	22
2.2.3. MikroRNA'ların Klinik Önemi ve Hastalıklarla İlişkisi .....	27
2.2.4. Eritropoez ve Eritrosit Hastalıklarında mikroRNA .....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	32
3.1. Hastalar ve Çalışma Planı .....	32
3.2.Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları .....	32
3.2.1. Universal Komplementer DNA Sentez Kiti .....	33
3.2.2. Komplementer DNA Yapımı için Karışım Protokolü.....	33
3.2.3. Komplementer DNA Yapımı için Isı Protokolü .....	34

3.2.4. Gerçek Zamanlı PCR Karışım Protokolü (Housekeeping gen/Referans gen).....	35
3.2.5. Gerçek Zamanlı PCR Karışım Protokolü (Target gen/Hedef gen).....	35
3.2.6. Gerçek Zamanlı PCR Isı Protokolü.....	35
3.3. İstatistiksel analiz.....	36
4. BULGULAR.....	38
5. TARTIŞMA.....	49
SONUÇLAR.....	53
KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	64



## **TABLolar DİZİNİ**

### **Tablo No:**

### **Sayfa No:**

<b>Tablo 1.</b> Ateşi olan OHA'lı hastalarda hastaneye yatırılarak izleme endikasyonları .....	13
<b>Tablo 2.</b> OHA'da transfüzyon endikasyonları .....	17
<b>Tablo 3.</b> miRNA'ların tedavide kullanımı .....	29
<b>Tablo 4</b> miRNA'ların gama globin ekspresyonu üzerindeki farklı rolleri .....	31
<b>Tablo 5.</b> Komplementer DNA Yapımı için Karışım Protokolü .....	33
<b>Tablo 6.</b> Gerçek Zamanlı PCR Karışım Protokolü (Housekeeping gen/ Referans gen) .....	34
<b>Tablo 7.</b> Gerçek Zamanlı PCR Karışım Protokolü (Target gen/Hedef gen) .....	35
<b>Tablo 8.</b> Gerçek Zamanlı PCR Isı Protokolü .....	35
<b>Tablo 9.</b> OHA'lı hastaların ve kontrol grubunun özellikleri .....	38
<b>Tablo 10.</b> Orak hücre anemili hastaların özellikleri .....	38
<b>Tablo 11.</b> OHA'lı hastalar ve kontrol grubunun hematolojik parametreleri .....	39
<b>Tablo 12.</b> OHA'lı hastaların kriz ve kriz dışı dönem hematolojik parametreleri .....	41
<b>Tablo 13.</b> Kriz döneminde OHA'lı hastalar ve kontrol grubunun hematolojik parametreleri .....	42
<b>Tablo 14.</b> Kriz dışı dönemdeki OHA'lı hastalar ve kontrol grubunun hematolojik parametreleri .....	43
<b>Tablo 15.</b> OHA'lı hastaların kriz ve kriz dışı dönemlerinde miRNA düzeyleri .....	44
<b>Tablo 16.</b> OHA'lı hastaların kriz dönemi ve kontrol grubunun miRNA düzeyleri .....	45
<b>Tablo 17.</b> OHA'lı hastaların kriz dışı dönemi ile kontrol grubunun miRNA düzeyleri .....	46
<b>Tablo 18.</b> Kriz dışı dönemde kriz sıklığı ile miRNA düzeyleri ilişkisi .....	46

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1. Hemoglobin S'in coğrafi dağılımı.....	3
Şekil 2. Hemoglobin A ve S'in oksi-deoksi durumdaki yapısı .....	5
Şekil 3. OHA'da periferel kan yayma örneği .....	12
Şekil 4. miRNA biyogenezisi .....	21
Şekil 5. Hayali bir RT-PCR sonucu grafiği. A, B ve C örneklerinin CT değerleri .....	25
Şekil 6. RT-PCR sonucunun görece değerlendirmesi için kullanılan formül .....	26
Şekil 7 Bazı Hastalıklara Özgü miRNA Tipleri .....	28
Şekil 8. Eritropoez'deki miRNA fonksiyonlarının şematik diyagramı .....	31
Şekil 9. Hasta ve kontrollere ait amplifikasyon eğrileri. ....	36
Şekil 10. OHA'lı hastaların kriz, kriz dışı dönemlerde ve kontrol grubunun lökosit değerleri .....	40
Şekil 11. OHA'lı hastalarda kriz, kriz dışı dönemlerde ve kontrol grubunda Hct değerleri .....	42
Şekil 12. OHA'lı hastaların kriz, kriz dışı dönemlerinde ve kontrol grubunda miRNA 451 düzeyleri.....	44
Şekil 13. OHA'lı hastaların kriz, kriz dışı dönemlerinde ve kontrol grubunda miRNA 144 düzeyleri.....	45
Şekil 14. OHA'lı hastaların kriz döneminde miRNA 451 ve HbF arasındaki ilişki .....	47
Şekil 15. OHA'lı hastaların kriz döneminde miRNA 144 ve Htc arasındaki ilişki.....	48

## ÖZET

### Vazookluziv Kriz ile Başvuran Orak Hücre Anemili Hastalarda MikroRNA Düzeylerinin Krizle İlişkisinin Değerlendirilmesi

**Giriş:** Orak hücre anemisi (OHA), hemoglobin S (HbS) hemoglobinin homozigot olduğu durumda anemi, sık krizler, çeşitli organ hasarları ile sonuçlanan bir hastalıktır. MikroRNAlar, genom üzerinde proteine translasyonu gerçekleştirilmeyen hedef geni baskılayarak hücrenin gelişim, farklılaşma ve ölümü gibi farklı olaylarda düzenleyici rol oynayan 19-25 nükleotid uzunluğunda RNA'lardır.

**Amaç:** Bu çalışmada orak hücre anemili hastalarda ağırlı kriz ve kriz dışı dönemdeki mikroRNA düzeylerinin krizle ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlandı.

**Gereç ve yöntemler:** Bu çalışmada Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalı'nda izlenen 17 orak hücre anemili hastadan kriz döneminde ve aynı hastalardan kriz dışı dönemde kan örnekleri alındı. Kontrol grubu olarak anemisi ve sistemik bir hastalığı olmayan aynı yaş grubundan 16 sağlıklı çocuktan kan örnekleri alındı. Hasta ve kontrol grubundan tam kan sayımı, hemoglobin elektroforezi (alkali ve asit pH'da) ve biyokimya parametreleri çalışıldı. Hastalardan hsa-miR-144 ve hsa-miR-451 gerçek zamanlı PCR ile tetkik edildi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

**Bulgular:** Orak hücre anemili hastalarda kontrol grubuna göre hemoglobin ve hematokrit değerleri düşük idi ( $p<0,001$ ). Orak hücre anemili hastalarda kriz döneminde bakılan HbS ortalaması kriz dışı dönemde bakılan HbS ortalamasına göre yüksek saptandı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0,05$ ). Hastalarda kriz döneminde bakılan miRNA 451 düzeyi kriz dışı döneme göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p<0,05$ ). Hastaların miRNA 144 düzeyi kriz döneminde kriz dışı dönemine göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p<0,05$ ). Hastaların kriz sıklığı ile kriz dışı dönemde bakılan miRNA 451 ve miRNA 144 düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki saptanamadı ( $p>0,05$ ).

**Sonuç:** Çalışma sonucunda miRNA 144 ve miRNA 451 düzeyleri orak hücre anemili hastaların ağırlı kriz dönemlerinde yüksek saptandı. Orak hücre anemisinde miRNA düzeylerinin krizle ilişkisinin net bir biçimde belirlenebilmesi için daha geniş çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** çocuk, mikroRNA, orak hücre anemisi

## ABSTRACT

### Evaluation of MicroRNA Expression during Painful Crisis and Steady State in Sickle Cell Anemia

**Introduction:** Sickle cell anemia is a disease which is with homozygous HbS, resulting anemia, frequent crises and various organ damages. MicroRNAs (miRs) are a group of non-coding RNAs of ~19-25 nucleotides in length, which post-transcriptionally regulate the expression of their target genes as well as proliferation, differentiation and apoptosis.

**Aim:** In this study, we aimed to investigate the evaluation of microRNA expression during painful crisis and steady state in sickle cell anemia patients.

**Materials and method:** Seventeen patients, who are followed by Çukurova University Department of Pediatric Hematology were included in this study. Blood samples were collected in all of these patients during painful crisis and steady state. Control group was formed with sixteen healthy children age matched without any systemic disease. Complete blood count, hemoglobin electrophoresis (both in alkali and acid pH) and biochemical parameters were studied in both groups. Also patients' microRNA 451 and microRNA 144 expressing levels were studied by real time PCR and whole data was statistically analyzed.

**Findings:** Hemoglobin and hematocrit levels were significantly lower in sickle cell anemia patients than control group ( $p < 0,001$ ). The levels of HbS were high during crisis period compared to mean HbS levels during steady state but this was not statistically significant ( $p > 0,05$ ). The microRNA 451 levels were significantly high in sickle cell anemia patients with painful crisis comparing with control group ( $p < 0,05$ ). The microRNA 144 levels were significantly high in patients with painful crisis comparing with steady state ( $p < 0,05$ ). There was not any significant relation with frequency of crisis microRNA 451 and microRNA 144 levels ( $p > 0,05$ ).

**Result:** As a result we found high levels of microRNA 451 and microRNA 144 in sickle cell anemia patients during painful crisis period. We need further detailed studies in order to understand the effect of microRNA on prognosis in sickle cell anemia.

**Keywords:** children, microRNA, sickle cell anemia

## KISALTMALAR

AGS:	Akut Göğüs Sendromu
ATP:	Adenozin trifosfat
Ca <sup>+2</sup> :	Kalsiyum
CT:	Cycle threshold
DNA:	Deoksiribonükleik asit
EKG:	Elektrokardiografi
EKO:	Ekokardiografi
G6PD:	Glukoz-6-fosfat-dehidrogenaz
Hb:	Hemoglobin
HbAS:	Heterozigot orak hücre anemisi
HbF:	Fetal hemoglobin
Hb SS:	Homozigot orak hücre anemisi
Hct:	Hematokrit
HKHN:	Hematopietik kök hücre nakli
HLA:	Human Lökosit Antijeni
HPFH:	Fetal hemoglobin herediter persistansı
HPLC:	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
K:	Potasyum
MCHC:	Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu
MCV:	Ortalama eritrosit volümü
miR:	Mikro ribonükleik asit
miRNA:	Mikro ribonükleik asit
MRI:	Magnetik Rezonans Görüntüleme
Na:	Sodyum

OHA:	Orak hücre anemisi
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
Pre-miRNA:	Prekürsör mikroRNA
Pri-miRNA:	Primer mikroRNA
RDW:	Kırmızı küre dağılım genişliği
RISC:	RNA ile başlatılan susturma kompleksi
RT-PCR:	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
Sn:	Saniye
siRNA:	Küçük engelleyici ribonükleik asit
SSS:	Santral sinir sistemi
TCD:	Transkraniyal Doppler

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Hemoglobinopatiler dünyada ve ülkemizde en sık karşılaşılan tek gen bozukluklarıdır. Hemoglobinopatiler içinde en sık görülenler ise orak hücre sendromları ve talasemilerdir<sup>129</sup>. Orak hücre anemisinde (OHA), deoksijene hemoglobine bağlı eritrositlerin orak şeklini almasından dolayı hemoglobin S (HbS) olarak adlandırılan hemoglobinin homozigot olduğu durumda anemi, sık krizler, organ hasarları ile yaşam süresinin etkilendiği bir hastalıktır<sup>5</sup>.

MikroRNA, genom üzerinde protein kodlayan intron veya ekzon bölgeleri ve protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkripsiyonu sağlanan fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen 19-25 nükleotid uzunluğunda RNA'lardır. Protein translasyonunun inhibisyonuna ve/veya mRNA yıkımına yol açar. Yapılan çalışmalarda hematopoezde bir ya da birden çok hedef geni baskılayarak hücrenin gelişim, farklılaşma, çoğalma ve ölümü gibi farklı olaylarda düzenleyici rol oynadıkları gösterilmiştir. Birçok hastalıkta anormal mikroRNA düzeylerinin saptanmasının klinik biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşündürdüğü rapor edilmiştir.

OHA'da mikroRNA'ların, hastalığın klinik seyri özellikle vazooklüziv krizlerle olan ilişkisini araştırmak ve değerlendirmek amacıyla prospektif bir çalışma olarak Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalı tarafında takip edilen ve tedavisi yapılan 17 OHA'lı hasta çalışmaya alındı. Bu çalışmada mikroRNAlar vazooklüziv kriz ve stabil dönemde tetkik edildi. Hastaların vazooklüziv kriz sıklığı, hidroksiüre kullanım durumu ile ilişkisi değerlendirildi. Aynı yaş grubu sağlıklı 16 çocuk kontrol grubu olarak alındı.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Orak Hücre Anemisi

#### 2.1.1. Tanım

Orak hücre anemisi; HbS'in homozigot durumunu belirtir. HbS, beta zincirinin NH<sub>2</sub> ucunda 6. aminoasidi olan glutamik asidin yerine valin geçmesi ile oluşur. HbS oksijen basıncı azaldığında yeterli olarak çözünemez, polimerize olur ve rijid eritrositler oluşur<sup>50,55</sup>. İlk olarak 1910 yılında Dr. James Herrick tarafından yayınlandıktan sonra literatüre girmiş kalıtsal bir hastalıktır<sup>52</sup>.

Orak hücre sendromları HbS geninin herediter olarak geçtiği tüm hastalıkları kapsar. HbS heterozigot durumunda/taşıyıcı (HbAS), homozigot durumda/hasta (HbSS veya orak hücre anemisi), diğer  $\beta$  zincir anomalisi gösteren hemoglobinlerle (HbSD, HbSC, HbSE hastalığı), beta talasemi, fetal hemoglobin herediter persistansı (HPFH) ve alfa talasemi ile birlikte orak hücre sendromları olarak anılır<sup>14</sup>.

#### 2.1.2. Prevalansı ve Coğrafi Dağılımı

Orak hücre anemisi Afrika kıtası, Ortadoğu, Amerika, ülkemizin de içinde bulunduğu Akdeniz kuşağında ve Hindistan'da da oldukça sık görülür<sup>113</sup> (Şekil 1). OHA'nin dünyadaki dağılımını belirleyen önemli etkenlerden birinin malaraya karşı sağladığı direnç, diğerinin ise sonradan gelen göçler olduğu düşünülmektedir<sup>61</sup>.

Ülkemizde hemoglobinopatiler ile ilgili ilk çalışmalar, 1950'li yıllarda Prof. Dr. Muzaffer Aksoy tarafından Çukurova Bölgesinde yaşayan Eti Türklerinde yapılmıştır<sup>3</sup>. Toplam OHA'li hasta sayısı yaklaşık 1200 civarında olup HbS sıklık oranı %0,03 tür. Ancak bu oran ülkemizde OHA'nin en sık görüldüğü Çukurova Bölgesinde daha yüksektir. Sağlık Bakanlığı ve Ulusal Hemoglobinopati Konsey'inin son verilerine göre taşıyıcı sıklığı Adana'da %10, Antakya'da %10.5, Mersin'de 13.6, Antaya'da %2.5, Diyarbakır'da %0.5, Muğla'da %0.5 sıklıktadır<sup>6,35,47,63,65,71,72</sup>.

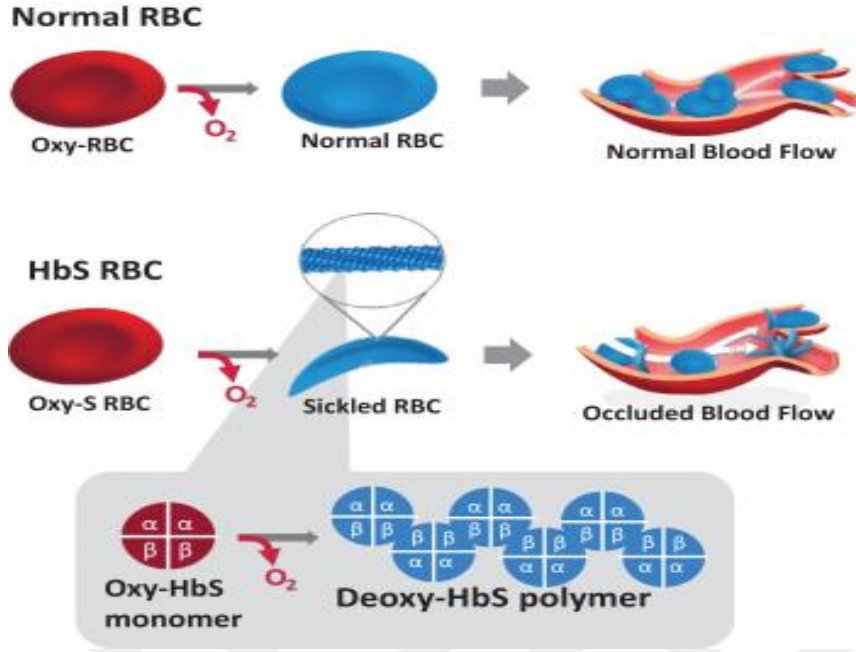


Şekil 1. Hemoglobin S'in coğrafi dağılımı<sup>102</sup>

### 2.1.3 Patogenez

HbS,  $\beta$  zincirinin altıncı pozisyonundaki glutamik asit yerine valinin geçmesi veya glutamik asiti kodlayan GAG nükleotid dizisinde A---T (adenin ile timinin) yer değiştirmesi sonucu oluşan ve elektroforetik mobilitesi farklı bir hemoglobindir<sup>77</sup>. Bu küçük değişiklik moleküler stabilite ve çözünürlükte büyük değişikliğe yol açar. Deoksi durumundaki HbS polimerize olur (Şekli 2). HbS'in deoksi durumunda solubilitesi azalır, buna karşın viskozitesi artar. Eritrositteki HbS konsantrasyonu 30g/dL ye ulaştığında yarı solid jel oluşur. Bu jel polarize ışıktta incelendiğinde küçük, rijid, mekik şeklinde cisimler içerir. Bu likid kristaller taktoid olarak adlandırılır. HbS polimerlerinin elektron mikroskopik incelemesi spiral şeklinde kıvrılmış; altı, sekiz veya ondört monomoleküler iplikçiklerden oluşmuş çomak şeklinde yapıları içerdiğini gösterir. Bu yapının ortası delik veya dolu olarak görülür.

Polimerize HbS'de moleküller arası temas yönü HbS ve diğer hemoglobin varyantları ile ilişkisine göre değişir. Örneğin HbC-Harlem deoksi HbS'in polimerizasyonunu değiştirir, minimal jelleşme konsantrasyonunu arttırır. Hb Memphis ise daha yavaş jel oluşturur. Her ikisinde de  $\beta$  zincirinin 6.pozisyonundaki valin amino asiti moleküller arası temasta yer alır. Yakın moleküllerin temas noktaları arasında hem hidrofobik, hem de elektrostatik kuvvetleri içeren köprüler oluşur. HbS'in likid ve solid fazları arasındaki dengeyi dört değişken faktör tayin eder. Bunlar oksijen konsantrasyonu, HbS konsantrasyonu, ısı ve HbS'den başka hemoglobinlerin varlığıdır<sup>62</sup>.



Şekil 2. Hemoglobin A ve Hemoglobin S'in oksi-deoksi durumdaki yapısı<sup>54</sup>

HbS eritrosit membranında oksidatif hasara, hücresel dehidratasyona, fosfolipid asimetrisine neden olur<sup>40,49</sup>. Membran zedelenmesi sonucu eritrositlerde hücre içi sodyum ( $\text{Na}^+$ ) ve kalsiyum ( $\text{Ca}^{+2}$ ) artarken, potasyum ( $\text{K}^+$ ) azalır<sup>11</sup>. Adenozin trifosfat (ATP) pompası hücre içi elektrolit dengesini koruyabilmek için daha fazla çalışır ve sonuçta hücre içi ATP azalır.  $\text{K}^+$  ve su kaybı eritrositlerde ileri derecede dehidratasyona yol açar. Hücre dehidratasyonu hücre içi HbS konsantrasyonunu artırır ve bu da hücrenin oraklaşmasına neden olur<sup>118</sup>.

Orak hücre anemisindeki klinik belirtiler artmış kan viskozitesi ile ilgilidir. Kanın viskozitesi, membranın rijiditesi, hemoglobin polimerizasyonu ve hücre içi hemoglobin konsantrasyonunun artması gibi faktörlerle artar. Oraklaşmış hücreler damar endoteline yapışarak perfüzyonun azalmasına, hipoksiye ve daha sonra oraklaşmaya yol açarak kısır döngüye neden olur. Sonuçta dalak, kemik iliği ve plasentada çoğul odaklar halinde infarktüsler ve fibrozis görülür. Bu fizyopatolojik olaylar sonucu kronik kompensatuar hemolitik anemi, ilerleyici doku ve organ hasarı, akut ağrılı vazookluzif kriz gelişir.

Orak hücre anemisinde eritrositlerin yaklaşık 2/3'ü makrofajlarla dolaşımdan alınır. Toplam hücre yıkımının 1/3'ü intravasküler olup; oraklaşmanın düzelmesi

sirasında mikroflamanların dökülmesi veya kapillerlerdeki oraklaşmış hücrelerin geçişine bağlanabilir<sup>62</sup>.

#### **2.1.4. Genetik**

Yapılan ilk çalışmalarda OHA hastasının babasında orak hücrelerinin gösterilmesi hastalığın genetik bir temeli olduğunu göstermiştir<sup>33</sup>. Hastalıklı gen otozomal resesif kalıtılarak gelecek nesillere aktarılır. HbS mutasyonu homozigot (HbSS) ya da heterozigot (HbAS) yapıda olabilmektedir. Hasta olmayan bireyler HbAA, HbAS durumunda heterozigot (taşıyıcı), HbSS durumunda homozigot hasta olarak adlandırılır. Heterozigot yapıdaki bireylerde ebeveynlerin sadece birinden  $\beta$  globin zincirinin yapılmasından sorumlu olan mutasyona uğramış geni alması durumunda kırmızı kan hücrelerinde HbA ile HbS bulunmaktadır. Bu yapıdaki Hb molekülüne sahip bireyler HbS taşıyıcısı olarak adlandırılmaktadır.

