

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**DEMİR EKSİKLİĞİ ANEMİSİ OLAN HASTALARDA
KARSİNOGENEZ İLE İLİŞKİLİ MİKRORNA DÜZEYLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Ruveyda SAK

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Demircan ÖZBALCI

ISPARTA - 2020

TEŞEKKÜR

Bu uzun soluklu tez çalışmamın her aşamasında fikrine ve tecrübesine başvurduğum; desteğini hiç esirgemeyen, çalışma disiplini, azmi, çalışkanlığı ve bilgisi ile her zaman örnek aldığım tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Demircan ÖZBALCI'ya,

Uzmanlık eğitimim boyunca bana bilgi ve tecrübelerini aktaran başta İç Hastalıkları ABD Başkanı Prof. Dr. Muhammed Cem KOÇKAR olmak üzere değerli tüm hocalarıma;

Tezimin her aşamasında desteğini hiç esirgemeyen Dr. Öğretim Görevlisi Kuyuş Hekimler ÖZTÜRK'e,

Asistanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım, unutamayacağım onlarca anı biriktirdiğim Dr. Aslıhan BADUR, Dr. Bora Torus ve çok sevgili ailesi, Dr. Fatma GÜR HATİP ve ailesi, Dr. Mürşide TAN ve birbirinden değerli diğer tüm asistan arkadaşlarıma,

İç Hastalıkları ABD hemşireleri, sekreterleri ve çalışanlarına,

Hayatımın her döneminde bana destek olan, üzerimdeki en büyük emek sahibi canım aileme ve değerli meslektaşım canım kardeşim Dr. Bahadır SAK' a sonsuz teşekkürler...

Dr. Ruveyda SAK

Isparta/2020

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Demir Eksikliği Anemisi.....	3
2.1.1. Demir Eksikliği Anemisi Tanımı.....	3
2.1.2. Demir Metabolizması	3
2.1.3. Epidemiyoloji	4
2.1.4. Etyoloji	5
2.1.5. Semptom ve Bulgular	6
2.1.6. Tanı	7
2.1.7. Tedavi	9
2.2. Demir Eksikliği ve Kanseri	11
2.3. MikroRNA.....	13
2.3.1. MiRNA ve Demir Eksikliği.....	13
2.3.2. MiRNA ve Kanseri	14
3. MATERYAL METOD	16
3.1. Çalışmaya Alınacak Olguların Seçimi	16
3.2. Biyokimyasal Analizler	16
3.3. MiRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	17
3.3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	17
3.3.2. Primerler	17
3.3.3. Total RNA Kalitesinin ve Miktarının Tayini.....	18
3.3.4. miRNA İzolasyon Protokolü	18
3.3.5. cDNA İzolasyon Protokolü.....	18
3.3.6. Real Time PCR Protokolü	19
3.3.7. Verilerin Değerlendirilmesi:	19
3.4. İstatistiksel Analiz	19

4. BULGULAR	21
4.1. Grupların Hemogram ve Ferritin Açısından Değerlendirilmesi.....	22
4.2. MicroRNA Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi.....	23
4.3. Değişkenler Arasındaki Korelasyon.....	24
4.4. DEA Gelişiminde MiRNA'ların Etkisi	24
5. TARTIŞMA	26
ÖZET	32
ABSTRACT	33
KAYNAKLAR	34



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Demir Eksikliği Anemisinde Etyolojik Faktörler	6
Tablo 2. Demir eksikliği ve demir eksikliği anemisinde laboratuvar	8
Tablo 3. Grupların ek hastalık açısından karşılaştırılması	22
Tablo 4. Grupların hemogram ve ferritin değerleri	22
Tablo 5. Grupların plazma miRNA Δ Ct düzeyleri	23
Tablo 6. Değişkenler Arasındaki Korelasyon	24
Tablo 7. MiRNA'lar Arasındaki Korelasyon	24
Tablo 8. DEA gelişimi üzerinde miRNA'ların etkisi	25



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Yaş ortalamalarının gruplara göre dağılımı	21
Şekil 2. Gruplar arasında mikroRNA kat değişim $2^{-\Delta Ct}$ düzeyleri.....	23