Homozigot bireyler ise ebeveynlerin her ikisinden de  $\beta$  globin zincirinin yapılmasından sorumlu olan mutasyona uğramış geni alır. Bu durumda, bireyler HbA sentez edemez ve OHA meydana gelmektedir. Her ikiside genotip olarak HbS taşıyıcısı ebeveynlerden doğacak her bir çocuk için hastalıklı ya da normal doğma oranı %25, taşıyıcı doğma oranı ise %50'dir<sup>61</sup>. Orak hücre geni homozigot (HbSS) durumunda olan bireylerde hastalığın klinik bulguları görülür. Orak hücre geni heterozigot (HbAS) olan orak hücre taşıyıcıları ise normal bir hayata sahiptirler ve genellikle bulgu vermezler.

#### **2.1.5. Klinik**

Hastalığın tipik bulguları HbF varlığı ve HbSS genotipinin fetal, erken postnatal devrede klinik olarak belirmemesi nedeniyle ilk altı aydan sonra görülür. İlk üç ayda anemi, altıncı aydan sonra ilk kez splenomegali farkedilebilir<sup>51</sup>.

OHA'nin klinik bulguları ciddi hemoliz ve hemolitik aneminin yol açtığı kompensatuvar mekanizmalar sonucu birçok doku ve organı ilgilendiren yaygın vazooklüzyon ve enfarktüse bağlı perfüzyon bozukluğu oluşmaktadır.

Değişmez klinik bulgular hemolize bağlı sarılık, erken çocukluk yaşlarından itibaren eritrosit yıkımına bağlı splenomegali, anemiye sekonder hepatomegali ve kardiyak üfürümler, kronik eritropoez bozukluğuna bağlı maksiller hipertrofi, anemiye bağlı büyüme gelişme geriliği ve kısa boy görülebilir<sup>9,21</sup>.

### **Vazooklüziv Kriz**

Vazooklüziv ataklar OHA'nde ana klinik bulgularını oluşturur. Oraklaşmış eritrositlerin küçük damarları tıkanması, azalmış kan akımı sonucu bölgesel hipoksi ve asidoz, iskemik harabiyete bağlı gelişen akut ve ağrılı ataklardır<sup>61</sup>. En sık görüldüğü organlar kemikler, akciğer, karaciğer, dalak, beyin ve penisdir. Dalak infarktı ağrı nedeni olabilir ve altı yaşından sonra otosplenektomi yaygındır. Serebral damarların infarktı vazooklüziv komplikasyonların en ciddi olanıdır<sup>14,8,60,116</sup>.

### **Hemolitik Kriz**

Hemoliz oranındaki artış hemolitik kriz olarak adlandırılır. Hemoglobin ve hematokrit düzeylerinde düşme, bilirubin ve retikülosit değerinde artışla aneminin aniden şiddetlenmesidir. Periferik yaymada polikromazi görülür. OHA ile birlikte görülen glukoz-6-fosfat-dehidrogenaz (G6PD) enzim eksikliği de hemolitik krize neden olabilir<sup>14,113,58</sup>.

### **Aplastik kriz**

Aplastik krizler sırasında lökosit ve trombosit sayısı etkilenmeden hemoglobin düşüklüğü ve retikülositopeni mevcuttur. Eritropoezisin azalması genellikle enfeksiyonlarla ilişkilidir. Aplastik krizlerin en önemli nedeni olarak Parvovirus B19 enfeksiyonu gösterilmektedir<sup>101</sup>. Parvovirus B19'un genç eritrosit öncül hücrelerinin farklılaşmasını engellediği ve hemolitik anemiler sırasında görülen geçici eritroid aplaziden sorumlu olduğu gösterilmiştir<sup>110</sup>. Bir hafta içinde kendiliğinden düzelebilir.

### **Megaloblastik Kriz**

Kronik hemolize sekonder OHA'lı hastalarda, folat eksikliğine bağlı olarak eritropoezin durmasından kaynaklanır. Hastalığa bağlı olarak alımın yetersiz olması, vejetaryen beslenme tarzı, hızlı büyüme ve gebelik gibi ihtiyacın arttığı durumlarda megaloblastik kriz riski artabilir<sup>4</sup>.

## **Splenik Sekestrasyon Krizi**

Akut splenik sekestrasyon krizi OHA hastalarında önde gelen ölüm nedenlerinden birisi olup ilk olarak 1945 te tanımlanmıştır<sup>43,82,85</sup>. Henüz otosplenektomi gelişmemiş orak hücre anemili çocuklarda ani gelişen halsizlik, solukluk, batın distansiyonu ve şok bulguları ile seyreder. Hipovolemik şok ve kardiyovasküler yetmezlik hızla gelişebilir<sup>117</sup>.

## **Akut Göğüs Sendromu (AGS)**

OHA hastalarında ikinci en sık hastaneye yatış nedenidir. Akut başlangıçlı ateş, öksürük, takipne, göğüs ağrısı ve akciğer grafisinde yeni bir infiltrasyon mevcuttur.<sup>22,119,133</sup>. En sık iki ve dört yaşları arasında görülür.

Risk faktörleri arasında genç yaş, erkek cinsiyet, HbF düzeyinin düşük olması, lökositoz, yüksek hematokrit, öyküde en az bir kez AGS geçirmiş olmak sayılabilir<sup>13,28</sup>.

## **Santral Sinir Sistemi İle İlgili Olaylar**

Büyüklerde kanamaya bağlı olarak gelişirken sessiz serebral iskemi, serebral inme gibi serebrovasküler olaylar daha çok çocukluk çağında görülür. Beş ve on yaş (median yaş yedi) arasında sık görülür.

İnfarktlar sonucu hemiparezi, konuşma defektleri, fokal nöbetler, yürüme bozuklukları görülen en sık semptomlardır<sup>66,67,69</sup>. İntrakraniyal kanamalarda ise bazen boyun ağrısı ile birlikte ani şiddetli baş ağrısı, vertigo, senkop, nistagmus, pitoz, meningismus, fotofobi vardır<sup>66,69</sup>. OHA'de serebrovasküler olayın kümülatif riski yaşla birlikte artar<sup>43</sup>.

Transkraniyal Doppler (TCD) ultrasonografi büyük intrakranial damarlarda akış hızının ölçülmesi ile inme için en riskli OHA çocukları tespit etmek için kurulmuş bir tarama yöntemidir<sup>18,103,136</sup>. Çocuklarda orta serebral arter akım hızının 200 cm/sn veya daha yüksek oluşu inme riskinin yüksek olduğunu belirtir<sup>66,69</sup>.

## **Enfeksiyonlar**

Ciddi bakteriyel enfeksiyonlar esas mortalite ve morbidite nedenidir<sup>98</sup>. Çocuklukta en önemli ölüm nedeni fırsatçı enfeksiyonlar, sepsis ve menenjittir. Tekrarlayan vazooklüzyonlar nedeniyle dalağın fonksiyon yeteneğini kaybetmesi, enfeksiyonlara karşı IgM ve IgG cevabının bozulması, alternatif kompleman yolunun aktivasyonundaki defektler, makrofajların opsonizasyon ve fagositoz yeteneklerindeki bozukluklar nedeniyle enfeksiyonlara eğilim artmıştır. *Hemofilus influenza tip B*, *Streptococcus pneumonia*, *Salmonella species*, *Klebsiella species*, *Escherichia coli* gibi mikroorganizmalarla enfeksiyonlar sık görülür<sup>30</sup>.

## **Büyüme ve Gelişme**

Normal boy ve kiloda doğmalarına rağmen, oraklaşma sendromu varlığı büyüme ve gelişmeyi etkiler. Yetersiz beslenme, anormal endokrin fonksiyonları ve özellikle yüksek enerji harcamalarından dolayı artan kalori ihtiyacı etyolojik faktörlerdendir. Seksüel maturasyon gecikir, menstruasyon normal popülasyona göre iki-üç yaş geç görülür<sup>108</sup>. Erişkin döneminde boy normal veya normale yakın iken, kilo bakımından geri kalırlar<sup>93,108,122</sup>. Bazı vakalarda hormonal eksiklikler gelişebilir. Kilo bakımından geri kalınmasından, kronik hemolize bağlı olarak ortaya çıkan bazal metabolik hızdaki artış sorumlu tutulmuş ancak tam olarak kanıtlanamamıştır<sup>93,122</sup>.

## **Kemik ve Eklem Hastalıkları**

Orak hücre krizi sırasında sıklıkla yaygın kemik hassasiyeti görülür. Genellikle hassasiyet dışında muayene bulgusu yoktur fakat kırmızılık, ısı artışı ve şişlik olması sellülit veya osteomyelit gibi enfeksiyonları düşündürür. Hareket kısıtlaması ile birlikte kalçada ağrının olması femur başı nekrozunun bir belirtisi olabilir. Kemik nekrozu osteomyelit benzeri belirtilerle kendini gösterebilir ayrıca vertebralarda baskı kırılmalarına neden olabilir. Vertebra grafisinde görülen balık ağzı anomalisi orak hücre hastalığı için karakteristiktir<sup>26</sup>. Çocukluk döneminde hastalığın en erken belirtilerinden biri de daktilitistir (el-ayak sendromu). Bu durum, periost inflamasyonu ile ilişkili kemik iliği nekrozuna bağlı oluşmaktadır. El ve ayakta ağrılı şişlikler, kızarıklık ve ısı artışı görülür. Kemik nekrozları direkt grafilerde görülmeyebilir, en iyi Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) ile tesbit edilir<sup>32</sup>.

Osteomyelit ise en ciddi bulgulardan bir tanesi olup etyolojisinde genelde *salmonella* gibi mikroorganizmalar rol oynar. Artralji, eklem şişliği ve efüzyon OHA'da görülebilen bulgulardandır<sup>107</sup>.

### **Kardiyovasküler Sistem**

Kronik anemi ve kompanzatuvar olarak artmış kardiyak debi sonucu çoğu hastada anormal kardiyak bulgular mevcuttur. Fizik muayenede en yaygın bulgular sistolik ejeksiyon üfürümü, suprasternal çentikte trill ve diastolik üfürümdür. EKO'da sağ ve sol ventrikül dilatasyonu, EKG'de uzun QT sendromu görülebilir<sup>99</sup>. Pulmoner hipertansiyon en önemli kardiyak komplikasyonlardan biridir, OHA'lı çocuklarda prevalansı %30 civarındadır ancak prognostik önemi ve doğal seyri henüz bilinmemektedir<sup>81</sup>. Patogeneizde artmış hemoliz ve NO biyoyararlanımında azalma sorumlu tutulmaktadır. Pulmoner arter sistolik basıncının > 25 mmHg, TRV (triküspit regürjitant jet akım) >2,5 m/sn olması ile tanı koyulur. Ayrıca transfüzyon ilişkili miyokarda demir birikimine bağlı dilate kardiyomiopati görülebilir.<sup>27</sup>

### **Hepatobiliyer ve Gastrointestinal Sistem**

Safra kesesi taşları, hepatik kriz ve transfüzyon ilişkili hepatit sonucu OHA'lı çocuklarda karaciğer ve safra yolları anormallikleri yaygın olarak görülür. Safra kesesi taşları kronik hemolize sekonder bilirubin dönüşümü sırasında oluşur. Hemolizin şiddetiyle doğru ilişkili olarak iki yaş civarında görülebilir<sup>55</sup>. İntrahepatik kolestaz daha nadirdir<sup>56</sup>.

Hepatomegalinin akut olarak gelişmesi sekestrasyona veya portal ven trombozuna bağlı olabilir<sup>103</sup>.

### **Göz bulguları**

OHA'lı hastalarda retinal değişiklikler "oraklaşma retinopatisi" olarak adlandırılır<sup>114</sup>. Proliferatif ve proliferatif olmayan değişiklikler olmak üzere klinik bulguları mevcuttur. Proliferatif formda retinal damar tıkanıklığı sonucu arteriyovenöz anevrizma ve neovaskülarizasyon görülür. Bu durum kanama, skar oluşumu, retina dekolmanı ve körlük ile sonuçlanabilir<sup>114,121</sup>. Proliferatif olmayan formda tedaviye ihtiyaç duyulmaz.

Ani görme kaybında acil bir durum olan santral retinal arterin tıkanıklığı düşünülmalıdır<sup>2,121</sup>

### **Bacak Ülserleri**

Kronik bacak ülserleri, 10 yaşından önce nadir olmakla birlikte OHA'lı yetişkinlerde daha yaygındır, homozigot erkekler etkilenir. Ülserler medial ve lateral malleoller üzerinde ortaya çıkar. Sıklıkla bilateral olarak görülür, genellikle patojenik bakterilerle kolonize olur ve tabanını sarı, pürülan bir tabaka örter<sup>89</sup>.

### **Genitoüriner Sistem**

Böbrekte eritrositlerde oraklaşma renal medullanın asidik, hipoksemik ve hiperozmolar ortamında daha fazla görülür. Hipostenüri ilk görülen belirtidir<sup>51</sup>. Renal papillanın tıkanmaları sonucunda idrar konsantre edilemez. Taşıyıcılarda da bu durum görülebilir ve hematüriye neden olur. Tübüler disfonksiyon, atrofi, interstisyel nefrit, papiller nekroz, piyelonefrit, nefrotik sendrom diğer olası komplikasyonlardır<sup>19</sup>.

Priapizm vazookluziv duruma bağlı kan akım hızının azalmasına bağlı ağrılı ve devamlı penis ereksiyonudur. Mantadakis ve ark. tarafından ortalama başlama yaşı 12 yaş olarak bildirilmiştir<sup>86</sup>. Korpus kavernozumdaki fibrozis impotansa yol açabilir<sup>20</sup>.

### **2.1.6 Tanı**

OHA tanısı Hb elektroforezi, oraklaşma testi ve aile çalışması ile konulur. OHA ve orak hücre taşıyıcılığı ayırımı için oraklaşma testi yetersiz kalır. Böyle durumlarda yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile doğru ve hızlı tanı koymak mümkündür. Hastalarda mutasyonun saptanması ve doğum öncesi tanı için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi kullanılır. Hasta ebeveynlerinden her ikisi de HbS taşıyıcısı ise hasta OHA olarak kabul edilir. Ancak bir ebeveyn HbS taşıyıcısı, diğeri β talasemi taşıyıcısı ise hasta Sβ talasemi olarak değerlendirilir. Tanı genellikle çocukluk çağında konur. Ancak özellikle çift heterozigot (Hb S/β, Hb S/C...) durumunda olan hastaların puberte başlayana kadar bulgu vermeyeceği akılda tutulmalıdır<sup>68</sup>.

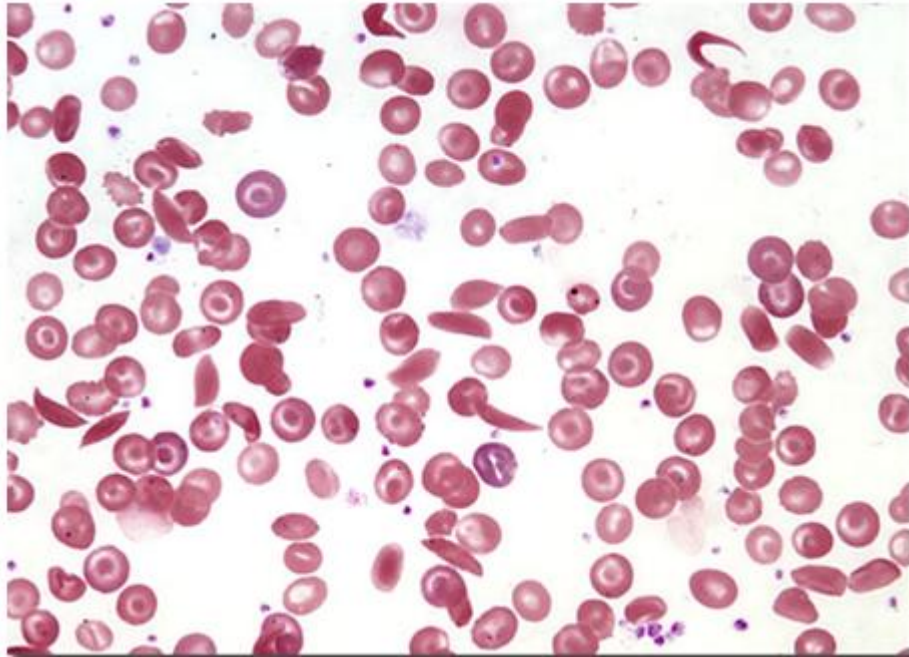
Hastaların Hb düzeyleri genellikle 5-11 g/dl arasındadır. Ortalama eritrosit volümü (MCV), ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) düzeyi normal,

kırmızı küre dağılım genişliği (RDW) düzeyi artmış, normokrom normositer bir anemi vardır<sup>14,70,75</sup>.

Periferik yaymada oraklaşmış eritrositler, hedef hücreler, retikülositozu gösteren polikromazi, hiposplenizmi gösteren Howell-Jolly cisimcikleri görülebilir (Şekil 3).

Sβ talasemide ise bunlara ek olarak hipokromi ve mikrositoz bulunmaktadır. Enfeksiyon olmadan lökositoz ve sola kayma saptanabilir. Trombositoz HbSS hastalarında ve 18 yaş altında yaygındır. Kemik iliğinde eritroid hiperplazi görülür. İmmün globulin düzeyleri sıklıkla artmıştır<sup>77</sup>.

Plazma çinko ve E vitamin düzeyleri düşüktür<sup>92</sup>. Serum ferritin düzeyleri hayatın ilk yıllarında normal sınırlardadır, yaşla beraber yükselme eğilimindedir. Kronik transfüzyon tedavisi alan hastalarda yüksek ferritin düzeyleri ve demir yükünde artış olur ancak demir yüklenmesi talasemideki kadar sık değildir<sup>95</sup>.



Şekil 3. OHA'de periferik kan yayma örneği<sup>53</sup>

## 2.1.7 Tedavi

### Enfeksiyonların tedavisi

OHA'lı hastalarda ateş ve enfeksiyonlar hastaneye en sık başvuru nedenleri arasında yer almaktadır. Ateşi olan her OHA'lı hasta enfeksiyon yönünden ayrıntılı olarak değerlendirilmeli ve enfeksiyon varlığı dışlanana kadar parenteral geniş spektrumlu 3. kuşak sefalosporinlerle tedavi edilmelidir. Ateşi olan her OHA'lı hasta acil olarak kabul edilmeli ve Tablo 1'de özetlenen bulguları olan hastaların hastaneye yatırılarak tedavisi düşünülmelidir. Her hastaya tanıdan itibaren penisilin profilaksisi başlanmalı, Pnömonok ve H. influenza aşılarının yapılması önerilmelidir. Protein konjüge pnömokok aşısı sağlıklı çocuklarda olduğu gibi OHA'lı hastalara 2., 4., 6. ve 12.-15. aylarda önerilmeli, bebek 24 aylık olduğunda ise tek doz 23 valanlı pnömokok aşısı yapılmalıdır. Ayrıca her 3-5 yılda bir bu aşının tekrarı önerilmelidir<sup>29,97</sup>.

**Tablo 1. Ateşi olan OHA'lı hastalarda hastanede klinikte izleme endikasyonları<sup>97</sup>**

3 yaş altında ve ateşi 38.6°C üzerinde olan tüm OHA'lı hastalar
Ateşi 40°C üzerinde olan tüm OHA'lı hastalar
Septik görünüm
Peteşi ve purpura varlığı
Hipotansiyon
Santral venöz kateter varlığı
Geçirilmiş streptokok pnömoniye bağlı bakteriyemi öyküsü Aşağıdaki akut komplikasyonların varlığına bağlı belirtilerin olması; -Pulmoner komplikasyonlar -Aplastik kriz -Sekestrasyon krizi -İnme yada diğer nörolojik bozukluklar -Priapizm
Beyaz küre sayısının $30 \times 10^9/L$ üzerinde yada $5 \times 10^9/L$ altında olması
Trombosit sayısının $150 \times 10^9/L$ altında olması
Daha önceki Hb düzeyine göre düşüklük

## **Komplikasyonların Tedavisi**

### **-Ağrılı Kriz**

Öncelikle ağrıyı oluşturabilen faktörlerden (soğuk, asidoz, enfeksiyon, dehidratasyon, düşük oksijen, aşırı egzersiz, psikolojik ve fiziksel stres, yüksek irtifada bulunmak) kaçınılmalıdır ve hasta eğitimi sağlanmalıdır. Oral analjezikler ile kontrol altına alınabilen ve oral sıvı alımının yeterli olduğu komplikasyonsuz ağrılı krizler evde tedavi edilmelidir.

Hastanın ağrıları parenteral tedavi gerektiriyorsa ve/veya ağızdansıvı alamıyorsa ve birlikte komplikasyon mevcutsa hastaneye yatırılarak izlenmelidir. Tüm hastalara yatak istirahati önerilmelidir<sup>97</sup>. Ağızdan yeteri kadar sıvı alamayan hastalara 5-10 ml/kg, bir saatte olacak şekilde sıvı yüklemesi yapıp daha sonra günlük idame sıvısının 1-1.5 katı kadar sıvı 23 saatte verilmelidir. Hipoksiyi önlemek için oksijen verilmelidir<sup>97</sup>.

Hastaların ağrı şiddetine göre;

1. Hafif ağrıda; narkotik olmayan analjezikler ve yardımcı tedaviler,
2. Orta şiddette ağrıda; zayıf narkotik veya düşük doz kuvvetli narkotik analjezikler, narkotik olmayan analjezikler ve yardımcı tedaviler,
3. Şiddetli ağrıda; kuvvetli narkotik analjezikler, narkotik olmayan analjezikler ve yardımcı tedaviler önerilmelidir.

Yardımcı tedaviler; trankilizanlar, laksatifler, antihistaminikler, antiemetikler ve psikoterapiden oluşmaktadır.

### **- Splenik Sekestrasyon Krizi**

Hastalara şok bulguları açısından yakın kardiyak monitorizasyon takibi, hematokrit takibi yapılmalıdır. Sıvı tedavisi ve kan transfüzyonu ile dokulara oksijen gidişi artırılmalıdır. Tekrarlayan vakalarda splenektomi düşünülebilir<sup>37</sup>.

### **-Bacak Ülseri**

Akut dönemlerde bacak elevasyonu, yatak istirahati ve pansuman gibi lokal uygulamalar yapılmalıdır. Ülserler çoğu zaman enfekte olur, bu dönemde sistemik olarak uygun antibiyotik tedavisi başlanmalıdır. Uzun süre iyileşmeyen ve hızlı ilerleyen bacak ülserlerinde kan transfüzyonu ve deri grefti uygulanabilir<sup>118</sup>.

### **-Retinal Bozukluklar**

Yeni damar oluşumu ve anevrizma, retinada hemorajilere ve körlüğe yol açabilir. Nifedipin, retinal ve konjonktival perfüzyonu olumlu yönde etkileyebilir. Uygun vakalarda lazer ile fotokoagülasyon ve kriyokoagülasyon tedavisi uygulanır<sup>121</sup>.

### **-Priapizm**

Evde kısa süreli ataklarda oral sıvı alımının artırılması, analjezi kullanımı, ılık pansuman önerilir. Dört saatten uzun süren ataklarda ise geri dönüşümsüz iskemik zedelenmeye nedeniyle üroloji konsültasyonu, intrakavernozal aspirasyon ve alfa agonistlerin verilmesi, devam eden vakalarda basit transfüzyon ya da kan değişimi önerilir. Ergenlikten sonra 12-24 saatten uzun süren priapizmi olan hastalarda şant operasyonu düşünülebilir<sup>88</sup>.

### **-Santral Sinir Sistemi Olaylarının Tedavisi**

Hemoraji olan hastalarda ulaşılabilen anevrizmaların ligasyonu şeklinde cerrahi tedavi yapılabilir<sup>94</sup>.

İskemik inme durumunda doku oksijenizasyonunu artırmak için kan değişimi ile HbS %30'un altına düşürülmelidir. İnme ataklarını önlemek amacıyla düzenli kan transfüzyonu yapılmalıdır. Hiperviskositeye neden olmamak için hemoglobin değerini 10 gr/dl'nin üzerine çıkarılmasından kaçınılmalıdır. Transkranyal doppler ultrasonografi ile izlem yapılmalıdır<sup>128</sup>.

Konvulsiyonlar için sedasyon, oksijen desteği verilebilir. Ağrı için analjezikler, hemipleji gibi durumlarda fizik tedavi faydalı olabilir.

### **-Akut Göğüs Sendromu (AGS)**

AGS düşünölen OHA'lı tüm hastalar hastaneye yatırılarak izlenmelidir. Oksijen saturasyonunu %94'ün üzerinde tutacak şekilde oksijen verilmelidir<sup>124,125</sup>. Pnömoni ile ayırıcı tanı yapıncaya kadar Streptococcus pneumoniae ve Mycoplasma pneumoniae'yı kapsayan geniş spektrumlu ampirik antibiyotikler başlanmalıdır<sup>22</sup>. İntravenöz hidrasyon uygulanmalı, hidrasyonun fazla verilmesi durumunda pulmoner ödem açısından dikkatli olunmalıdır.

Analjezikler ile hastanın ağrısı azaltılmalıdır. Non steroid antiinflatuvar ilaç ile kontrol altına alınamayan ağrılar narkotik analjeziklerle giderilebilir. Basit transfüzyon ve kısmi eritrosit değişimi kanın oksijen taşıma kapasitesini arttırabilir<sup>34</sup>. Hidroksiüre kullanımı hastanede yatış ve transfüzyon ihtiyacını azaltmaktadır<sup>23</sup>.

### **Transfüzyon Tedavileri**

OHA'de kan transfüzyonu oksijen taşıma kapasitesini arttırmak ve dolaşımdaki HbS miktarının azaltılması için kullanılır. Böylece gelişebilecek komplikasyonların tedavisi ve önlenmesinde kullanılır.

Transfüzyon için kullanılacak kan; lökosit filtreli ve yaygın minör E, C ve Kell antijenleri için uyumlu olmalıdır<sup>137</sup>. Bu nedenle bütün yeni tanı almış OHA'lı hastaların eritrosit alt gruplarına bakılmalıdır.

Eritrosit transfüzyonu, anormal eritrositleri dilüe etmek suretiyle oraklaşmayı azaltır ve geçici olarak hastada anormal eritrosit yapımını baskılar. Normal eritrositler kan viskozitesini azaltır. Kronik transfüzyon tedavisi OHA'nın çeşitli komplikasyonlarını önler ancak viral hepatit, hemokromatozis ve alloimmünizasyon gibi yaşam kalitesini, süresini etkileyen komplikasyonlara neden olabilmekte ve bu riskler kullanımını kısıtlamaktadır<sup>109</sup>.

Transfüzyon tedavisi; basit transfüzyon, kronik basit transfüzyon, kısmi yada tam kan değişimi şeklinde yapılabilir.

Basit transfüzyon hastanın hemoglobini 5 g/dL'nin altına düştüğü durumlarda veya ani hemoglobin düşüşlerinde yapılmalıdır. Bunlar aplastik kriz, splenik ve hepatik sekestrasyon krizleri, kanama ve kalp yetmezliğinin geliştiği durumlardır<sup>95</sup>.

Kısmi eritrosit değişimi, HbS içeren eritrositleri HbA içeren eritrositlerle değiştirerek dokuların oksijenlenmesini artırmak ve oraklaşmayı azaltmak amacıyla yapılır.

Kronik kan transfüzyonu, bazı komplikasyon durumlarında uygulanır. Örneğin, serebrovasküler olay geçiren çocuklara 2-5 yıl süreyle kan transfüzyonu yapılarak HbS oranı %30'un altında tutulmaya çalışılır (Tablo 2). Bu tedavi yaklaşımı OHA'ya bağlı inme, vazookluzif kriz gibi komplikasyonların insidansında azalma sağlar.

**Tablo 2. OHA'da transfüzyon endikasyonları**<sup>97</sup>

	<b>Basit transfüzyon</b>	<b>Kronik basit transfüzyon</b>	<b>Kan değişimi</b>
<b>Önerilen durumlar</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Semptomatik anemi</li> <li>-Akut nörolojik bulgu</li> <li>-Akut göğüs sendromu</li> <li>-Akut oklu organ yetmezlięi</li> <li>-Cerrahi öncesi</li> <li>-Akut splenik veya hepatik sekestrasyon</li> <li>-Sepsis ve menenjit</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-İnmenin önlenmesi</li> <li>-Tekrarlayan akut göğüs sendromu veya çoklu organ yetersizlięinin önlenmesi</li> <li>-Böbrek yetersizlięi ve anemisi olan ve eritropoetin tedavisine cevap vermeyenler</li> <li>-Pulmoner hipertansiyon veya kronik hipoksi</li> <li>-Kronik kalp yetersizlięi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Akut nörolojik bulgu</li> <li>-Ağır akut göğüs sendromu</li> <li>-Akut oklu organ yetersizliği</li> <li>-Cerrahi öncesi</li> <li>-Hipervolemi ve hiperviskoziteden kaçınmak</li> <li>-Demir birikimini azaltmak</li> </ul>
<b>Tartışılan durumlar</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Kontrast madde kullanımından önce</li> <li>-Ciddi göz komplikasyonları</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Tekrarlayan ciddi ağrılı kriz atakları</li> <li>-İyileşmeyen bacak ülserleri</li> <li>-Tekrarlayan priapizm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Akut priapizm</li> </ul>

## **Şelasyon Tedavisi**

Hasta düzenli transfüzyonun birinci yılını doldurduğunda ve/veya on iki transfüzyon sonrası ve stabil dönemde serum ferritini 1000 ng/mL düzeyine ulaştığında demir şelatörünün başlanması önerilmektedir<sup>97</sup>.

## **Hidroksiüre Tedavisi**

Ribonükleozidleri deoksiribonükleozidlere dönüştüren enzim olan deoksiribonükleotid redüktazı inhibe ederek DNA sentezini inhibe eden antimetabolit ajandır. Hücrelerin replikasyonunun S fazında durmasına neden olur, HbF yapımını stimüle eder. Eritrositlerin vasküler endotele adezyonunu azaltır<sup>123</sup>.

Genel yaklaşım 15-25 mg/kg/gün ile tedaviye başlanmasıdır. Kan sayımı takibine göre on iki haftada bir doz 5mg/kg/gün arttırılır ve maksimum doz 35mg/kg/gündür. Hidroksiüre tedavisinin en yaygın yan etkisi miyelosupresyondur. Tedaviden dört-oniki hafta sonra HbF düzeyinde %5-15 ve hemoglobin düzeyinde 1 g/dl artış beklenebilir<sup>64</sup>.

## **Hematopoitik Kök Hücre Nakli (HKHN)**

Johnson ve arkadaşları tarafından ilk kez 1984 yılında akut myeloid lösemisi olan OHA'lı sekiz yaşında bir kız çocuğuna HKHN uygulaması yapılmıştır<sup>57</sup>, 1996 yılında Walters ve arkadaşları 22 olguluk ilk geniş seride 2 yılda %90'lık yaşamda sağkalım bildirmişlerdir<sup>135</sup>.

Tam HLA uyumlu kardeş donörden yapılan kök hücre nakillerinde hayatta kalma oranı %90'ın üzerinde olup hastaliksız yaşam oranı yaklaşık %85'tir<sup>15,132</sup>.

Aşağıdaki komplikasyonların varlığında HKHN önerilir;

- İnme veya 24 saatten uzun süren nörolojik bulgu,
- Anormal beyin MR ve anjiyografisi ile birlikte nöropsikolojik fonksiyon bozukluğu,
- Tekrarlayan AGS,
- Tekrarlayan damar tıkaçıcı krizler veya tekrarlayan priapizm,
- Orak hücre nefropatisi (Glomeruler filtrasyon hızının %30-50'nin altında olması)<sup>135</sup>.

## **Diğer Tedavi Seçenekleri**

Günümüzde, hücresel düzeyde tedavilerin araştırılması ön plandadır. Bunlardan doğal öldürücü T hücre hedefli tedavi henüz faz-1 aşamasındadır<sup>1,38,134</sup> Gen tedavisi ise 2015 yılında Avrupa’da on üç yaşındaki sık vazookluziv kriz sessiz infarkt ve akut göğüs sendromu nedeniyle düzenli transfüzyon alan hasta, busulfan tedavisi sonrası (Lentiviral vektör aracılığıyla beta globilin geni transfer edilmiş) otolog kemik iliği transplantasyonu sonrası üç ay içinde kan transfüzyonuna ihtiyaç kalmamış dokuz ay içinde de orak hücre anemili ilişkili ağır semptomlar gerilemiştir. Ancak bu alandaki çalışmalar sürmektedir<sup>38</sup>.

## **2.2 MikroRNA**

MikroRNA(miRNA), genom üzerinde protein kodlayan intron veya ekzon bölgeleri ve protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkripsiyonu sağlanan, fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen 19-25 nükleotid uzunluğunda RNA’lardır<sup>91</sup>.

miRNAların büyük çoğunluğu protein kodlayan genlerin intronik bölgelerinde bulunmakla birlikte genler arası bölgelerde veya ekzonlarda da bulunabilir. İntergenik olan miRNA genlerinin ekspresyonu küme halinde bulunan diğer miRNA lar ile kontrol edilir. İntronik bölgelerde bulunan protein kodlayan genler ise konak genlerinde olduğu gibi sıklıkla aynı zincirden ve korele düzeylerde eksprese olurlar<sup>100</sup>.

DNA dan transkripsiyonu yapılan ancak proteine çevirisi yapılmayan genler tarafından kodlanan miRNA lar, hedef genin mesajcı RNA(mRNA) lara düşük özgüllükte bağlanmasına, mRNA yıkımına ve translasyonel inhibisyona neden olabileceği için gen ifadesinin kontrolünde önemli rol oynar<sup>73</sup>. miRNA’ların hedef mRNA ile komplementerliği tam ise mRNA nın parçalanmasıyla, komplementerlik daha az ise translasyonun baskılanmasıyla sonuçlanır<sup>100</sup>.

Bu mekanizma ile miRNA lar gelişme, farklılaşma, sağkalım, apoptozis, yaşlanma ve metabolizma gibi çeşitli biyolojik olayların kontrolünde görev alırlar<sup>106,127</sup>

Victor Ambros laboratuvarında küçük geçici RNA olarak tarif edilen linage-4 (lin-4) miRNA ailesinin ilk keşfedilen üyesi olup 1993'te Lee ve arkadaşları tarafından *C.elegans*'ın gen içeriği bakımından taranırken bulunmuştur<sup>106,79</sup>.

2000 yılında Reinhart ve ark. *C.elegans* da 22 nükleotid uzunluğunda let-7 olarak adlandırılan canlının gelişim zamanlamasını düzenleyen farklı bir miRNA keşfetmişler ve bu molekülün *C.elegans*'da lin-41, lin-28, lin-42 ve daf12 mRNA'larının fonksiyonlarını baskıladığı bildirilmiştir<sup>106</sup>.

2002 yılında ise miRNA'ların kanserle ilişkisi belirlenmiş ve miR-15 ve miR-16'nın kronik lenfositik lösemide ekspresyonunun azaldığı ya da hiç sentezlenmediği belirlenmiştir.

2006 yılında ise Andrew Fire ve Craig Mello isimli bilim adamları küçük engelleyici RNAlar (siRNA) ve miRNA adı verilen RNA parçacıklarının aracılığıyla gerçekleşen ve gen ifadesinin susturulmasını sağlayan bir mekanizma olan RNA interferansı konusunda yaptıkları çalışma ile Nobel ödülü almışlardır<sup>39</sup>.

Daha sonraki yıllarda lin -4 ve let-7 ye benzeyen birçok küçük RNA molekülü hemen hemen bütün çok hücreli organizmalarda keşfedilmiş ve miRNA olarak isimlendirilmiştir<sup>10</sup>.

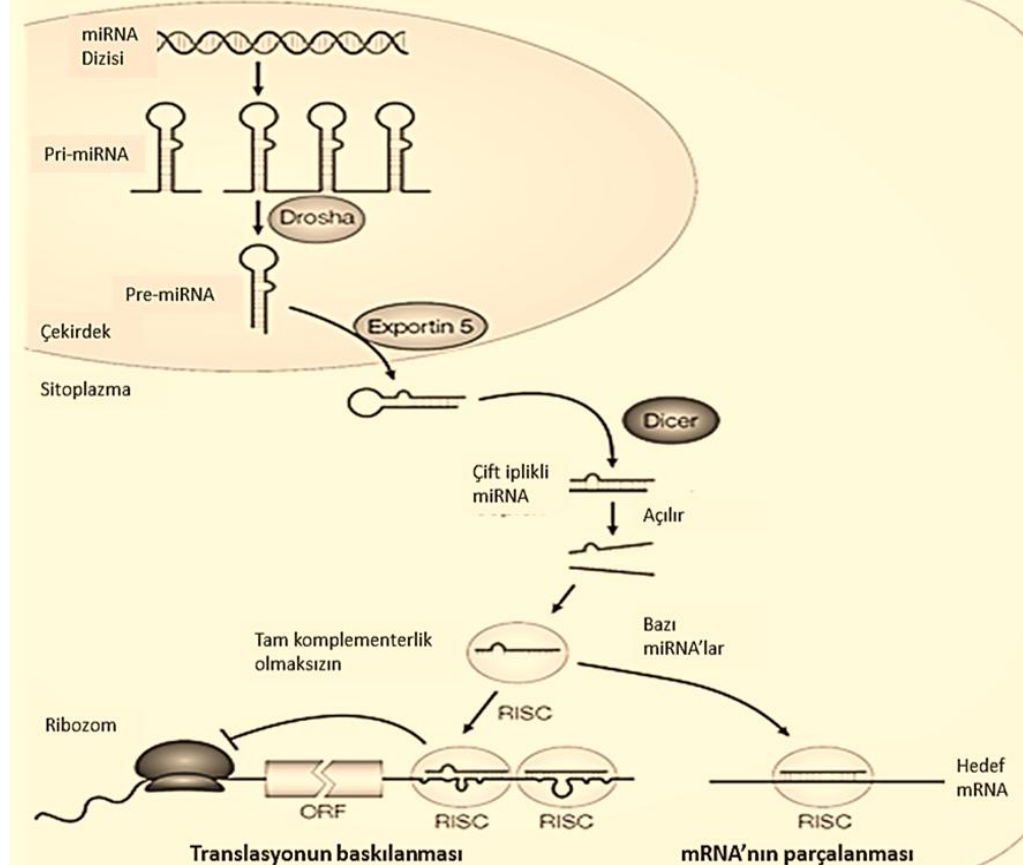
### 2.2.1. MikroRNA'ların Biyogenezi

MikroRNA'lar birbirini izleyen üç basamaklı işlem sonucunda meydana gelir. İlk basamakta miRNA genlerinden primer miRNA (pri-miRNA)'ların transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci basamakta primimiRNA'lar prekürsör miRNA (pre-miRNA)'lara nükleus içinde dönüştürülür. Üçüncü ve son basamakta olgun miRNA'ların sitoplazma içinde oluşumu gerçekleşir<sup>76</sup>.

miRNA'lar, primer transkript (pri-miRNA) olarak RNA polimeraz II enzimi tarafından genomik DNA'dan sentezlenir. Pri-miRNA (500-3000 baz), "CAP" ve "poli A" kuyruğuna sahip sap-ilmik yapısındadır (Şekil-4). Çekirdekte pri-miRNA, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazi olan Drosha ve kofaktörü Pasha tarafından yaklaşık olarak 70 nükleotid uzunluğunda olan pre-miRNA'ya dönüştürülür<sup>80,84</sup>. Bir nükleaz olan Drosha ile çift iplikli RNA bağlayıcı bir protein olan Pasha'nın oluşturduğu bu

komplekse mikro işlemci kompleks (Mikroprocessor complex) adı verilir<sup>36,115</sup>. Pre-miRNA molekülü bir nükleer taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve nükleer bir protein olan Ran-GTP'ye bağımlı şekilde sitoplazmaya taşınır. Sonrasında, pre-miRNA'lar sitoplazmada RNAaz III enzim ailesinden Dicer adlı endonükleaz ile kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA (miRNA dubleksine) çevrilir<sup>76,115,131,140</sup>. Dicer, aynı zamanda RNA ile başlatılan susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu başlatır (Şekil 4). Dicer, pre-miRNA'nin sap-ilmliğini kestikten sonra miRNA dubleksinden, RISC kompleksinin içinde yer alan bir RNAz olan argonaute'un etkisiyle 5'ucu daha kararlı olanı seçilip sadece biri miRNA RISC kompleksine katılır. Bu iplik, kılavuz iplik (guide strand) olarak adlandırılırken diğer iplik anti-kılavuz veya yolcu iplik olarak adlandırılır. Yolcu iplik RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir. MikroRNA'lar, RISC kompleksine entegre olduktan sonra, ya argonaute proteinleri yardımıyla mRNA'nin yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olarak fonksiyon görürler<sup>12,45,84,115</sup>.

Şekil 4. miRNA biyogenezisi<sup>48</sup>



### 2.2.2.MikroRNA İzolasyonu ve Tesbiti

Bir hücre içerisinde anlatılan miRNA miktarını kantitatif olarak ölçmek için değişik metodlar kullanılmaktadır. miRNA saptama metodlarının temel prensibi dokuda, hücrede, vücut sıvısı veya izole edilen RNAda mevcut miRNA ile ters yönde sentezlenen işaretli almanın birbirine eşleşmeleridir. Ancak işaretli prob gerektirmeyen metodun duyarlılığına göre gerekli olan örnek ve/veya prob miktarı değişmekle birlikte, hibridizasyon sonrası gerekli yıkamalarla eşleşmeyen problemler ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra eşleşen probdan gelen sinyal ile örnekte bulunan miRNA miktarı arasında doğru bir orantı kurulmaktadır. Kullanılan metodun prensibine göre değişik işaretleme ve yöntemler kullanılacağı gibi değişik sinyal toplama yöntemleri de kullanılabilir. Örneğin canlı hücrelerde, dokularda veya parafinle sabitlenmiş doku örneklerinde miRNA saptama için in situ hibridizasyon (ISH) metodu tercih edilmektedir<sup>46</sup>.

miRNA ifade miktarlarını belirlemek için daha ziyade örneklerden izole edilen ve 200 nükleotitten küçük RNA'lar bakımından zenginleştirilmiş toplam RNAlar kullanılmaktadır. Şayet anlatımı analiz edilecek miRNA türü biliniyor ve sınırlı sayıda miRNA anlatımı analiz edilecekse, genellikle tercih edilen yöntem northern blot ya da RNAz koruma (RNase Protection Assay, RPA) metodlarıdır<sup>120,130</sup>. Deneysel kurguya göre sıvı fazda tek molekül saptama ve in situ hibridizasyonda miRNA saptamada kullanılmaktadır. Ancak, genomik seviyede miRNA tarama çalışmaları için daha az prob ve RNA gerektiren makrodizin ve mikrodizin veya kPZR teknikleri tercih edilmektedir<sup>74,91,120</sup>. Bunlara ilave olarak SAGE (Serial analysis of gene expression) ve derin DNA dizi analizi teknikleri de global miRNA profilleme çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. SAGE ve derin DNA dizi analizi bilinen miRNA profilini çıkarmaya olanak tanıdığı gibi yeni miRNA tanımlanmasına da imkan tanımaktadır. Hiç şüphesiz miRNA saptamada kullanılacak tekniğin seçiminde hücreden elde edilebilecek RNA miktarı, analiz edilecek miRNA sayısı, tekniğin duyarlılığı ve güvenilirliği, data analiz programlarının bulunup bulunmaması, fiyat ve iş yükü göz önünde bulundurulması gereken unsurlar arasında yer almaktadır. Bizim çalışmamızda gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kullanılacaktır.

## Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gerçek zamanlı polimeraz zincirleme tepkimesi (RT-PCR, real-time polymerase chain reaction) temeli polimeraz zincirleme tepkimesine dayanan, DNA moleküllerini çoğaltmaya ve eş zamanlı olarak miktarını ölçmek için sıklıkla kullanılan bir laboratuvar tekniğidir. Bu tekniğe nicel gerçek zamanlı polimeraz zincirleme tepkimesi (qPCR - quantitative real time polymerase chain reaction) ya da kinetik polimeraz zincirleme tepkimesi denilmektedir. RT-PCR'ı iyi anlayabilmek için öncelikle PCR (polimeraz zincirleme tepkimesi) iyi anlaşılmalıdır. PCR, tek ya da az sayıda DNA molekülünü kopyalama yoluyla milyonlarca kopya haline getirmek için kullanılan yarı-nicel bir tekniktir. PCR, sırasıyla ve mükerrer olarak, ısıyla DNA moleküllerinin birbirinden ayrılması ve tekrar soğutulmuş başlatıcı denilen diziye özel küçük DNA parçalarının (oligonükleotidler) tepkimeyi başlatması sonucu, DNA'nın kopyalanması esasına dayanır.