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
CDK	: Siklin Bağımlı Kinazı
CYP	: Cytochrome P450
ÇH	: Çölyak Hastalığı
DEA	: Demir Eksikliği Anemisi
DMT-1	: Divalent Metal Transporter-1
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ES	: Eritrosit Süspansiyonu
Fe⁺²	: Ferröz
Fe⁺³	: Ferrik
GİS	: Gastrointestinal Sistem
Hb	: Hemoglobin
HD	: Hemodiyaliz
H.Pylori	: Helicobacter Pylori
H2	: Histamin
IBH	: İnflamatuar Barsak Hastalıkları
IDA	: İron Deficiency Anemia
IRIDA	: Demir Tedavisine Dirençli Demir Eksikliği Anemisi
IV	: İntravenöz
KBH	: Kronik Böbrek Hastalığı
KKY	: Kronik Kalp Yetmezliği
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
LATS2	: Large Tumor Suppressor Kinase 2
MCV	: Ortalama Eritrosit Hacmi
MİRNA	: MikroRNA
O₂	: Oksijen
PCD	: Programlanmış Hücre Ölümü
RES	: Retikuloendotelial Sistem
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SDBK	: Serum Demir Bağlama Kapasitesi
STFR	: Serumda Çözünür Transferrin Reseptörleri
THD	: Türk Hematoloji Derneği

TS : Transferrin Saturasyonu
VEGF : Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
VHL : Von Hippel-Lindau



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Demir eksikliği anemisi (DEA), dünyanın en sık görülen hastalığıdır. Yaklaşık 2 milyar insanı ilgilendirmektedir. İş gücü kayıpları, hayat kalitesini bozma, kognitif ve seksüel disfonksiyon ve immün sistemin çalışması üzerine olumsuz etkileri bulunmaktadır. Tanı ve tedavisi oldukça kolay olan DEA etyolojisinde maligniteler de önemli bir rol oynamakta; özellikle ileri yaş hastalarda DEA görülmesi, malignite araştırması açısından önemli bir klinik durum arz etmektedir. Bütün bu durumlar, çok sayıda klinik çalışma ile desteklenmiştir. DEA olan hastada oksidatif stres artmaktadır. DEA'nin, mitokondrial ve genomik instabiliteye yol açtığı, tümör anjiogenez ve metastazına yol açabildiği ve apoptozisi inhibe edebileceğini gösteren işaretler bulunmaktadır. Ayrıca, DEA'nin, doğal öldürücü hücreler ve lenfositlerin aktivitesini bozduğu, peroksidazın çalışmasını engellediği için immün sistemin doğru şekilde çalışmasını engellediği ve bu durumun, enfeksiyonlarla birlikte malignite oluşumuna da davetiye çıkardığı düşünülmektedir. DEA'nin malignite oluşumuna yol açabileceği fikri oldukça yeni ve araştırmaya açık bir konudur. Özellikle, yapmayı planladığımız çalışma benzeri bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Mikrornalar (miRNA), RNA'nın, anlamlı kod içermeyen, yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda küçük parçalarıdır. Son zamanlarda, bu anlamsız ve görevsiz olduğu düşünülen parçacıkların, protein transkripsiyon ve translasyonunda çok önemli işlevler gördüğü ve vücuttaki tüm sistemlerin çalışmaları üzerine etkileri olduğu saptanmıştır. Başta maligniteler olmak üzere, birçok hastalığın oluşmasında etkindirler. Hipoksi sonrası, miRNA-210 ve miRNA-373'ün aktive olarak DNA tamirinde sorumlu gen ekspresyonlarını azalttığı in vitro çalışmada gösterilmiştir. DEA'nde, hipoksi önemli bir yer tutmaktadır; buradan yola çıkarak, DEA'nde hipoksiye sekonder DNA tamirinden sorumlu genlerin ekspresyonlarının azalabileceği speküle edilmektedir. DEA'nde oluşan oksidatif stres sonrası, in vitro çalışmalarda önemli bir tümör supresör olan let-7'nin azalabileceği speküle edilmektedir.