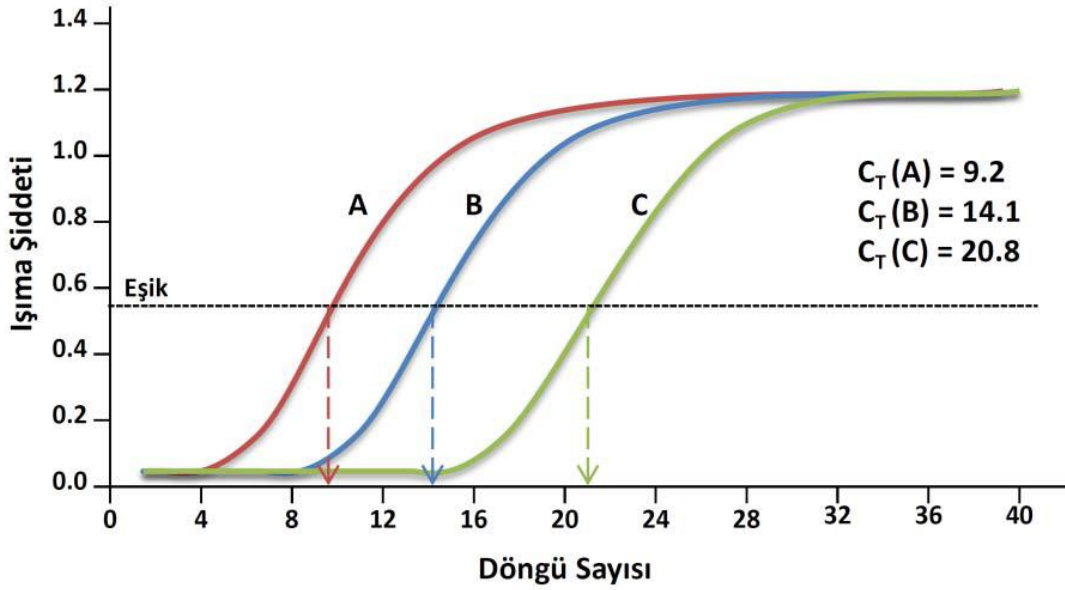
Bir PCR tepkimesi çift sarmallı DNA molekülünün 95°C'ye ısıtılarak sarmalın çözülmesi ile başlar. Daha sonra, ısıyı 50–60°C'e düşürerek çoğaltılmak istenen DNA dizisinin 3' uçlarına özel olarak tasarlanan sentetik oligonükleotidlerin DNA'ya bağlanması sağlanır. Tepkime tüpünde bulunan deoksiniükleotidler (dNTP) ısıya dayanıklı Taq polimeraz enzimi ile yeni DNA molekülünün sentezlenmesi için kullanılırlar. Bu enzim kaplıca gibi sıcak kaynak sularında yaşayan *Thermus aquaticus* bakterilerinden elde edilir. Bu enzim ısı tekrar 95 °C'e çıkarıldığında dahi yapısını korur ve 72 °C kadar olan sıcaklıkta katalitik olarak görev yapabilir. Sentez işlemi bitince tepkime tüpü tekrar 95 °C çıkarılır ve bütün işlem tekrarlanır. Bu tekrarlama işlemi sonucunda istenilen DNA dizisi kopyalanmış ve yaklaşık 20 döngü sonunda tek bir DNA molekülünün bir milyondan fazla kopyası yapılmış olur. Bu işlem sırasında kopyalanması istenilmeyen DNA dizileri kopyalanmaz ve tek kopya halinde kalırlar.

Bütün tepkime işlemi sonrasında, DNA molekülleri etidyum bromid içeren akrilamid jellere yüklenir ve boyutlarına göre ayrılır. Bu sayede kopyalanmış DNA molekülleri görüntülenebilir. Bütün tepkime tüplerindeki örnekler aynı işlemde geçtikleri için, akrilamid jel üzerinde farklı DNA bant büyüklükleri, örnekler arasında farklı DNA miktarı olduğunu; bu da bize başlangıçta örnek tüplerinde istenilen DNA miktarlarının farklı olduğunu belirtir. Böylece farklı örnekler birbirlerine göre değerlendirilmiş olurlar. Ancak, PCR yönteminin dezavantajlarından biri döngü sayısı

arttıkça örneklerin kopyalanmasında DNA miktarının plato denilen doymuşluk seviyesine ulaşması ve akrilamid jel üzerinde yorum yapmayı zorlaştırmasıdır. Bu doymuşluk seviyesi sorununu aşabilmek için her döngüden sonra DNA miktarının gerçek zamanlı olarak ölçüldüğü RT-PCR tekniği gibi teknikler kullanılmaktadır. RT-PCR, her PCR döngüsünden sonra tepkime tüplerindeki DNA miktarının akrilamid jellere gerek kalmadan ölçülmesi temeline dayanan karmaşık ve sıklıkla kullanılan bir tekniktir. RT-PCR ihtiyaçlar doğrultusunda tasarlanmış gelişmiş bir PCR yöntemidir. RT-PCR'ın PCR'a göre daha avantajlı olmasının sebeplerinden biri de, PCR'da gerek duyulan nanogram ( $10^{-9}$  g) seviyesindeki başlangıç materyaline oranla pikogram ( $10^{-12}$  g) ve hatta femtogram ( $10^{-15}$  g) seviyelerindeki başlangıç materyalleriyle de kullanılabilmesidir. Bu hassasiyet özelliği, RT-PCR'da etidyum bromid yerine kullanılan ışınır (floresan) moleküllerden kaynaklanır. Son yıllarda, gerçek zamanlı DNA sentezinin görüntülenmesi amacıyla farklı ışınır moleküller geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Bunlar arasında yüksek hassasiyet ve kolay kullanım kapasiteli SYBR\_Green molekülü öne çıkanlardan birisidir. SYBR\_Green, çift sarmallı DNA moleküllerine bağlanması sonucu belli dalga boyunda uyarılarak yine belli dalga boylarında ışımaya yapar. Tepkimede döngü sayısı ilerledikçe daha fazla çift sarmallı DNA molekülü sentezlendiği için daha fazla SYBR Green DNA'ya bağlanır ve daha fazla ışımaya yapar. Her döngü sayısından sonraki DNA miktarı aynı zamanda başlangıçta tüplerde bulunan DNA miktarıyla doğru orantılıdır. Her döngü sonunda tepkime tüplerindeki ışımaya miktarını ölçerek, tüplerdeki çift sarmallı DNA moleküllerinin miktarını da belirlemiş oluruz.

Bu zincirleme tepkimelerinde RT-PCR makineleri kullanılır. Bu makineler aynı anda hem DNA miktarını çoğaltırlar hem de ışımaya miktarını ölçerler. Bünyesinde hem bir thermal cycler (içinde tepkime tüplerinin yerleştirildiği, hızlıca ısıtılan ve soğutulan ısı bloğu bulunduran cihaz, bu sayede DNA kopyalanmasını sağlar) hem de bir fluorimeter (farklı dalga boylarında ışık üreterek tüplerdeki molekülleri uyarabilen –bu örnekte SYBR Green- ve aynı zamanda uyarılan moleküllerin yaptığı farklı dalga boylarındaki ışımayı ölçebilen cihaz) bulundurur. Bu cihazın yapılan ışımayı ölçebilmesinin bir eşik değeri vardır. Bu eşik değerinin altındaki bütün sinyaller yokmuş gibi değerlendirilir. Zincirleme tepkimesi ilerledikçe, bu eşik değerine daha erken döngülerde (düşük döngü sayısı) ulaşan örnekler, başlangıç örneğinde daha çok

istenilen DNA dizisinin varlığını belirtir. Bu değere döngü eşiği (CT – cycle threshold) değeri denir (bkz. Şekil 5). CT değeri, eşik değerine ulaşılması için gereken döngü sayısı olarak tanımlanır. CT değeri başlangıç örneğinde bulunan DNA miktarıyla ters orantılıdır. Başka bir ifadeyle küçük CT değeri daha büyük başlangıç materyali anlamına gelir.



Şekil 5. Hayali bir RT-PCR sonucu grafiği. A, B ve C örneklerinin CT değerleri<sup>96</sup>

RT-PCR sonuçlarını değerlendirmek için iki yöntem vardır, görece ya da karşılaştırmalı ve mutlak değerlendirme.

Görece değerlendirme, bir çok örneğin deney içi kontrol seviyesine göre normalize edilmesi sonucu örneklerdeki istenilen DNA yada mRNA miktarının örnekler arasındaki azlık ya da çokluk durumunu belirler. Deney içi kontrol olarak kullanılan diziler genelde bütün örneklerde eşit miktarda olduğu bilinen ve aynı tüp ya da ayrı bir tüpte yine PCR ile çoğaltılan nükleik asitlerdir. Dolayısıyla, görece değerlendirme yapılırken konsantrasyonu bilinen bir standart örneğinin kullanılmasına gerek kalmaz. Görece değerlendirme gen anlatımı seviyesindeki fizyolojik değişimlerin ölçülmesi için yeterli seviyede bir değerlendirme değildir. Tekrar edecek olursak, görece değerlendirme farklı örneklerdeki istenilen DNA dizisinin CT değerlerinin eşit seviyedeki bir deney içi kontrole göre normalize edilmesi esasına dayanır. Bu değerlendirme örnekler arasında

azlık ya da çokluk; ya da katlar cinsinden sonuç verir (örneğin, bir örnekte istenilen DNA dizisi miktarı diğer örnektekinin 5 katıdır). Görece değerlendirme CT değerleri kullanılarak aşağıdaki formülle hesaplanır (bu hayali hesaplama Şekil 10'da bulunan CT değerlerine ek olarak A ve B örneklerindeki deney içi kontrol genlerinin CT değerlerinin sırasıyla 6.3 ve 6.2 olduğu kabul edilerek yapılmıştır):

$$\text{Katlı Anlatım Seviyesi} = 2^{-((C_{TA} - C_{TAHK}) - (C_{TB} - C_{TBHK}))}$$

$C_{TA}$  = A örneği  $C_T$  değeri  
 $C_{TAHK}$  = A örneği deney içi kontrol  $C_T$  değeri  
 $C_{TB}$  = B örneği  $C_T$  değeri  
 $C_{TBHK}$  = B örneği deney içi kontrol  $C_T$  değeri

$$\text{Katlı Anlatım Seviyesi} = 2^{-((9.2-6.3)-(14.1-6.4))} = 27.86$$

**Şekil 6. RT-PCR sonucunun görece değerlendirmesi için kullanılan formül**

Bu normalize edilmiş hayali hesaplama sonucu, A örneğinde istenilen DNA miktarının B örneğine göre 27.86 kat fazla olduğu görülebilir. Mutlak değerlendirme, DNA konsantrasyonu kesin olarak bilinen örneklerin standart doğrusu yapmak için kullanılması ile yapılır. Bir örneğin CT değerinin bu standart doğrusundaki değerlere göre incelenmesiyle örnekte bulunan DNA miktarının mutlak değeri hesaplanır. Standart doğrular hassas ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmekte kullanılabilirler. Ancak, bu standart doğruların oluşturulması sırasında son derece hassas ve özenli davranılmalıdır. Çünkü RT-PCR örneklerinin mutlak değerinin belirlenmesi bu doğrulara bağlıdır. Bu değerlendirme yöntemi, örnekte bulunan kesin DNA miktarını belirler (örneğin; ilgilenilen DNA miktarı bir örnekte 6.4 pikogram diğer bir örnekte de 1 pikogram vardır).

RT-PCR laboratuvarlarda bir çok amaçla kullanılırlar. Sıklıkla tanısal ve temel araştırma yapmak için kullanılır. Tanısal amaçla RT-PCR, belirli enfeksiyon hastalıklar, kanser ya da genetik bozukluklara sebep olduğu bilinen nükleik asit seviyelerinin belirlenmesi için kullanılır. Araştırma amaçlı olarak ise, gen anlatım seviyelerinin belirlenmesi için kullanılır. Örnek olarak, belirli bir genin anlatım seviyesinin gelişme süresince ya da hücre döngüsünde kullanılan farmakolojik ilaçlara göre tepki olarak, çevresel faktörlere bağlı olarak ya da hücre farklılaşması sürecinde ne yönde değiştiğinin tespitinde kullanılabilir. RT-PCR'da başlangıç materyali olarak RNA, genomik DNA ya da plasmid DNA'sı kullanılabilir. Herhangi bir RNA (mRNA, rRNA,

mikroRNA) kullanılacağı takdirde, RNA'nın önce ters-transkripsiyon tepkimesi işlemiyle tümleyicisi olan DNA'ya (cDNA) dönüştürülmesi gerekir. Yakın zamanda, bu işlemin yapılmasına gerek bırakmayan ters-transkripsiyonlu gerçek zamanlı PCR (RT-qPCR, reverse transcription quantitative polymerase chain reaction) kitleri piyasaya sürülmüştür.

### **2.2.3. MikroRNA'ların Klinik Önemi ve Hastalıklarla İlişkisi**

Dolaşımdaki miRNA'ların, sadece kanda bol miktarda bulunması değil aynı zamanda oldukça kararlı bir yapı göstermesi nedeniyle klinikte hastalıkların tanısı ve prognozunda önemli bir biyobelirteç olarak kullanılabilceği gösterilmiştir. Yapılan son çalışmalarla miRNA'ların başta kan olmak üzere çeşitli vücut sıvılarında varlığı potansiyel klinik biyobelirteç olarak kullanımını mümkün kılmıştır; miRNA lar plazmada bulunan RNAaz lara oldukça dirençlidirler. Bunların yanısıra miRNA ların kaynatma, yüksek/düşük pH, uzun süreli depolama dondurup çözme gibi zor koşullara dayanıklı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca miRNA ların formalin ile fikse edilmiş dokularda stabil kalması doku çalışmalarına da olanak vermiştir<sup>90</sup>.

Yapılan son çalışmalar ile miRNA daki mutasyonlar ve ekspresyon düzeylilikleri ile birçok hastalık sırasında direk bir ilişki olduğu gösterilmiştir. miRNA lar başta kanser olmak üzere kardiyovasküler bozukluklar, enfeksiyonlar, gelişimsel bozukluklar, kas bozukluklar, nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıklarla ilişkisi olduğu gösterilmiştir<sup>46,83,127</sup>.

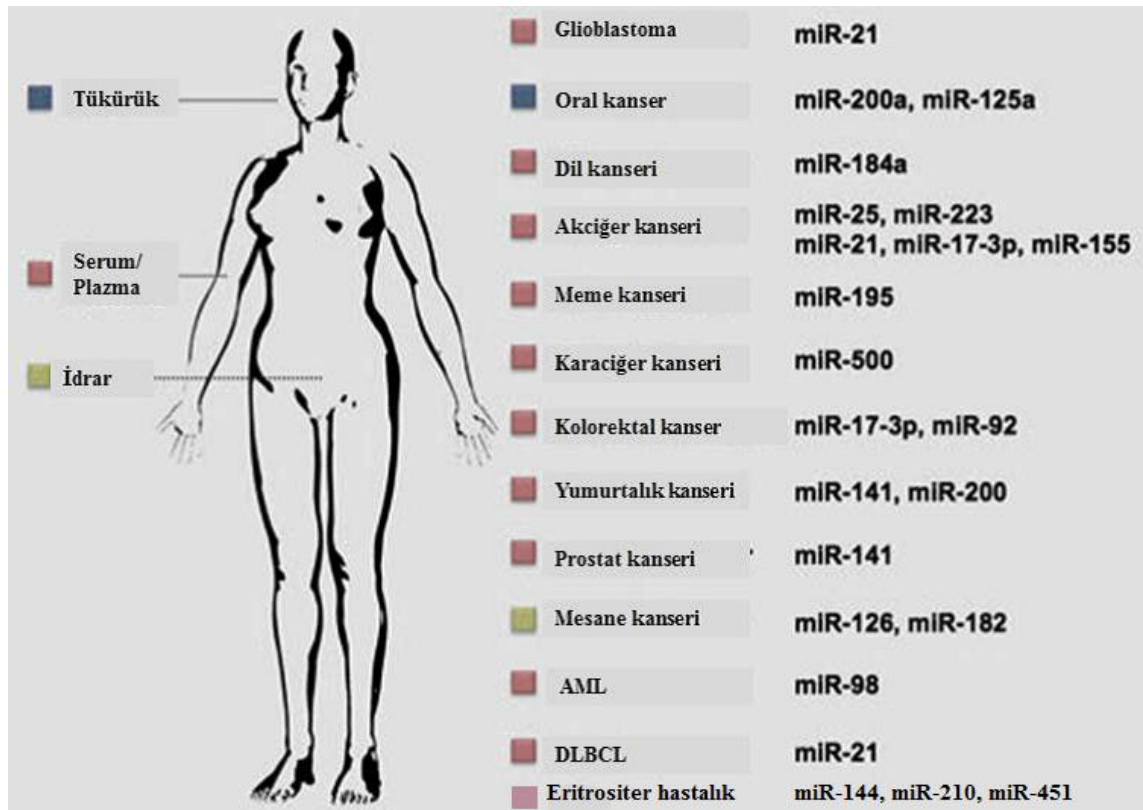
### **MikroRNAların Tedavi Amaçlı Kullanımı**

Gen ekspresyonunun susturulması olarak bilinen RNA interferansı (RNAi) dizi spesifik olarak mRNA nın degradasyonuna veya translasyonun inhibisyonuna neden olarak ökaryotik gen ekspresyonuna düzenleyen hücresel bir mekanizmadır. RNAi mekanizması miRNA lar ve siRNA lar tarafından düzenlenir.

Organizmada birçok patoloji, anormal bir endojenik gen veya mutant gen nedeniyle hücreler arasında sinyalin bozunma, apoptozis ve hücre proliferasyonu ile meydana geldiği bilinmektedir buna ek olarak viral enfeksiyonda yabancı gen ekspresyonu yaptırarak, hastalığa neden olmaktadır. RNAi mekanizması ile yabancı

gen ürünlerinin sessizleştirilerek, tedavide kullanılmasına yöndeki görüşler giderek artmaktadır.

Günümüzde çeşitli hastalık tiplerinde ve aşamalarında hastalıklı dokularla sağlıklı dokular arasında miRNA'ların ekspresyonlarının farklı olduğu belirlenmiştir. Bu da hastalıkların tanısında ve prognozunda miRNA'ların kullanılabileceğini göstermektedir<sup>16</sup> (Şekil 7).



Şekil 7. Bazı Hastalıklara Özgü miRNA Tipleri<sup>16</sup>

Bir çok çalışmada miRNA'ların spesifik olarak çeşitli hastalıklarda azalan ya da artan ekspresyon düzeyleri onların sadece tanı ya da prognoz alanında değil aynı zamanda tedavide de kullanılabileceğini göstermektedir. miRNA ların antagonistlerinin ya da taklitlerinin sentezlenerek asıl miRNA gibi hedef mRNA ya bağlanarak translasyonu susturduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. (tablo 3)

**Tablo 3. miRNA'ların tedavide kullanımı<sup>44</sup>**

Şirket	Hastalıklar	Kimyasal formu	Basamak
Regulus Therapeutics	İmmünoinflamatuvar, Kardiyovasküler, Metabolik hastalıklar, Onkoloji, Fibrozis ve Hepatit C enfeksiyonu	miRNA inhibitörleri (2'-metoksietil, 2'-fluoro RNA, bisiklik riboz modifikasyonu)	Preklinik
Santaris Pharma A/S	Kanser, İnflamatuvar hastalıklar ve Hepatit C enfeksiyonu	miRNA inhibitörü (nükleik asit kimyasını bloke ederek)	miR-122 inhibitörü: faz I tamamlandı, faz II başlangıç
miRagen Therapeutics	Kardiyovasküler ve Kas hastalıkları	miRNA inhibisyonu ve yerine geçme	Preklinik
Mirna Therapeutics	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve prostat kanseri	siRNA'yı kullanarak miRNA'nın yerine geçme	Preklinik

#### 2.2.4.Eritropoez ve Eritrosit Hastalıklarında MikroRNA

MikroRNA'lar hematopoez dahil birçok hücreyel olayda kilit rol oynar; miRNA ile eritropoez ilişkisini araştıran çalışmalar 2 grupta toplanır; birincisi eritropoezde miRNA düzeylerinin ölçülmesi, ikincisi ise işlevsel düzeyde miRNA eritropoez ilişkisinin belirlenmesidir. İkisinin birlikte araştırılması daha yaygın olmaya başlamıştır.

Eritropoez ilişkili miRNA düzeyindeki değişiklikleri tanımlayan ilk çalışma Lu ve ark. tarafından 2005 yılında yapılmıştır. Kord kanından elde edilen CD 34+ hücrelerin eritroid farklılaşması sırasında miRNA düzeylerinde artış saptanmıştır<sup>83</sup>.

2007 yılında Georgantas ve ark. tarafından yapılan çalışmada kemik iliği ve periferik kandan elde edilen CD 34+ hücrelerde 33 miRNA tanımlanmış; 18 miRNA hematopoetik farklılaşma ile ilişkili bulunmuştur. miR-155 in myeloid ve eritroid farklılaşmayı kontrol ettiği anlaşılmıştır<sup>42</sup>.

Choong ve ark. tarafından yapılan çalışmada miR-15B, miR-16, miR-22 ve miR-185 düzeyleri ile eritroid spesifik marker olan CD71,CD36 ve CD235a arasında pozitif korelasyon saptanırken miR-28 ile negatif korelasyon saptanmıştır<sup>25</sup>.

Eritrositlerde miRNA ekspresyonu ilk olarak 2006 yılında Rathjen ve ark. tarafından sıtma paraziti olan Plasmodium falciparum un miRNA ekspresyonu için yapılan çalışmada tanımlanmıştır<sup>105</sup>. miR-451 in eritrositlere özel ve yüksek düzeyde eksprese edildiği gösterilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda (Masaki ve ark. 2007, Merkerova ve ark. 2008) miR-451 in platelet, granülosit, monosit veya lenfositlerde değil eritrosit ve retikülositlerde yüksek düzeyde eksprese edildiği bulunmuştur<sup>87</sup>.

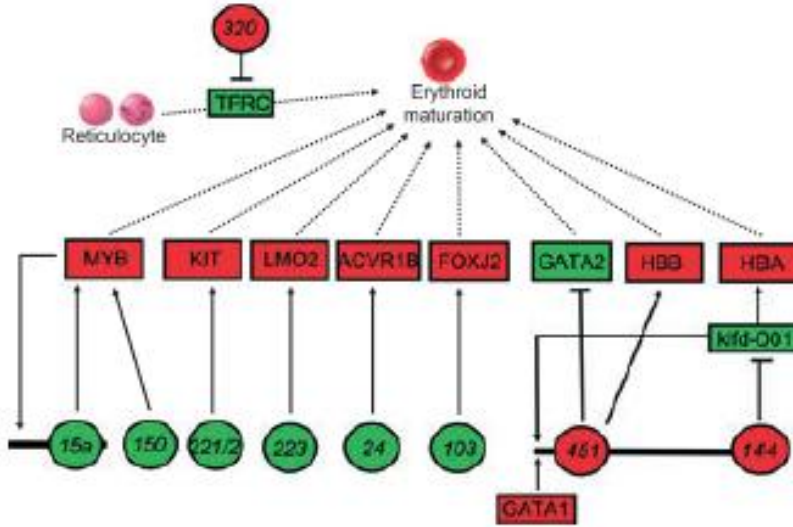
Zhan ve ark. (2007) tarafından miR-451 transfekte edilen hücrelerde beta-globinin düzeyinin artışı gözlenmiştir. miR-451 in azaldığı durumda da tam tersi ağır anemi ile sonuçlanmıştır<sup>139</sup>.

Bruchova ve ark.(2007) tarafından Polisitemia vera patogenezinde miRNA rolü araştırmasında birçok miRNA saptanmasına karşın sadece miR-150 düzeyi anlamlı olarak düşük bulunmuştur<sup>17</sup>.

Chen ve ark. (2008) tarafından sağlıklı 7 kişi ve 12 homozigot orak hücre hastalığı olan hastanın eritrosit mikroRNA ekspresyon profilleri karşılaştırıldığında iki grup arasında orak hücre hastalığı olanlarda miR -29A, miR -144, miR -451, ve miR -140 düzeyinin yüksek olduğu miR-320, miR-181, miR-LET7 ve miR-141 düzeyinin azaldığı gözlenmiştir. Beklenmedik bir şekilde orak hücre anemili eritrositlerin mikroRNA ekspresyon profili sağlıklı kontrol retikülositlerin profiline daha yakın bulunmuştur<sup>24</sup>.

mikroRNA	Hedef (mRNA )	Biyolojik Etki
<i>miR-144</i>	GATA1	Embriyonik eritropoezde alfa globulin negatif düzenleme
	KLFD	Gama globulin gen transkripsiyonunu indüklemek
	NRF2	Antioksidan kapasiteyi azaltarak, hemoliz ve ağır anemi
<i>miR-451</i>	GATA1, GATA2	Gama globulin gen transkripsiyonunu indüklemek, alfa globulinini suprese etmek
	14-3-3 ζ	FoxO3 transkripsiyon faktörünü inhibe ederek eritroid antioksidan genlerde pozitif düzenleyici

**Tablo 4. miRNA'ların gama globin ekspresyonu üzerindeki farklı rolleri<sup>111</sup>**



**Şekil 8. Eritropoez'deki miRNA fonksiyonlarının şematik diyagramı<sup>78</sup>**

Özetle miRNA'nın eritropoezin kontrolünde çok önemli role sahip olduğu açık iken henüz bu yoldaki özel miRNA'lar açık bir şekilde tanımlanamamıştır. Bilgi ve teknolojiye gelişmeler ile miRNA alanındaki gelişmeler ile eritrosit hastalıkları ile savaşmak çok da uzak görünmemektedir<sup>78</sup>.

## 3.GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Hastalar ve Çalışma Planı

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalı tarafından takip edilen orak hücre anemili 17 hasta çocuktan ağırlı kriz döneminde, bu hastaların 17'sinden kriz dışı dönemlerinde Kasım 2015 ve Haziran 2016 tarihleri arasında kan örnekleri alındı. Kontrol grubu olarak sistemik bir hastalığı bulunmayan, anemisi olmayan, büyüme ve gelişmesi yaşlılarıyla uyumlu, ilaç kullanmayan sağlıklı 16 çocuktan kan örnekleri alındı.

Ağırlı kriz, OHA'lı hastaların başka bir nedene bağlanamayan ağırlı ile başvurması olarak tanımlandı. En az 4 haftalık dönemden sonra aynı hastalar ağırlı krizi olmadığı dönemde kontrole çağırıldı, kriz dışı dönemde kabul edilerek kan örnekleri alındı.

Hasta (ağırlı kriz ve kriz dışı dönem) ve kontrol grubunda, hsa-miR-144 ve hsa-miR-451 gerçek zamanlı PCR ile tetkik edildi. Hastaların hidroksiüre kullanımı, ağırlı kriz sıklıkları, transfüzyon öyküsü sorgulandı.

Çalışmaya katılan tüm çocukların velilerinden imzalı onam formu alındı.

### 3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları

- High püre miRNA izolasyon kiti
- miRCURY universal cDNA sentez kiti
- Bağlanma tamponu (binding buffer)
- Bağlanma kuvvetlendirici (binding enhancer)
- Yıkama solüsyonu (Wash buffer)
- Elüsyon tamponu (elution buffer)
- Filtreli tüpler - Atık tüpleri
- 1,5 ml eppendorfler

- 200 µl ve 1000µl pipet ve pipet uçları
- 13.000g çalışabilen eppendorf santrifüjü

Lökosit ayırma işlemi sonunda elde edilen karışımdan 150 µl. alınarak içerisine 312 µl binding buffer ve 200 µl binding enhancer eklendi, filtrelili tüpe aktarıldıktan sonra 13.000g de 45 sn. santrifüje edildi. Daha sonra üzerine 500 µl wash buffer eklendi. 13.000g de 30 sn. santrifüje edildi. Üzerine 300 µl yıkama solüsyonu (wash buffer) eklendi. 13.000 g de 30 sn. santrifüje edildi. Daha sonra 1 dk. Santrifüje edildi. Daha sonra filtrelili tüpler eppendorf tüplerinin içine kondu. İçerisine 75 µl elution buffer eklenerek 13.000 g de 1 dk. Santrifüje edildi. Ve total RNA eldesi yapıldı.

### **3.2.1. Universal Komplementer DNA Sentez Kiti**

Sentetik spike-in liyofilize halde bulunmakta olup 40 µl PCR grade water ile sulandırıldı. Çalışma öncesi 15 dk. buz üzerinde tutuldu.

### **3.2.2. Komplementer DNA Yapımı için Karışım Protokolü**

Elde edilen RNA'ların Komplementer DNA'ya (cDNA) dönüştürülmesi için miRCURY universal cDNA sentez kiti kullanıldı. Sentezin gerçekleşmesi için gerekli olan bileşenler, 5x reaksiyon buffer, Nükleaz free water, Enzyme mix, Sentetik spike-in olarak üretici firmanın miRCURY universal cDNA sentez kiti için hazırlamış olduğu kılavuzdaki tavsiyelere uyularak gerekli hacimlerde hazırlanarak oluşturuldu. Oluşturulan cDNA sentez mix'inin 16 ul'lık hacmine elde edilen total RNA'lardan 4'er ul eklenerek total volume hazırlandı.

**Tablo 5. Komplementer DNA Yapımı için Karışım Protokolü**

5x reaksiyon buffer	2 µl
Nükleaz free water	4,5 µl
Enzyme mix	1 µl
Sentetik spike-in	0,5 µl
Total RNA	2 µl (5ng/µl)
Total Volume	10 µl

### 3.2.3. Komplementer DNA Yapımı için Isı Protokolü

Hazırlanan cDNA sentez mix ve RNA karışımları yine üretici firmanın miRCURY universal cDNA sentez kiti için hazırlanmış olduğu kılavuzda ki tavsiyelerine uyularak aşağıda ki ısı ve sürelerde işlem görmek üzere Light Cycler 480 sistemine ait 96 kuyucuklu plate üzerine yüklendi.

- 42 °C de 60 dk.

- 95 °C de 5 dk.

- +4 °C de saklama veya -20 °C de saklama

Uygulanan protokol sonrasında cDNA'lar elde edildi.. Elde edilen cDNA lar PCR aşaması öncesi 1:20 oranında PCR grade water ile seyreltildi. Hazırlanan karışımlar Light Cycler 480 sistemine ait 96 kuyucuklu plate üzerine yüklendi. SNORD48 PCR primer mix 220 µl nükleaz free water ile sulandırıldı. Hsa-miR-144 ve Hsa-miR-451 PCR Primer mixler ise 110 ar µl nükleaz olmayan su ile sulandırıldı.

### 3.2.4. Gerçek Zamanlı PCR Karışım Protokolü (Housekeeping gen/ Referans gen)

cDNA'ların referans gen açısından amplifikasyonunu sağlamak ve ilgili bölgeleri işaretlemek amacıyla SYBR Green Master Mix ve SNORD48 Pcr Primer Mix'leri üretici firmanın tavsiyelerine uyularak aşağıdaki protokole göre hazırlandı.

**Tablo 6. Gerçek Zamanlı PCR Karışım Protokolü (Housekeeping gen/ Referans gen)**

SYBR Green Master Mix	5µl
SNORD48 PCR Primer mix	1µl
1/20 sulandırılmış cDNA	4µl
Total Volume	10µl

### 3.2.5. Gerçek Zamanlı PCR Karışım Protokolü (Target gen/Hedef gen)

cDNA'ların hedef gen açısından amplifikasyonunu sağlamak ve ilgili bölgeleri işaretlemek amacıyla SYBR Green Master Mix, Hsa-miR-144 ve Hsa-miR-451 PCR Primer Mix (forward), Hsa-miR-144 ve Hsa-miR-451 PCR Primer Mix'leri (reverse) üretici firmanın tavsiyelerine uyularak aşağıdaki protokole göre hazırlandı.

**Tablo 7. Gerçek Zamanlı PCR Karışım Protokolü (Target gen/Hedef gen)**

SYBR Green Master Mix	5 µl
Hsa-miR-144 PCR Primer Mix (Forward )	0,5 µl
Hsa-miR-144 PCR Primer Mix (Reverse)	0,5 µl
1/20 sulandırılmış cDNA	4µl
Total volüm	10 µl

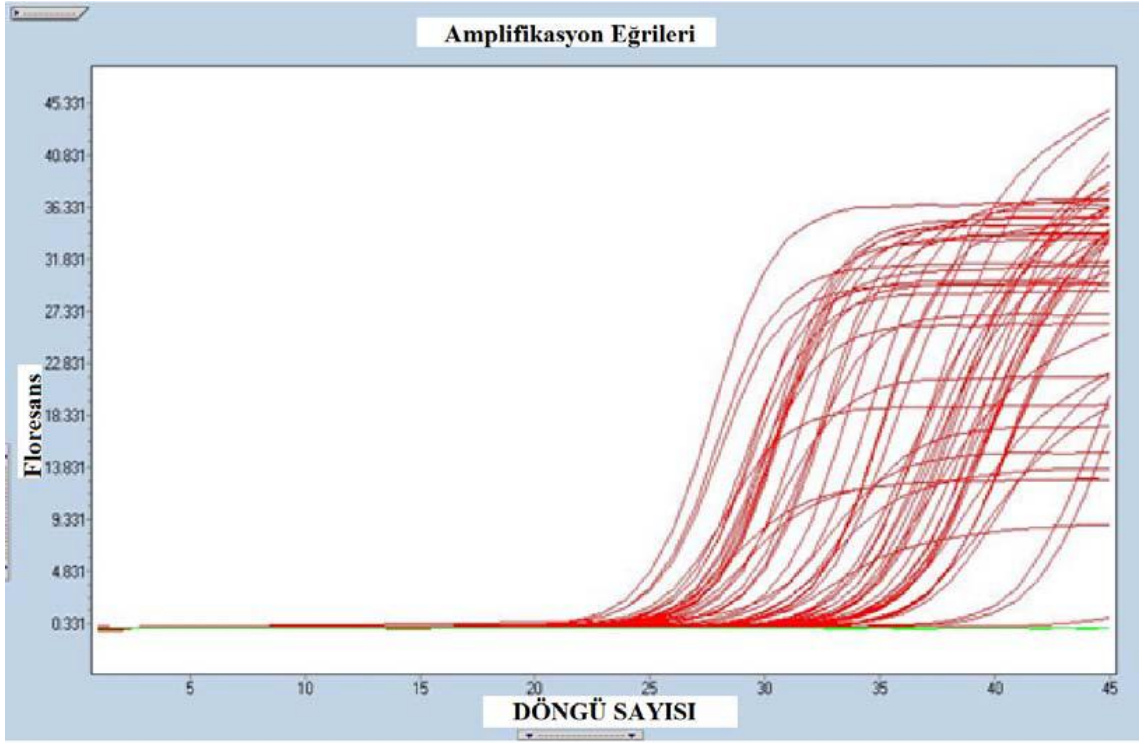
SYBR Green Master Mix	5 µl
Hsa-miR-451 PCR Primer Mix (Forward )	0,5 µl
Hsa-miR- 451 PCR Primer Mix (Reverse)	0,5 µl
1/20 sulandırılmış cDNA	4µl
Total volüm	10 µl

### 3.2.6. Gerçek Zamanlı PCR Isı Protokolü

Hazırlanan Referans Gen Real Time PCR Mix'leri ve Hedef Gen Real Time PCR Mix'leri uygun cDNA'lar ile Light Cyler 480 Sistemine ait 96 kuyucuklu plate'ler üzerinde biraraya getirildikten sonra aşağıda ki Isı Protokolü ile Light Cyler 480 Sisteminde Gerçek Zamanlı PCR için işleme alındı.

**Tablo 8. Gerçek Zamanlı PCR Isı Protokolü**

<b>Denaturasyon</b>	95°C de 10 dk.
<b>Amplifikasyon</b> Bu döngü 45 kez sağlanır.(45 cycle, Ramp-rite 1,6°C/sn, saniyedeki ısı değişimi)	95°C de 10 sn. 60°C de 1 dk. Okuma
<b>Erime eğrisi</b>	95°C de 30 sn. 40 °C de 1 dk. 85 °C de continue (Acquisitions 3 per/°C)
<b>Soğutma</b>	40 °C de 1 dk.



**Şekil 9. Hasta ve kontrollere ait amplifikasyon eğrileri**

### **3.3. İstatistiksel analiz**

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 19.0 paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sayısal ölçümlerse ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca ve minimum - maksimum) olarak özetlendi. Kategorik ölçümlerin gruplar arasında karşılaştırılmasında Ki Kare test istatistiği kullanıldı.

Sayısal ölçümlerin normal dağılım varsayımını sağlayıp sağlamadığı Kolmogrov Smirnov testi ile test edildi. Gruplar arasında sayısal ölçümlerin karşılaştırılmasında varsayımların sağlanması durumunda Bağımsız gruplarda T testi, varsayımların sağlanmaması durumunda ise Mann Whitney U testi kullanıldı.

Bağımlı sayısal ölçümlerin karşılaştırılmasında varsayımların sağlanması durumunda Bağımlı Gruplarda T testi, varsayımların sağlanmaması durumunda ise Wilcoxon Signed Rank testi kullanıldı. Bazı sayısal ölçümlerin normal dağılım

varsayımını sağlamaması nedeniyle bu sürekli ölçümler arasındaki korelasyon Spearman Korelasyon katsayısı ile incelendi. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı.



## 4. BULGULAR

Çalışmamızda Kasım 2015-Haziran 2016 tarihleri arasında Çocuk Hematoloji Bilim Dalı tarafından orak hücre anemisi tanısıyla takip edilen 17 hasta alındı. Bu hastalardan ağırlı kriz sonrası stabil dönemde 17 hastadan kan örnekleri alındı. Kontrol grubu olarak aynı yaş grubundan sistemik bir hastalığı ve anemisi olmayan, büyüme ve gelişmesi yaşlılarıyla uyumlu, ilaç kullanmayan 16 çocuk sağlam grup olarak çalışmaya alındı. Çalışmada OHA'lı hastaların kriz ve stabil dönemlerinde alınan kan örnekleri ile sağlam çocuklardan alınan kan örnekleri analiz edildi. Çalışma için etik kurul onayı alındı. Çalışmaya katılan tüm OHA'lı ve sağlam çocukların velilerinden imzalı onam formu alındı.

**Tablo 9. OHA'lı hastaların ve kontrol grubunun özellikleri**

		OHA'lı hasta grubu (n=17)	Kontrol grubu (n=16)
<b>Kız</b>	n	9	8
	%	52,9	50
<b>Erkek</b>	n	8	8
	%	47,1	50
<b>Yaş</b>	(Ortalama±SSapma)	15,47±2,85	16,5±0,52
	Medyan (Min-Maks)	16 (9-19)	16 (16-17)

OHA'lı hastaların cinsiyet dağılımına bakıldığında 8'i erkek (%47) ve 9'u kız (%53) idi. Kontrol grubundaki çocukların 8'i erkek (%50), 8'i kız (%50) idi (Tablo 9).

**Tablo 10. Orak hücre anemili hastaların özellikleri**

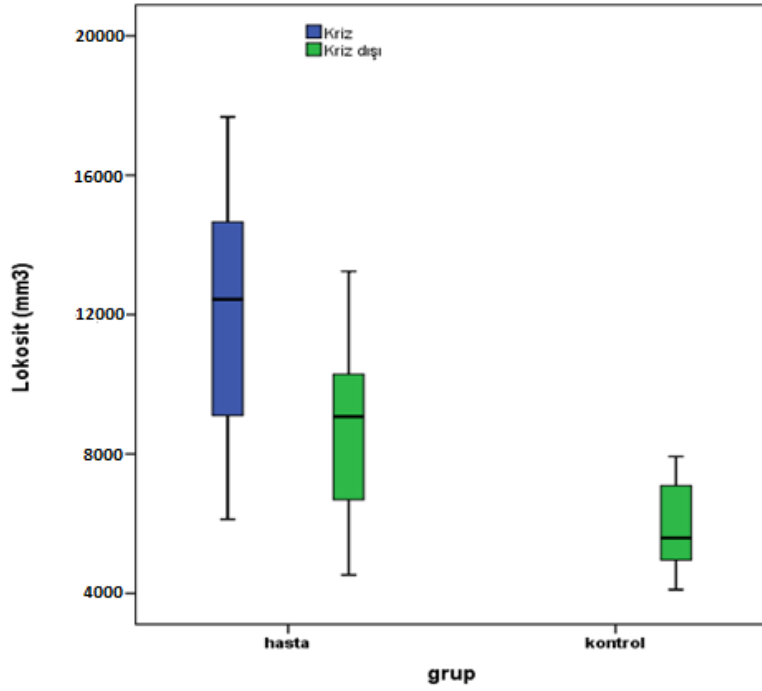
Ölçümler	Sayı (%)
<b>Ağırlı kriz sıklığı</b>	
1-3 kez/yıl	10 (%58,8)
≥4 kez/yıl	7 (%41,1)
<b>Hidroksiüre kullanımı</b>	
Yok	1 (%0,06)
Var	16 (%99,9)

OHA'lı hastaların ağırlı kriz sıklıkları, hidroksiüre kullanım durumu Tablo 10'de gösterilmiştir.

**Tablo 11. OHA'lı hastalar ve kontrol grubunun hematolojik parametreleri**

	<b>Kriz dönemi</b>	<b>Kriz dışı</b>	<b>Kontrol</b>
	Ortalama±SSapma Medyan (Min-Maks)	Ortalama±SSapma Medyan (Min-Maks)	Ortalama±SSapma Medyan (Min-Maks)
<b>Hb ( g/dl)</b>	8,88±1,22 8,90 (6,80-10,90)	9,56±1,11 9,50 (8,10-11,80)	12,96±1,09 12,50 (11,60-15,50)
<b>Hct (%)</b>	26,02±3,46 25,90 (19,50-31,60)	27,64±3,52 27,60 (22,40-34,20)	39,60±2,49 39,00 (36,0-44,5)
<b>Lökosit (/mm<sup>3</sup>)</b>	12511,2±4286,3 12550 (7660-17090)	10867,7±3158,4 11340 (5660-16550)	7441,3±1632,5 6985 (5130-9910)
<b>Platelet (/mm<sup>3</sup>)</b>	468705,9±219126 466000(133000-901000)	459117,7±176474,5 463000(115000-696000)	305000±49815 314500(223000-387000)
<b>Lenfosit (%)</b>	26,66±11,12 28,7 (20,0-46,0)	33,28±7,96 33,0 (26,0-46,0)	29,97±3,23 30,0 (26,0-36,0)
<b>Monosit (%)</b>	9,0±3,8 8,0(5,0-18,0)	8,7±2,5 8,0(4,0-14,0)	7,5±1,50 8,0 (5,0-10,0)
<b>Granülosit(%)</b>	61,8±12,0 62,0 (44,0-81,0)	54,9±9,5 52,0 (44,0-75,0)	60,5±4,49 60,0 (52,0-68,0)
<b>MCV (fL)</b>	86,91±8,0 85,90 (71,50-102,0)	86,36±8,4 84,90 (71,1-98,2)	85,43±3,2 85,50 (79,9-91,3)
<b>MCH (pg)</b>	29,75±3,63 29,60 (23,00-36,40)	29,94±3,74 30,10 (23,2-37,3)	27,94±1,32 28,05(25,4-30,1)

OHA'lı hastaların kriz ve kriz dışı dönemi ile kontrol grubunun hematolojik parametreleri Tablo 11'da verilmiştir. Çalışmaya alınan OHA'lı hastaların kriz dönemlerinde bakılan tam kan sayımında lökosit değerleri 12511,2±4286,3/mm<sup>3</sup> iken aynı hastaların kriz dışı dönemde bakılan tam kan sayımında lökosit değerleri 10867,7±3158,4/mm<sup>3</sup> idi. Kontrol grubu olarak alınan sağlam çocuklarda bakılan tam kan sayımında lökosit değerleri 7441,3±1632,5 /mm<sup>3</sup> idi. Kriz döneminde bakılan lökosit sayıları kriz dışı dönemlerinde ve kontrol grubunda bakılan lökosit sayılarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p<0.001) (Şekil 10).



Şekil 10. OHA'lı hastaların kriz, kriz dışı dönemlerde ve kontrol grubunun lökosit değerleri

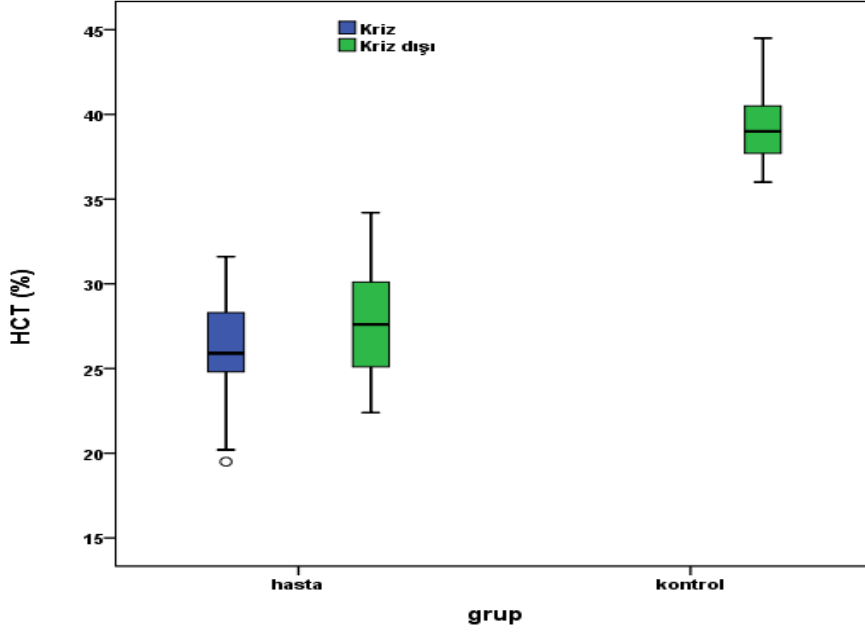
OHA'lı hastaların kriz dönemlerinde bakılan Hb değeri ortalaması  $8,88 \pm 1,22$  g/dl iken kriz dışı dönemde bakılan Hb değerleri  $9,56 \pm 1,11$  g/dl idi. Kriz dışı dönemde Hb değerleri anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p=0,003$ ). Kriz döneminde bakılan Hct değerleri ortalaması  $26,02 \pm 3,46$ , kriz dışı dönemde bakılan Hct değerleri ortalaması  $27,64 \pm 3,52$  idi. Kriz dışı dönemde Hct değerleri anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p=0,016$ ) (Şekil 11).

OHA'lı hastaların kriz dışı dönemde bakılan lenfosit yüzdeleri kriz döneminde bakılan lenfosit yüzdelerine göre anlamlı olarak yüksek bulunurken ( $p<0,043$ ), granülosit değerleri düşük bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. ( $p=0,062$ ). OHA'lı hastaların kriz dönemlerinde bakılan HbS ortalaması  $74,24 \pm 9,82$  iken kriz dışı dönemde bakılan HbS ortalaması  $71,22 \pm 8,97$  bulundu, aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p=0,246$ ). Hastaların kriz ve kriz dışı dönemlerdeki hematolojik parametreleri Tablo 12'de verilmiştir.

**Tablo 12. OHA'lı hastaların kriz ve kriz dışı dönem hematolojik parametreleri**

Ölçümler	Grup		P
	Kriz dönemi	Kriz dışı	
	Ortalama±SSapma Medyan (Min-Maks)	Ortalama±SSapma Medyan (Min-Maks)	
<b>Hb ( g/dl)</b>	8,88±1,22 8,90 (6,80-10,90)	9,56±1,11 9,50 (8,10-11,80)	<b>0,003</b>
<b>Hct(%)</b>	26,02±3,46 25,90 (19,50-31,60)	27,64±3,52 27,60 (22,40-34,20)	<b>0,016</b>
<b>Lökosit (/mm<sup>3</sup>)</b>	12511,2±4286,3 12550 (7660-17090)	10867,7±3158,4 11340 (5660-16550)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Platelet (/mm<sup>3</sup>)</b>	468705,9±219126 466000(133000-901000)	459117,7±176474,5 463000(115000-696000)	0,699
<b>Lenfosit (%)</b>	26,66±11,12 28,7 (20,0-46,0)	33,28±7,96 33,0 (26,0-46,0)	<b>0,043</b>
<b>Monosit (%)</b>	9,0±3,8 8,0(5,0-18,0)	8,7±2,5 8,0(4,0-14,0)	0,267
<b>Granülosit(%)</b>	61,8±12,0 62,0 (44,0-81,0)	54,9±9,5 52,0 (44,0-75,0)	<b>0,062</b>
<b>MCV (fL)</b>	86,91±8,0 85,90 (71,50-102,0)	86,36±8,4 84,90 (71,1-98,2)	0,705
<b>MCH (pg)</b>	29,75±3,63 29,60 (23,00-36,40)	29,94±3,74 30,10 (23,2-37,3)	0,772
<b>HbS (%)</b>	74,24±9,82 71,20 (59,50-97,10)	71,22±8,97 70,30 (57,00-92,30)	0,246
<b>HbF (%)</b>	23,51±10,23 25,90 (2,90-39,1)	24,7±8,6 22,9 (10,6-43,6)	0,17
<b>HbA<sub>2</sub> (%)</b>	2,39±0,79 2,50 (1,40-3,9)	1,75±0,59 1,70 (0,9-3,1)	0,011

Şekil 11. OHA'lı hastalarda kriz, kriz dışı dönemlerde ve kontrol grubunda Hct değerleri



Tablo 13. Kriz döneminde OHA'lı hastalar ve kontrol grubunun hematolojik parametreleri

Ölçümler	Grup		p
	Kriz dönemi	Kontrol	
	Ortalama±SSapma Medyan (Min-Maks)	Ortalama±SSapma Medyan (Min-Maks)	
<b>Hb ( g/dl)</b>	8,88±1,22 8,90 (6,80-10,90)	12,96±1,09 12,50 (11,60-15,50)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Hct (%)</b>	26,02±3,46 25,90 (19,50-31,60)	39,60±2,49 39,00 (36,0-44,5)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Lökosit (/mm<sup>3</sup>)</b>	12511,2±4286,3 12550 (7660-17090)	7441,3±1632,5 6985 (5130-9910)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Platelet (/mm<sup>3</sup>)</b>	468705,9±219126 466000(133000-901000)	305000±49815 314500(223000-387000)	<b>0,008</b>
<b>Lenfosit (%)</b>	26,66±11,12 28,7 (20,0-46,0)	29,97±3,23 30,0 (26,0-36,0)	0,255
<b>Monosit (%)</b>	9,0±3,8 8,0(5,0-18,0)	7,5±1,50 8,0 (5,0-10,0)	0,060
<b>Granülosit(%)</b>	61,8±12,0 62,0 (44,0-81,0)	60,5±4,49 60,0 (52,0-68,0)	0,661
<b>MCV (fL)</b>	86,91±8,0 85,90 (71,50-102,0)	85,43±3,2 85,50 (79,9-91,3)	0,493
<b>MCH (pg)</b>	29,75±3,63 29,60 (23,00-36,40)	27,94±1,32 28,05(25,4-30,1)	0,069

OHA'lı hastaların kriz dönemlerinde bakılan Hct ortalama değeri %26,02±3,46 iken kontrol grubunda bakılan Hct ortalama değeri %39,6±2,49 idi. Her 2 grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.001$ ) (Şekil 11). Kriz dönemlerinde bakılan Hb ortalama değeri 8,88±1,22 g/dl iken kontrol grubunda bakılan Hb ortalama değeri 12,96±1,09 g/dl idi. Her 2 grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.001$ ). OHA'lı hastaların kriz dönemi ve kontrol grubunda bakılan hematolojik parametreleri Tablo 13'de verilmiştir.

**Tablo 14. Kriz dışı dönemdeki OHA'lı hastalar ve kontrol grubunu hematolojik parametreleri**

Ölçümler	Grup		p
	Kriz dışı dönemi	Kontrol	
	Ortalama±SSapma Medyan (Min-Maks)	Ortalama±SSapma Medyan (Min-Maks)	
<b>Hb ( g/dl)</b>	9,56±1,11 9,50 (8,10-11,80)	12,96±1,09 12,50 (11,60-15,50)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Hct (%)</b>	27,64±3,52 27,60 (22,40-34,20)	39,60±2,49 39,00 (36,0-44,5)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Lökosit (/mm<sup>3</sup>)</b>	10867,7±3158,4 11340 (5660-16550)	7441,3±1632,5 6985 (5130-9910)	<b>0,001</b>
<b>Platelet (/mm<sup>3</sup>)</b>	459117,7±176474,5 463000(115000-696000)	305000±49815 314500(223000-387000)	<b>0,003</b>
<b>Lenfosit (%)</b>	33,28±7,96 33,0 (26,0-46,0)	29,97±3,23 30,0 (26,0-36,0)	0,129
<b>Monosit (%)</b>	8,7±2,5 8,0(4,0-14,0)	7,5±1,50 8,0 (5,0-10,0)	0,131
<b>Granülosit(%)</b>	54,9±9,5 52,0 (44,0-75,0)	60,5±4,49 60,0 (52,0-68,0)	0,061
<b>MCV (fL)</b>	86,36±8,4 84,90 (71,1-98,2)	85,43±3,2 85,50 (79,9-91,3)	0,676
<b>MCH (pg)</b>	29,94±3,74 30,10 (23,2-37,3)	27,94±1,32 28,05(25,4-30,1)	0,052

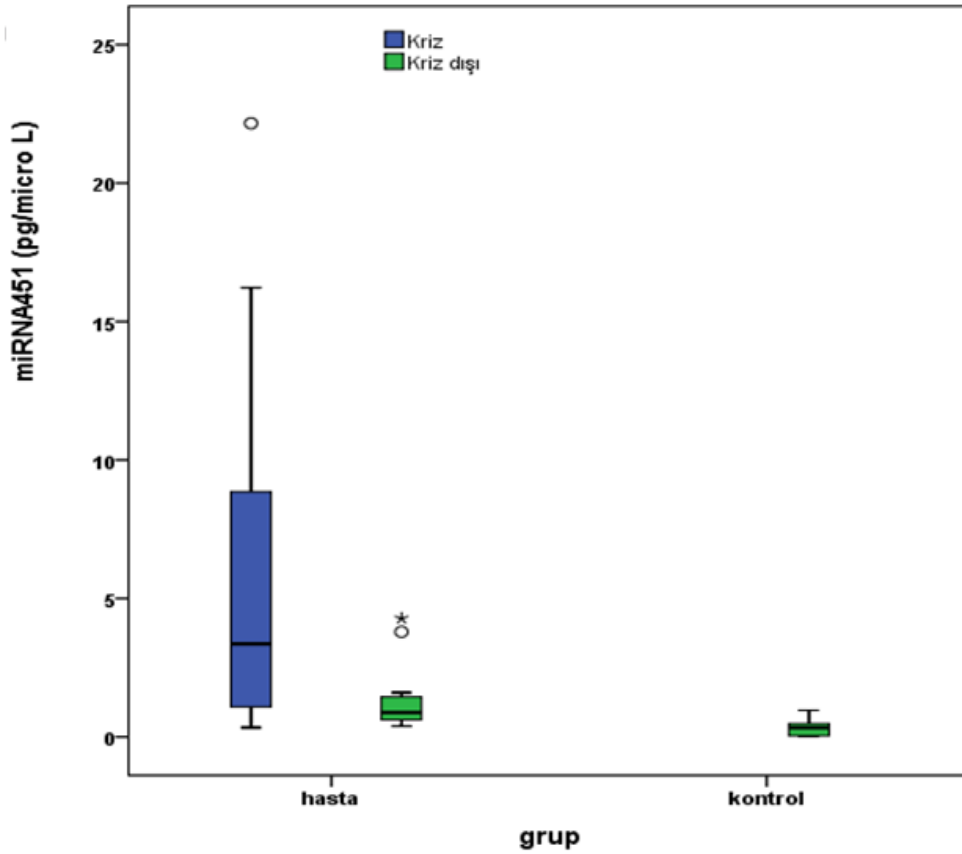
OHA'lı hastaların kriz dışı dönemi ile kontrol grubu karşılaştırıldığında kontrol grubunda Hb ve Hct değerleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p<0.001$ ) (Şekil 11). Kriz dışı dönemde bakılan tam kan sayımındaki lökosit değerleri ile kontrol grubunda bakılan lökosit değerleri karşılaştırıldığında kriz dışı dönemi lökosit değerleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ( $p=0.001$ ). Hastaların kriz dışı dönemi ve kontrol grubunun hematolojik verileri karşılaştırmalı olarak Tablo 14'te verilmiştir.

**Tablo 15. OHA'lı hastaların kriz ve kriz dışı dönemlerinde miRNA düzeyleri**

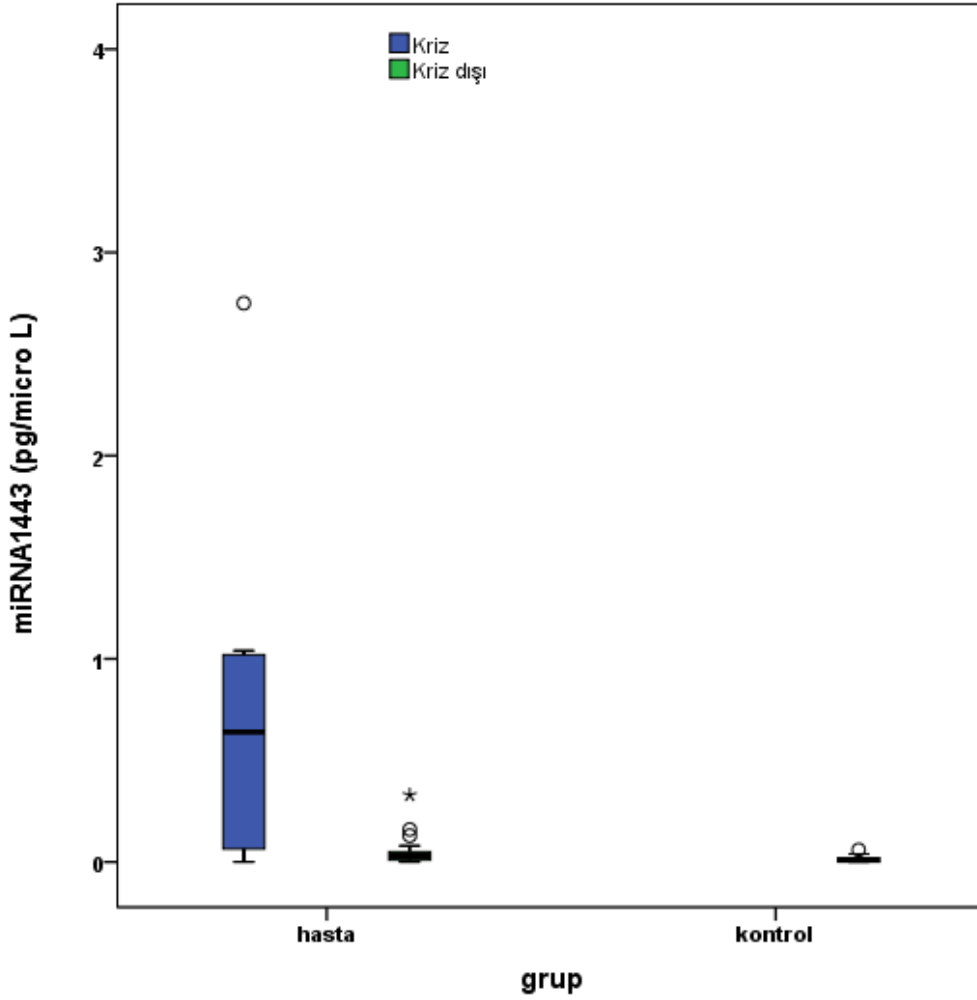
Ölçümler	Grup		P
	Kriz dönemi	Kriz dışı dönem	
	Ortalama±SSapma Medyan (Min-Maks)	Ortalama±SSapma Medyan (Min-Maks)	
miRNA 451	5,91±6,49 3,36(0,34-22,16)	1,03±1,20 0,57(0,08-3,97)	<b>0,001</b>
miRNA 144	2,10±4,37 0,64(0-16,22)	0,055±0,084 0,03(0-0,33)	<b>0,004</b>

miRNA 451 düzeyi OHA'lı hastaların kriz döneminde kriz dışı dönemine göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p= 0,001$ ) (Şekil12). miRNA 144 düzeyi OHA'lı hastaların kriz döneminde kriz dışı dönemine göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p= 0,004$ ) (Şekil 13). OHA'lı hastaların kriz ve kriz dışı dönemlerindeki miRNA düzeyleri Tablo 15'da verilmiştir.

**Şekil 12. OHA'lı hastaların kriz, kriz dışı dönemlerinde ve kontrol grubunda miRNA 451 düzeyleri**



Şekil 13. OHA'lı hastaların kriz, kriz dışı dönemlerinde ve kontrol grubunda miRNA 144 düzeyleri



Tablo 16. OHA'lı hastaların kriz dönemi ve kontrol grubunun miRNA düzeyleri

Ölçümler	Grup		p
	Kriz dönemi	Kontrol	
	Ortalama±SSapma Medyan (Min-Maks)	Ortalama±SSapma Medyan (Min-Maks)	
miRNA 451	5,91±6,49 3,36(0,34-22,16)	0,33±0,29 0,33(0,01-0,96)	0,003
miRNA 144	2,10±4,37 0,64(0-16,22)	0,015±0,18 0,01(0-0,06)	<0,001

miRNA 451 düzeyi OHA'lı hastaların kriz döneminde sağlam çocuklardan oluşan kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p= 0,003$ ) (Şekil12). miRNA 144 düzeyi OHA'lı hastaların kriz dönemi ile kontrol grubu karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p< 0,001$ ) (Şekil13). OHA'lı hastaların kriz dönemi ve kontrol grubunun miRNA düzeyleri Tablo 16'da verilmiştir.

**Tablo 17. OHA'lı hastaların kriz dışı dönemi ile kontrol grubunun miRNA düzeyleri**

Ölçümler	Grup		p
	Kriz dışı dönemi	Kontrol	
	Ortalama±SSapma Medyan (Min-Maks)	Ortalama±SSapma Medyan (Min-Maks)	
<b>miRNA 451</b>	1,03±1,20 0,57(0,08-3,97)	0,33±0,29 0,33(0,01-0,96)	0,021
<b>miRNA 144</b>	0,055±0,084 0,03(0-0,33)	0,015±0,18 0,01(0-0,06)	0,103

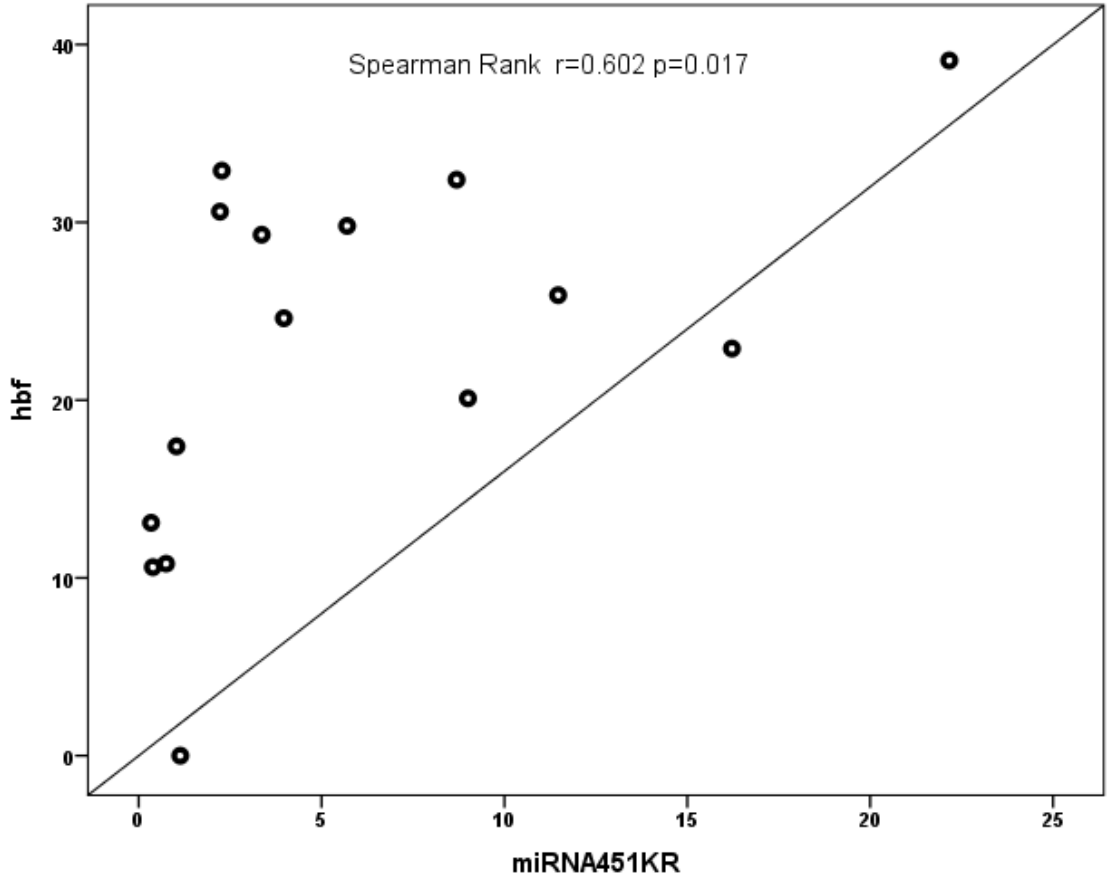
miRNA 451 düzeyi OHA'lı hastaların kriz dışı dönemi ile kontrol grubu karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p=0,021$ ) (Şekil12). miRNA 144 düzeyi OHA'lı hastaların kriz dışı dönemi ile kontrol grubu karşılaştırıldığında yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p=0,103$ ) (Şekil13). OHA'lı hastaların kriz dışı dönemi ve kontrol grubunun miRNA düzeyleri Tablo 17'da verilmiştir.

**Tablo 18. Kriz dışı dönemde kriz sıklığı ile miRNA düzeyleri ilişkisi**

	Kriz sıklık		P
	0-3 kez/yıl	≥4 kez/yıl	
	Ortalama±SSapma Medyan (Min-Maks)	Ortalama±SSapma Medyan (Min-Maks)	
<b>miRNA 451</b>	0,54±0,30 0,25(0,10-0,96)	0,35±0,30 0,35(0,10-0,85)	0,813
<b>miRNA 144</b>	0,16±0,11 0,02(0-0,33)	0,05±0,04 0,04(0-0,13)	0,669

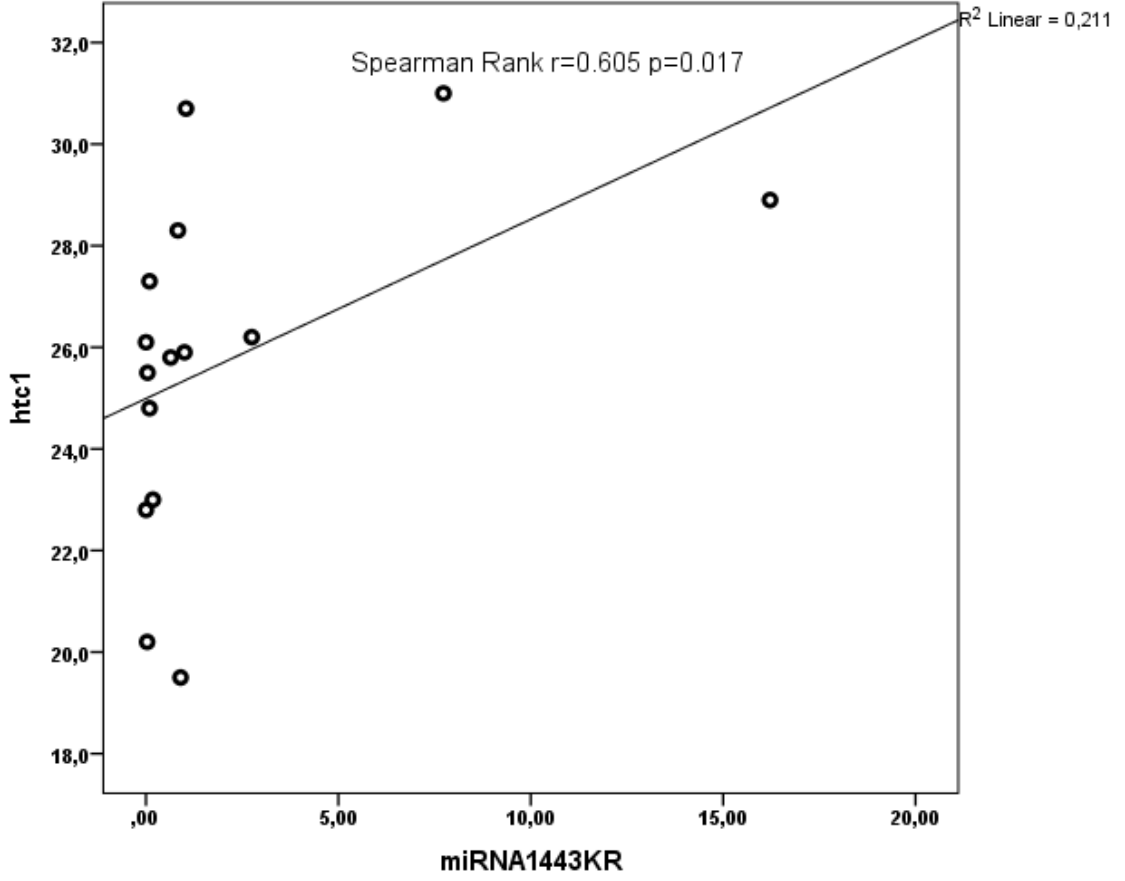
OHA'lı hastalarda kriz sıklığı ile kriz dışı dönemdeki miRNA düzeyleri karşılaştırıldığında, kriz sıklığı 0-3 kez/yıl ile >4 kez/yıl olan hasta grubunda miRNA 451, miRNA 144 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.(Tablo 18).

Şekil 14. OHA'lı hastaların kriz döneminde miRNA 451 ve HbF arasındaki ilişki



OHA'lı hastalarda kriz dönemindeki miRNA 451 ile HbF düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde miRNA düzeyi ile anlamlı olarak pozitif korelasyon saptandı.(p=0,017)(Şekil 14)

Şekil 15. OHA'lı hastaların kriz döneminde miRNA 144 ve Hct arasındaki ilişki



OHA'lı hastalarda kriz dönemindeki miRNA 144 ile Hct düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde miRNA düzeyi ile anlamlı olarak pozitif korelasyon saptandı.(p=0,017)(Şekil 15)

## 5-TARTIŞMA

Orak hücre anemisi; HbS'in homozigot durumunu belirtir. HbS, beta zincirinin NH2 ucunda 6. aminoasidi olan glutamik asidin yerine valin geçmesi ile oluşur. HbS oksijen basıncı azaldığında yeterli olarak çözünemez, polimerize olur ve rijid eritrositler oluşur<sup>50,55</sup>. İlk olarak 1910 yılında Dr. James Herrick tarafından yayınlandıktan sonra literatüre girmiş kalıtsal bir hastalıktır<sup>52</sup>.

Orak hücre anemisi Afrika kıtası, Ortadoğu, Amerika, ülkemizin de içinde bulunduğu Akdeniz kuşağında ve Hindistan'da da oldukça sık görülür<sup>113</sup>. OHA'nin dünyadaki dağılımını belirleyen önemli etkenlerden birinin malaryaya karşı sağladığı direnç, diğerinin ise sonradan gelen göçler olduğu düşünülmektedir<sup>61</sup>.

Ülkemizde HbS sıklık oranı %0,03 tür. Ancak bu oran OHA nin en sık görüldüğü Çukurova Bölgesinde daha yüksektir. Sağlık Bakanlığı ve Ulusal Hemoglobinopati Konsey'inin son verilerine göre taşıyıcı sıklığı Adana'da %10, Antakya'da %10,5, Mersin'de 13,6, Antaya'da %2,5, Diyarbakır'da %0,5, Muğla'da %0,5 sıklıktadır<sup>6,35,47,63,65,71,72</sup>.

Hastalığın patogeneğinde oraklaşma ve vazookluzyon kilit rol oynar. OHA'daki klinik belirtilerin çoğunluğu kan akışkanlığının azalması ile ilgilidir. Kanın akışkanlığının azalmasının nedenleri arasında eritrosit zarının katılaşması, hemoglobinin polimerizasyonu ve hücre içi hemoglobin düzeyinin artışı sayılabilir. Oraklaşmış hücrenin damar endoteline yapışkanlığının artması dokuların perfüzyonunda azalmaya yol açar. Bu durgunluk dokuda oksijen doygunluğunun düşmesine ve daha sonra oraklaşmaya yol açan kısır döngünün devamına neden olur. Sonuçta dalak, kemik iliği ve plasentada doku infarktları ve fibrozis görülür.

OHA'lı hastalarda vasküler endotelial hasar nedeniyle nötrofillerin dolaşımdaki artışına bağlı olarak lökositöz görülebilir. Awogu ve arkadaşları krizde olmayan 200 OHA'lı çocuk ile aynı yaş ve cinsiyet grubunda hemoglobin örneği HbAA olan 60 çocuğun kan sayımı değerlerini karşılaştırmış, ortalama lökosit sayısı hasta grubunda  $12,4 \pm 3,0 \times 10^9/L$ , kontrol grubunda  $5,2 \pm 1,9 \times 10^9/L$  olarak bildirmiştir ( $p < 0,001$ )<sup>7</sup>.

Çalışmamızda kriz dönemindeki OHA'lı hastalarda bakılan lökosit sayıları ( $15511,2 \pm 4286,3/mm^3$ ) kriz dışı dönemde bakılan lökosit sayılarına

(10867,7±3158,4/mm<sup>3</sup>) göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p<0,001). Kriz dışı dönemde bakılan lökosit sayıları (10867,7±3158,4/mm<sup>3</sup>) ile kontrol grubunda bakılan lökosit sayılarına göre (7441,3±1632,5/mm<sup>3</sup>) literatürle uyumlu olarak anlamlı yüksek bulunmuştur(p<0,001). Çalışmamızda kriz dönemi ile kontrol grubu karşılaştırıldığında lökosit sayıları anlamlı olarak yüksek bulundu (p<0,001). Bu durum krizde enfeksiyon başlatılmasına, hemapoezin hızlanmasına ve krizde lökositlerin damar duvarıyla etkileşmesine bağlı olabilir.

MikroRNA(miRNA), genom üzerinde protein kodlayan intron veya ekzon bölgeleri ve protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkripsiyonu sağlanan, fakat proteine translasyonu gerçekleştirilmeyen 19-25 nükleotid uzunluğunda RNA'lardır<sup>46</sup>.

MiRNA lar hematopoez dahil birçok hücrel olayda kilit rol oynar; miRNA ile eritropoez ilişkisini araştıran çalışmalar 2 grupta toplanır; birincisi eritropoezde miRNA düzeylerinin ölçülmesi, ikincisi ise işlevsel düzeyde miRNA eritropoez ilişkisinin belirlenmesidir. İkisinin birlikte araştırılması daha yaygın olmaya başlamıştır.

MiRNA ları tanımlamak ve olası hedef genleri bulmak üzere çeşitli in vivo ve in vitro çalışmalar mevcuttur.in vitro çalışmalarda eritroid olgunlaşma sürecinde basamakları uyarıcı ve durdurucu ilaç kullanımı sonrası saptanan değişiklikleri doğrulamak amacıyla in vivo çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalarda insan embriyonik kök hücreleri, K562 hücreleri, periferik ve umbilikal kord kan hücreleri in vitro çalışmalarda kullanılmaktayken zebra balığı in vivo model olarak kullanılmaktadır.

Dore ve arkadaşları tarafından zebra balığı embriyolarında yapılan çalışmada miR-144/451 lokusunun GATA-1 tarafından düzenlendiği gama globilin gen transkripsiyonunu indüklediği bulunmuştur<sup>31</sup>.

Fu ve arkadaşları tarafından zebra balığı embriyolarında yapılan çalışmada miR-144 ün KLFd mRNA üzerinden embriyonik eritropoezde alfa globilin transkripsiyonunu baskıladığı bulunmuştur<sup>41</sup>.

Çalışmamızda OHA'lı hastaların kriz döneminde mir-451 düzeyi yüksek olan hastaların HbF düzey ilişkisi değerlendirildiğinde aralarında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon olduğu bulundu (p=0,017). Hastaların çoğunluğunda (on yedi

hastada on altısı hidroksiüre kullanmakta) hidroksiüre kullanımı HbF düzeyi yükselmesine dolasıyla da miR-451 düzeyinin yüksek çıkmasında rol oynayabilir. Genelleme yapmadan evvel miR-451 düzeyini hidroksiüre kullanan ve kullanmayanlarda karşılaştıracak sayıda hastada çalışılması gerekir.

Pase ve ark. tarafından zebra balığını mutanti olan *meunier (mnr)* üzerinde (miR 144/451 ekspresyon düzeyi düşük) yapılan çalışmada eritropoezin normal başladığını ancak eritrosit maturasyonunun geciktiğini gözlemlemişler, miR-451'in aşırı ekspresyonunun ise transkripsiyon faktör gata2 üzerinden eritroid maturasyonu kısmen kurtardığını belirtmiştir<sup>141</sup>.

Yu ve ark. tarafından zebra balığı embriyolarında yapılan çalışmada mir-451'in 14-3-3 ζ mRNA üzerinden FoxO3 transkripsiyon faktörünü inhibe ederek eritroit antioksidan genlerde pozitif düzenleyici olduğu saptanmıştır<sup>138</sup>. Bizim hastalarımızda hidroksiüre kullananlarda HbF artımına pozitif katkı yapmış olabilir.

Chen ve ark. tarafından sağlıklı 7 kişi ve 12 homozigot orak hücre hastalığı olan hastanın eritrosit mikroRNA ekspresyon profilleri karşılaştırıldığında iki grup arasında orak hücre hastalığı olanlarda miR -29A, miR -144, miR -451, ve miR -140 düzeyinin yüksek olduğu miR-320, miR-181, miR-LET7 ve miR-141 düzeyinin azaldığı gözlenmiştir<sup>24</sup>.

Sangokoya ve ark. tarafından orak hücre anemili hastalar ile sağlıklı kişilerin miRNA düzeylerinde farklılık olduğu bulunmuştur. miR-144 ün NRF2 mRNA üzerinden antioksidan kapasiteyi azalttığı, hemolize ve anemi yol açtığı bulunmuştur. miR-144 düzeyinin yüksek olduğu kişilerde ağır anemi gözlenmiştir<sup>112</sup>.

Çalışmamızda Chen ile Sangokoya ve ark. yaptığı çalışmalarla uyumlu olarak miRNA 451 düzeyi OHA'lı hastaların kriz dışı dönemi ile kontrol grubu karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0,021) miRNA 144 düzeyi OHA'lı hastaların kriz dışı dönemi ile kontrol grubu karşılaştırıldığında yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p=0,103)

Ayrıca çalışmamızda OHA'lı hastaların kriz döneminde mir-144 düzeyi yüksek olan hastaların hematokrit düzey ilişkisi değerlendirildiğinde Sangokoya ve ark. yaptığı

çalışmaların aksine aralarında istatistiksel olarak pozitif korelasyon ( $p=0,017$ ) olduğu bulundu ( $p=0,017$ ) ancak bu korelasyonun hasta sayısının az olması ve hidroksiüre kullanan hasta sayısının oranının çoğunluğu nedeniyle daha dikkatli yorumlanması ,hidroksiüre kullanmayan hastalarla karşılaştırmalı değerlendirilmesi gerekir.

Rasmussen ve ark. yapılan çalışmada eritroid hemostazında gerekli olan miR-144 ve miR-451 argonaute 2'ye bağımlı olduğu, miR-144/451'den eksik farelerde geç eritroblast maturasyonu hücre otonomisinin bozulmasına ve sonuçta eritroid hiperplazi, splenomegali ve hafif anemiye yol açtığı gösterilmiştir. Gen ifade analizi ile miR-144/451 kümesi gen ifadesinde aracı olarak çalışır ve birçok genlerin ifadesini sağlar. Yaptıkları gözlemlerde miR-451'in ekspresyon düzeyinin miR-144 düzeyinden fazlasıyla yüksek olduğunu belirtmiştir. Ayrıca miR-451'in terminal eritropoezde rol aldığını göstermek amaçlı sadece miR-451 eksik fareler ile miR-144 olup miR-451 eksik fareler arasında karşılaştırma yapılmıştır. Sadece miR-451 eksik fareler ile miR-144 olup miR-451 eksik farelerin eritroid maturasyonu gecikmesinde fark olmadığını gözlemlemiştirler<sup>104</sup>.

Çalışmamızda OHA'lı hastalarda yıl içindeki kriz sıklığı ile kriz dışı dönemdeki miRNA düzeyleri karşılaştırıldı, kriz sıklığı ile miRNA düzeyleri arasında bir korelasyon saptanmadı.

Çalışmamız literatüre bakıldığında orak hücre anemili hasta çocuklarda miRNA düzeylerinin saptanması açısından yapılan az sayıda olan klinik çalışmalardan biridir. Son yapılan çalışmalarda miRNA düzeyinin globilin gen ekspresyonu üzerinden HbF üretimini artırarak terapötik amaçlı kullanımı hedeflemektedir<sup>111</sup>. Çocuklarda orak hücre anemisinde miRNA düzeyinin yüksekliği ile hastalığın prognozu arasında kesin ilişki kurulabilmesi amacıyla bu konuyla ilgili çoklu merkezlerde daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## SONUÇLAR

- 1- OHA'lı hastalarda kriz döneminde bakılan lökosit sayıları kriz dışı döneme göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p<0,001$ ).
- 2- OHA'lı hastalarda kriz döneminde bakılan lökosit sayıları kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p<0,001$ ).
- 3- OHA'lı hastalarda kriz döneminde bakılan granülosit değerleri kriz dışı döneme göre yüksek bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0,062$ ).
- 4- OHA'lı hastalarda kriz döneminde bakılan lenfosit değerleri kriz dışı dönemine göre anlamlı olarak düşük bulundu ( $p=0,043$ ).
- 5- OHA'lı hastalarda kriz döneminde bakılan Hb değerleri kriz dışı döneme göre anlamlı olarak düşük bulundu ( $p=0,003$ ).
- 6- OHA'lı hastalarda kriz döneminde bakılan HbS değerleri kriz dışı döneme göre yüksek bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0,246$ ).
- 7- OHA'lı hastalarda kriz döneminde bakılan miRNA 451 düzeyi kriz dışı döneme göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p=0,001$ ).
- 8- OHA'lı hastalarda kriz döneminde bakılan miRNA 451 düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p=0,003$ ).
- 9- OHA'lı hastalarda kriz dışı dönemde bakılan miRNA 451 düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p=0,021$ ).
- 10- OHA'lı hastalarda kriz döneminde bakılan miRNA 144 düzeyi kriz dışı döneme göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p=0,004$ ).
- 11- OHA'lı hastalarda kriz döneminde bakılan miRNA 144 düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p<0,001$ ).
- 12- OHA'lı hastalarda kriz dışı dönemde bakılan miRNA 144 düzeyi kontrol grubuna göre yüksek bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0,103$ ).
- 13- OHA'lı hastalarda kriz sıklığı 0-3 kez/yıl ile  $>4$  kez/yıl olan gruplar arasında ile kriz dışı dönemde bakılan miRNA 451, miRNA 144 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

14- OHA'lı hastalarda kriz dönemindeki miRNA 451 ile HbF düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde miRNA düzeyi ile anlamlı olarak pozitif korelasyon saptandı.(p=0,017)

15- OHA'lı hastalarda kriz dönemindeki miRNA 144 ile Htc düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde miRNA düzeyi ile anlamlı olarak pozitif korelasyon saptandı.(p=0,017)



## KAYNAKLAR

1. **Abraham A, Jacobsohn DA, Bollard CM.** Cellular therapy for sickle cell disease. *Cytotherapy*. **2016** Jul 13. pii: S1465-3249
2. **Aikimbaev K, Güvenç B, Canataroğlu A, Canataroğlu H, Başlamışlı F, Oğuz M.** Value of duplex and color doppler ultrasonography in the evaluation of orbital vascular flow and resistance in sickle cell disease. *Am J Hematol* **2001**; 67(3):163-167.
3. **Aksoy M, Lekin EW, Maurant AE, Lehman H.** Blood groups hemoglobins and thalasemia in Southern Turkey and Eti Turks. *Brit. Med. J* **1958**; 2:937.
4. **Alperin JB.** Folic acid deficiency complicating sickle cell anemia. A study on the response to titrated doses of folic acid. *Arch Intern Med* **1967**;120(3):298-306.
5. **Antmen B.** Orak hücre anemisi. *Türk Ped Arş* **2009**,44 özel sayı: 39-42
6. **Arpacı A, Aksoy K, Dikmen N.** Çukurova’da orak hücre anemisi ve talasemi taraması. XXII. Ulusal Hematoloji Kongresi, İstanbul **1991**: 115.
7. **Awogu AU.** Leucocyte counts in children with sickle cell anaemia usefulness of stable state values during infections. *West Afr J Med* **2000**; 19(1):55-58.
8. **Bainbrigde R, Higgs DR, Maude GH, Serjant GR.** Clinical presentation of homozygous sickle cell disease. *J Pediatr* **1985**; 106(6):881-885.
9. **Ballas SK, Lief S, Benjamin LJ, Dampier CD, Heeney MM, Hoppe C, Johnson CS, Rogers ZR, Smith-Whitley K, Wang WC, Telen MJ.** Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. *Am J Hematol.* **2010** Jan;85(1):6-13.
10. **Bartel DP.** MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **2004**;116(2):901-6.
11. **Berkowitz LR, Orringer EP.** Passive sodium and potassium movements in sickle cell erythrocytes. *Am J Physiol* **1985**; 249:208-216.
12. **Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ.** Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **2001**; 409(6818): 363-6.
13. **Bertholdt S, Lê PQ, Heijmans C, Huybrechts S, Dedeken L, Devalck C, Schiffers S, Ferster A.** Respiratory complications of sickle cell anemia in children: the acute chest syndrome. *Rev Med Brux* **2012**; 33(3):138-144.
14. **Beutler E.** Disorders of hemoglobin structure: Sickle cell anemia and related abnormalities. *Williams Hematology*. 7th ed. New York: Mcgraw Hill **2006**; 667-700.
15. **Bhatia, M. and M. Walters,** Hematopoietic cell transplantation for thalassemia and sickle cell disease: past, present and future. Bone marrow transplantation, **2008**. 41(2): p. 109-117.
16. **Broderick JA, Zamore PD.** MicroRNA therapeutics. *Gene Therapy*. **2011**; 18:1104-10
17. **Bruchova, H., Merkerova, M. & Prchal, J.T. (2008)** Aberrant expression of microRNA in polycythemia vera. *Haematologica*, 93, 1009-1016.\*29-7

18. **Buchanan ID, James-Herry A, Osunkwo I.** The Other Side of Abnormal: A Case Series of Low Transcranial Doppler Velocities Associated With Stroke in Children With Sickle Cell Disease. *J Pediatr Hematol Oncol.* **2012**; 14-15.
19. **Buckalew VM Jr, Someren A.** Renal manifestations of sickle cell disease. *Arch Intern Med* **1974**; 133(4): 660-669.
20. **Burnett AL.** Therapy insight: Priapism associated with hematologic dyscrasias. *Nat Clin Pract Urol* **2005**; 2(9):449-456.
21. **Caroline A. Hastings, Joseph C. Torkildson, and Anurag K. Agrawal** Handbook of Pediatric Hematology and Oncology: Children's Hospital & Research Center Oakland, Second Edition. **2012** chapter 3 pp 18-36
22. **Charache S, Scott JC, Charache P.** "Acute chest syndrome" in adults with sickle cell disease. Microbiology, treatment and prevention. *Arch Intern Med* **1979**; 139:67-69.
23. **Charache S, Terrin ML, Moore RD.** Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crisis in sickle cell anemia. *N Engl J Med* **1995**; 332:1317– 1322.
24. **Chen SY, Wang Y, Telen MJ, Chi JT.** The genomic analysis of erythrocyte microRNA expression in sickle cell diseases. *PLoS One.* **2008** Jun 4;3(6):e2360..\*29-8
25. **Choong, M.L., Yang, H.H. & McNiece, I. (2007)** MicroRNA expression profiling during human cord blood-derived CD34 cell erythropoiesis. *Experimental Hematology*, 35, 551–564.
26. **Cluster S, Vichinsky EP.** Managing sickle cell disease. *BMJ.* **2003**; 327(7424):1151-1155.
27. **Dahoui, H.A., et al.,** Pulmonary hypertension in children and young adults with sickle cell disease: evidence for familial clustering. *Pediatric blood & cancer*, **2010.** 54(3): p. 398-402.
28. **Davie SC, Luce PJ, Winn AA.** Acute chest syndrome in sickle cell disease. *Lancet* **1984**; i:36–38.
29. **Davies EG, Riddington C, Lottenberg R, Dower N.** Pneumococcal vaccines for sickle cell disease. *Cochrane Database Syst Rev* **2004**; (1):CD003885.
30. **Di Nuzzo DV, Fonseca SF.** Sickle cell disease and infection. *J Pediatr (Rio J)* **2004**; 80(5):347-354.
31. **Dore LC, Amigo JD, Dos Santos CO et al.** GATA-1-regulated microRNA locus essential for erythropoiesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*105(9), 3333–3338 (**2008**).
32. **Embury SH, Vichinsky EP.** Sickle cell disease. In: Hoffman R, Benz JR, Shattil SJ, *et al*, eds. *Hematology: Basic Principles and Practice.* 3rd Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, **2000**; 510–554.
33. **Emmel VE.** A study of the erythrocytes in a case of severe anemia with elongated and sickle shaped red blood corpuscles. *Archives of Internal Medicine* **1917**; 20:586- 598.
34. **Emre U, Miller ST, Gutierrez M.** Effect of transfusion in acute chest syndrome of sickle cell disease. *J Pediatr* **1995**; 127:901–90 4.
35. **Eraslan S.** Beta Talaseminin Moleküler Tanısı. Düzen Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi, Ankara-Türkiye,**2005.**

36. **Esquela-Kerscher A, Slack FJ.** Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* **2006**; 6(4):259-69.\*26-30
37. **Fernandes AP, Januário JN, Cangussu CB, Macedo DL, Viana MB.** Mortality of children with sickle cell disease: a population study. *J Pediatr (Rio J)* **2010**; 86(4):279-284.
38. **Field JJ, Lin G, Okam MM, Majerus E, Keefer J, Onyekwere O, et al.** Sickle cell vaso-occlusion causes activation of iNKT cells that is decreased by the adenosine A2A receptor agonist regadenoson. *Blood* **2013**;121(17):3329–34.
39. **Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA , Driver SE, Mello CC.** Potent and specific interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*. **1998**;391(6669):806-1.
40. **Francis RB, Johnson Cs.** Vascular occlusion in sickle cell disease. Current concept and unanswered questions. *Blood* **1991**; 77:1405.
41. **Fu YF, Du TT, Dong M et al.** Mir-144 selectively regulates embryonic  $\alpha$ -hemoglobin synthesis during primitive erythropoiesis. *Blood* 113(6), 1340–1349 (**2009**)
42. **Georgantas, III, R.W., Hildreth, R., Morisot, S., Alder, J., Liu, C.G., Heimfeld, S., Calin, G.A., Croce, C.M. & Civin, C.I. (2007)** CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 2750–2755.
43. **Gill FM, Sleeper LA, Weiner SJ, et al.** Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. Cooperative study of sickle cell disease. *Blood* **1995**;86:776–783
44. **Görür A, Tamer L** MikroRNA'ların Terapötik Kullanımı. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* **2011** 4(2)
45. **Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R.** Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* **2005**; 123(4) 631-40.
46. **Gupta A1, Mo YY.** Detection of microRNAs in cultured cells and paraffin-embedded tissue specimens by in situ hybridization. *Methods Mol Biol.* **2011**;676:73-83.
47. **Gümrük F, Altay Ç.** Orak hücre anemisi. *Katkı* **1995**; 16:327-45.
48. **He L, Hannon GJ.** MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* **2004**;5:522-31.
49. **Hebbel RP.** Beyond hemoglobin Polymerization: The red blood cell membrane and sickle cell disease pathophysiology. *Blood* **1991**; 77:214.
50. **Hebbel RP.** Pathobiology of sickle cell disease. *Hematology Basic Principles and Practice* (Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ). 5th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone **2009**; 565-576.
51. Hemoglobinopathies, *Manual of Pediatric Hematology and Oncology* 5th Ed **2011**, chapter 8 pp 200-246.
52. **Herrick JB.** Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Arch Intern Med* **1910**; 6:517.
53. <http://hatayhalksagligi.gov.tr/talasemi.php?dil=tr&sayfa=sayfa&no=talasemi-4>
54. <https://www.sec.gov/Archives/edgar/data/1629137/000162913716000028/a2015form10-k.htm>

55. **Ingram VM.** Gene mutation in human hemoglobin: the cell chemical difference between normal and sickle cell hemoglobin. *Nature* **1957**; 180: 326.
56. **Johnson CS, Omata M, Tong MJ, Simmons JF Jr, Weiner J, Tatter D.** Liver involvement in sickle cell disease. *Medicine (Baltimore)*, **1985**; 64(5):349-356.
57. **Johnson FL, Look AT, Gockerman J, Ruggiero MR, Dalla-Pozza L, Billings FT 3rd.** Bone-marrow transplantation in a patient with sickle-cell anemia. *N Engl J Med* **1984**; 311(12):780-783.
58. **Juwah AI, Nlemadim EU, Kaine W.** Types of anaemic crises in paediatric patients with sickle cell anemia seen in Enugu, Nigeria. *Arch Dis Child* **2004**; 89:572-576.
59. **Karagün BŞ, Antmen B, Şaşmaz İ, Kılınç Y** Mikro RNA ve kanser. *Türk Klinik Biyokimya Derg* **2014**; 12(1): 45-56
60. **Kaul DK, Nagel RL.** Sickle cell vasoocclusion: many issues and some answers. *Experientia* **1993**; 49(1):5-15.
61. **Kayaaltı ve Söylemez-Gökyer** Türkiye’de Orak Hücreli Anemi Dağılımı, Patofizyolojisi ve Demir Toksisitesi. *Marmara Pharm J* **2016** 20:92-99.
62. **Kılınç Y.** *Orak Hücre Anemisi:Tanı, Takip, Tedavi ve Transfüzyon.* Ed. Canatan D. DNA ve Hemoglobinler: Tanı ve Tedavi. Ankara **2008**; 255-262.
63. **Kılınç Y, Akmanlar N, Kümi M, Köker I.** The incidences of hemoglobinopathies and thalassemias in cord blood of newborns from Çukurova Province. *Med Bull İstanbul Medical Faculty* **1992**; 25: 9- 14.
64. **Kılınç Y, Antmen B, Serbest M, Şaşmaz İ, Tanyeli A.** Hydroxiurea for sickle cell crises in childhood. ISH-EHA Combined Haematology Congress *British Journal of Haematology* **1998**; 102 (1):175.
65. **Kılınç Y, Gürgey A, Kümi M, Altay Ç.** Adana Bölgesi'nde doğan bebeklerde kordon kanı çalışması ile alfa-talassemi, Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği ve hemoglobin S sıklığının araştırılması. *DOĞA Bilim Dergisi* **1986**; 10(2):162-167.
66. **Kılınç Y, Şahin Karagün B, Pekpak E, Şaşmaz İ.** Stroke in sickle cell anemia: A case report.PP C0394, Abstracts, *Thrombosis Research*, 130(2012)5100-51202, page 5161, 22nd International Congress on Thrombosis. Nice, France, **2012**
67. **Kılınç Y, Şaşmaz İ, Antmen B, Kozanoğlu H, Soyupak S, Altunbaşak Ş:**Stroke in sickle cell anemia. In “Focus on Sickle Cell Research”Plasmar RL(editor),New Biomedical Books, Nova Publishers, New York,**2004**, chapter 3, pp59-68.
68. **Kılınç Y.** Hemoglobinopatilerde prenatal tanı. *Türkiye Klinikleri Pediatrik Bilimler Hemoglobinopatiler Özel Sayısı* **2007**; 3(10):11-16.
69. **Kılınç Y.** Orak hücre anemisinde inme. 5. Uluslar arası talasemi yaz okulu bilimsel kitabı. Antalya: **2008**; 167-170.
70. **Kılınç Y.** Orak hücre anemisinde tanı ve tedavi. *Talasemi ve Hemoglobinopati Önlem-Tanı-Tedavi Kitabı*, Sağlık Bakanlığı Yayınları **2003**; 90.

71. **Kılınc Y.** Osmaniye Merkez ve Çevresi İlkokul ve Ortaöğrenim öğrencilerinde hemoglobinopati, talassemia ve G-6-PD eksikliği araştırması. *I. "Tarih içinde bütün yönleriyle Osmaniye I. Simpozyum Kitabı"* **1993**;145-150.
72. **Kılınc Y.** Tarsus ve çevresinde Okul Çağı Çocuklarda Hemoglobinopati ve talassemi sıklığı. *Pediyatrik Hematoloji Yandal Uzmanlık Tezi*, **1993**.
73. **Konaç E, Önen Hİ, Sözen S.** Üroonkolojide MikroRNA(miRNA)'ların yeri ve önemi. *Üronkoloji Bülteni* **2010**;1:3-13.
74. **Krichevsky AM1, King KS, Donahue CP, Khrapko K, Kosik KS.** A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA*. **2003** Oct;9(10):1274-81.
75. **Kümi M, KILINÇ Y, Etiz L:** Hematological findings in the milder and severe forms of sickle cell disease. *Çukurova Üniv. Tıp Fak. Der.* 7:4, 349-352, **1982**.
76. **Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y.** The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci* **2010**; 101(11):2309-15.\*26-28
77. **Lal A. and Vichinsky EP.** Sickle cell disease. *Postgraduate Heamatology*. 5th ed. Massachusetts: Blackwell Publishing **2005**; 104-118.
78. **Lawrie CH.** microRNA expression in erythropoiesis and erythroid disorders. *Br J Haematol*. **2010** Jul;150(2):144-51.
79. **Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V.** The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. **1993**;75:843-54.
80. **Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al.** The nuclear RNase III Droscha initiates mikroRNA processing. *Nature* **2003**; 425 (6956):415-9.
81. **Lee, M.T., et al.,** Doppler-defined pulmonary hypertension and the risk of death in children with sickle cell disease followed for a mean of three years. *British journal of haematology*, 2009. 146(4): p. 437-441.
82. **Leikin SL, Gallagher D, Kinney TR, et al.** Mortality in children and adolescents with sickle cell disease. Cooperative study of sickle cell disease. *Pediatrics* **1989**;84:500–508.
83. **Lu M , Zhang Q, Deng M, Miao J, Guo Y, Gao W, Cui Q.** An analysis of human microRNAand disease associations. *PLoS ONE* **2008**;3(10): e3420.
84. **Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U.** Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **2004**; 303(5654): 95-8.\*23-31
85. **Manci EA, Culberson DE, Yang YM, et al.** Causes of death in sickle cell disease: An autopsy study. *Br J Haematol* **2003**;123:359–365.
86. Mantadakis et al. Prevalence of Priapism in Children and Adolescents With Sickle Cell Anemia *J Pediatr Hematol Oncol* 21 (6), 518-522. Nov-Dec 1999.
87. **Masaki, S., Ohtsuka, R., Abe, Y., Muta, K. & Umemura, T. (2007)** Expression patterns of microRNAs 155 and 451 during normal human erythropoiesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364, 509–514.
88. **Miller ST, Rao SP, Dunn EK, Glassberg KI.** Priapism in children with sickle cell disease. *J Urol* **1995**; 154:844-847.

89. **Minniti CP, Eckman J, Sebastiani P, Steinberg MH, Ballas SK.** Leg ulcers in sickle cell disease. *Am J Hematol* **2010**; 85(10):831-833.
90. **Mourrain P, Béclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, et al.** Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* **2000**; 101(5): 533–42.
91. **Nelson PT1, Baldwin DA, Scearce LM, Oberholtzer JC, Tobias JW, Mourelatos Z.** Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs. *Nat Methods.* **2004** Nov;1(2):155-61.
92. **Niell HB, Leach BE, Kraus AP.** Zinc metabolism in sickle cell anemia. *JAMA* **1979**; 242(24):2686-2687.
93. **Nunlee-Bland G, Rana SR, Houston-Yu PE, Odonkor W.** Growth hormone deficiency in patients with sickle cell disease and growth failure. *J Pediatr Endocrinol Metab.* **2004**;17:601-606.
94. **Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, et al.** Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood.* **1998**;91:288-294.
95. **Ohene-Frempong K.** Indications for red cell transfusion in sickle cell disease. *Sem Hematol.* **2001**; 38(Suppl 1):5-13.
96. **Onan E.** karaciğer spesifik mikro-rna 122'nin hepatoselüler karsinomadaki yeri ve önemi ,uzmanlık tezi,Adana,**2012**
97. Orak hücre anemisi tanı ve tedavi kılavuzu, in Ulusal Tedavi Kılavuzu 2011. **2011**, *Türk Hematoloji Derneği.* p. 51-65.
98. **Overturf GD.** Infections and immunizations of children with sickle cell disease. *Adv Pediatr Infect Dis* **1999**; 14:191-218.
99. **Özyürek R.** Hemoglobinopatilerde Kardiyak Komplikasyonlar. Ed. Canatan D. *DNA ve Hemoglobinler:Tanı ve Tedavi.* Ankara, **2008**; 175-177.
100. **Paranjepe T.** Slack FJ, Weidhaas JB. MicroRNAs: tools for cancer diagnostics. *Gut* **2009**;58(11):1546-54.
101. **Pattison JR, Jones SE, Hodgson J, Davis LR, White JM, Stroud CE, Murtaza L.** Parvovirus infections and hypoplastic crisis in sickle-cell anaemia. *Lancet* **1981**;21(1):664-665.
102. **Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW, Williams TN, Weatherall DJ, Hay SI.** Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nat Commun* **2010**; 1:104.
103. **Platt O.** Prevention and management of stroke in sickle cell anemia. American Society of Hematology, Education Program book. **2006**; 54-62.
104. **Rasmussen KD, Simmini S, Abreu-Goodger C, Bartonicek N, Di Giacomo M, Bilbao-Cortes D, Horos R, Von Lindern M, Enright AJ, O'Carroll D.** The miR-144/451 locus is required for erythroid homeostasis. *J Exp Med.* **2010** Jul 5;207(7):1351-8.
105. **Rathjen, T., Nicol, C., McConkey, G. & Dalmay, T. (2006)** Analysis of short RNAs in the malaria parasite and its red blood cell host. *FEBS Letters*, 580, 5185–5188.

106. **Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G.** The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **2000**;403(6772):901-6.
107. **Reynolds J.** Radiologic manifestations of sickle cell hemoglobinopathy. *JAMA* **1977**; 238(3): 247-250.
108. **Rhodes M, Akohoue SA, Shankar SM, Fleming I, Qi An A, Yu C, Acra S, Buchowski MS.** Growth patterns in children with sickle cell anemia during puberty. *Pediatr Blood Cancer* **2009**; 53(4):635-641 .
109. **Rosse WF, Gallagher D, Kinney TR, Castro O, Dosik H, Moohr J, Wang W, Levy PS.** Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood* **1990**; 76(7):1431-1437.
110. **Saarinen UM, Chorba TL.** Human parvovirus B19 induced epidemic acute red cell aplasia in patients with hereditary hemolytic anemia. *Blood* **1986**; 67:1411.
111. **Saki N, Abroun S, Soleimani M, Kavianpour M, Shahjahani M, Mohammadi-Asl J, Hajizamani S.** MicroRNA Expression in  $\beta$ -Thalassemia and Sickle Cell Disease: A Role in The Induction of Fetal Hemoglobin. *Cell J.* **2016** Winter;17(4):583-92
112. **Sangokoya C, Telen MJ, Chi JT.** microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. *Blood.* **2010** Nov 18;116(20):4338-48
113. **Sauntharajah Y, Vichinsky EP.** Sickle cell disease- Clinical features and management. *Hematology Basic Principles and Practice* (Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ). 5th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone **2009**; 577-601.
114. **Sayag D, Binaghi M, Souied EH, Querques G, Galacteros F, Coscas G, Soubrane GEur J .** Retinal photocoagulation for proliferative sickle cell retinopathy: a prospective clinical trial with new sea fan classification. *Ophthalmol* **2008**; 18(2):248-254.
115. **Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV.** Mikro RNA'lar ve kanser. *Dicle Medical Journal* **2011**; 38(1):113-20.
116. **Schnog JB, Duits AJ, Muskiet FA, Cate H, Rojer RA, Brandjes DP.** Sickle cell disease; a general overview. *Neth J Med* **2004**; 62(10):364-374.
117. **Seeler RA, Shwiaki MZ.** Acute splenic sequestration crises (ASSC) in young children with sickle cell anemia. Clinical observations in 20 episodes in 14 children. *Clin Pediatr (Phila).* **1972**;11:701-704.
118. **Serjeant GR, Serjeant BE, Mohan JS, Clare A.** Leg ulceration in sickle cell disease: Medieval medicine in a modern world. *Hematol Oncol Clin North Am* **2005**; 19:943–956. 62
119. **Setty BNY, Stuart MJ, Dampier C, Brodecki D, Allen JL.** Hypoxemia in sickle cell disease: biomarker modulation and relevance to pathophysiology. *Lancet* **2003**; 362:1450–1455.
120. **Shi R1, Chiang VL.** Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *Biotechniques.* **2005** Oct;39(4):519-25.
121. **Sidman JD, Brownlee RE, Smith WC, Fry TL** Orbital complications of sickle cell disease. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* **1990**; 19(2):181-184.

122. **Singhal A, Thomas P, Cook R, Wierenga K, Serjeant G.** Delayed adolescent growth in homozygous sickle cell disease. *Arch Dis Child.* **1994**; 71(5):404-408.
123. **Strouse JJ, Heeney MM.** Hydroxyurea for the treatment of sickle cell disease: efficacy, barriers, toxicity, and management in children. *Pediatr Blood Cancer.* **2012**; 59(2):365-371.
124. **Stuart MJ, Setty BN.** Sickle cell acute chest syndrome: pathogenesis and rationale for treatment. *Blood* **1999**; 94:1555– 1560..
125. **Stuart MJ, Setty BNY.** Acute chest syndrome of sickle cell disease: a new light on an old problem. *Curr Opin Hematol* 2001; 8: 111– 122.
126. **The human microRNA disease database.** Erişim:<http://202.38.126.15/hmdd/miRNA/md/> \*
127. **Tunalı NE, Tiryakioğlu NO.** Kanserde MikroRNA'ların Rolü. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* **2010**;30(5):1690-700.
128. **Turgeon ML.**The hemoglobinopathies, In 'Clinical hematology:theory and procedures', fourth ed, *Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2005*, Chapter 13, pp 171-190.
129. **Tüzmen Ş, Scheter A N.** Genetic Diseases of Hemoglobin: Diagnostic methods for elucidating Sickle Cell Mutations. *Blood Reviews* **2001**; 15:19-25.
130. **Válóczy AI, Hornyik C, Varga N, Burgyán J, Kauppinen S, Havelda Z.** Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res.* **2004** Dec 14;32(22):e175.
131. **Van Rooij E, Purcell AL, Levin AA.** Developing microRNA therapeutics. *Circ Res.* **2012**;110:496-507.
132. **Vermilyen C.** Hematopoietic stem cell transplantation in sickle cell disease. *Blood Rev.* **2003**; 17(3):163-166.
133. **Vichinsky EP, Styles LA, Colangelo LH, Wright EC, Castro O, Nickerson B.** Acute Chest syndrome in sickle cell disease. Clinical presentation and course. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood* **1997**; 89:1787-1792.
134. **Wallace KL, Marshall MA, Ramos SI, Lannigan JA, Field JJ, Strieter RM, et al.** NKT cells mediate pulmonary inflammation and dysfunction in murine sickle cell disease through production of IFN-gamma and CXCR3 chemokines. *Blood* **2009**;114(3):667–76.
135. **Walters MC, Patience M, Leisenring W, et al.** Bone marrow transplantation for sickle cell disease. *N. Engl. J. Med* **1996**; 335:426-428.
136. **Wang WC.** The pathophysiology, prevention, and treatment of stroke in sickle cell disease. *Curr Opin Hematol* **2007**;14(3):191-197.
137. **Wayne AS, Kevy SV, Nathan DG.** Transfusion management of sickle cell disease. *Blood* **1993**; 81:109–123.
138. **Yu D, dos Santos CO, Zhao G et al.** miR-451 protects against erythroid oxidant stress by repressing 14-3-3z. *Genes Dev.* 24(15),1620–1633 (**2010**).

139. **Zhan, M., Miller, C.P., Papayannopoulou, T., Stamatoyannopoulos, G. & Song, C.Z. (2007)** MicroRNA expression dynamics during murine and human erythroid differentiation. *Experimental Hematology*, 35, 1015–1025
140. **Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W.** Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *Embo J.* **2002**(21); 21: 5875-85.
141. **Luke Pase, Judith E. Layton, Wigard P. Kloosterman, Duncan Carradice, Peter M. Waterhouse, and Graham J.** miR-451 regulates zebrafish erythroid maturation in vivo via its target *gata2* *Blood.* **2009** Feb 19; 113(8): 1794–1804.



## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı :** İkbal TÜRKER

**Doğum Tarihi –Yeri :** 01.01.1988- Tarsus

**Medeni Durumu :** Bekar

**Adres :** Güzelyalı Mah. Adnan Kahveci Blv. 81012 Sokak Sistem Apt. Kat:5  
Daire:10 Çukurova\Adana

**Telefon :** (0322) 3886060-3112 \ 0538 364 15 66

**E-posta :** iturker33@gmail.com

**Mezun Olduğu Tıp Fakültesi :** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

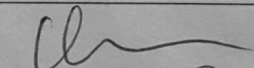


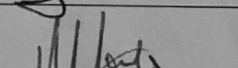
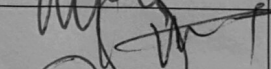
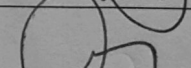
**Görev Yerleri :** Çukurova Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

**Yabancı Dil:** İngilizce

**T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

Toplantı Sayısı	Tarih
49	9 Ocak 2016

KARAR NO 20- Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nın bilimsel işbirliğiyle, Prof. Dr. Yurdanur Kılınç yönetiminde, Prof. Dr. Abdullah Tuli'nin, Uzm. Dr. Ebru Dünder Yenilmez'in katkılarıyla, Araş. Gör. Dr. İkbâl Türker tarafından yürütülmesi öngörülen, "Vazookluziv Kriz ile Başvuran Orak Hücre Anemili Hastalarda MikroRNA Düzeylerinin Krizle İlişkinin Değerlendirilmesi" başlıklı tıpta uzmanlık tez projesi araştırma etiği yönünden değerlendirildi. Toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi.

<b>BAŞKAN</b>	<b>Doç Dr Selim Kadioğlu</b> Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	
<b>ÜYELER</b>	<b>Prof Dr Davut Alptekin</b> Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
	<b>Prof Dr Dinçer Yıldızdaş</b> Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	
	<b>Prof Dr Mehmet Kanadaşı</b> Kardiyoloji Anabilim Dalı	
	<b>Prof Dr Gülşah Seydaoğlu</b> Biyoistatistik Anabilim Dalı	
	<b>Prof Dr Gürhan Sakman</b> Genel Cerrahi Anabilim Dalı	
	<b>Doç Dr Suat Gezer</b> Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	<b>Av. Zehra Bulut</b> Hukukçu Üye	Toplantıya Katılmadı
<b>Dr Neşe Kayrın</b> Kurum Dışı Üye	Toplantıya Katılmadı	