Amacımız, maligniteler ile direkt olarak ilişkileri gösterilen bu miRNA'ların, demir eksikliği anemili hastalarda düzeylerinde değişiklik olup olmadığını

incelemektir. Bu miRNA'lerden miRNA-210 ve miRNA-373 düzeylerinin artmış, let-7 nin ise azalmış olduğu gösterilebilirse, DEA'nin basitçe selim bir hastalık olmadığı, malignite oluşumuna yol açabilecek bir hastalık olabileceği düşündüren yeni bir bulgu olarak literatüre girecektir. Hem hasta, hem de hekimler tarafından tedavinin daha ciddi ve daha uyumlu bir şekilde yapılacağı hem de dolaylı olarak kanser insidansında oldukça ucuz ve basit bir tedavi ile düşme sağlanabilmesi mümkün olacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Demir Eksikliği Anemisi

2.1.1. Demir Eksikliği Anemisi Tanımı

Anemi; hemoglobin (hb) miktarının bireyin yaş ve cinsiyeti için normal olarak kabul edilen değerlerin altında olmasıdır (1). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), hb değerinin kadınlar için < 12 g/dL (gebelerde ise 11 g/dl'nin altında) ve erkekler için < 13 g/dL olmasını anemi olarak tanımlanmaktadır. Anemi, erişkinlerde iş kapasitesinde azalma, konsantrasyon güçlüğü, sınav başarısında azalma, hayat kalitesinde düşme gibi durumlar için bir risk faktörüdür.

DEA ise anemi ile birlikte toplam vücut demirinde azalma olarak tanımlanır. Dünyada en sık görülen anemidir. Serum ferritin değeri, DEA'nde en sık kullanılan tanı parametresidir, ancak konsantrasyonu yaşla ve enflamatuar hastalıkların varlığı ile artar (2). Transferrin saturasyonu (TS), serum demiri, serum demir bağlama kapasitesi (SDBK) gibi diğer laboratuvar testleri de yararlı bilgiler sağlayabilir.

Türk Hematoloji Derneği (THD) anemi kılavuzuna göre serum ferritin düzeyinin <15 ng/mL olması DEA tanısını koydurmaktadır. Ayrıca serum demirinde azalma, SDBK'nde ve transferrin bağlayan reseptörlerde artma görülebilir. Eritrositlerde ise mikrositer hipokromi mevcuttur (3).

Çok sayıda kronik hastalık, kronik böbrek hastalıkları (KBH), kronik kalp yetmezliği (KKY), inflamatuvar barsak hastalıkları (IBH) ve kanser sıklıkla DEA ile ilişkilidir (4-6).

2.1.2. Demir Metabolizması

İnsan vücudunda total demir miktarı yaklaşık 4-5 gramdır. Bunun yaklaşık %65'i gelişen eritroblast ve hb'de, %4 kadarı myoglobulinde, %1'i hücre içi oksidasyon olaylarında yer alan çeşitli hem bileşiklerinde, %0,1 kadarı ise plazma transferrin proteini ile birleşir. Kalan kısım da retikuloendotelial sistem (RES) ve karaciğerde depo formu olan ferritin şeklinde bulunur (7). Demirin en önemli görevi hb yapısına katılarak dokulara oksijen (O₂) taşımasıdır. Hb'nin yapısına dahil olmak

için protoporfirine bağlanır. Demir aynı zamanda kas yapısındaki miyogloblin sentezinde de yer alır. Bunlar haricinde demir; süperoksidaz, katalaz gibi bazı antioksidan enzimlerin, enerji üretimindeki sitokrom, sitokrom oksidaz gibi enzimlerin de sentezinde yer alır. Geri kalan demir ise ferritin ve hemosiderin olarak depolanır (8). Demir, insan vücudunda +2 değerlikli ferröz (Fe^{+2}) ve +3 değerlikli ferrik (Fe^{+3}) formda bulunur ve bu iki form arasında geçiş yapabilir (9). Bu özellik sayesinde, O_2 bağlayan birçok enzim ve molekül için değerli hale gelir (10). Demir Fe^{+2} şeklinde duodenumdan ve üst jejunumdan emilir. Diyetle alınan Fe^{+3} , intestinal epitelden transportu gerçekleşmeden önce, ferritin redüktaz enzimi tarafından Fe^{+2} formuna indirgenir (ferritin redüktaz enzimi koenzim olarak C vitamini kullanır). Fe^{+2} 'ye indirgindikten sonra divalent metal transporter-1 (DMT-1) aracılığı ile fırçamsı kenar membranından enterositlere alınarak transport gerçekleşmektedir. DMT-1 düşük pH'larda fonksiyonel olmaktadır ve bu nedenle de antiasitler veya histamin 2 reseptör (H2) blokörlerinin kullanıldığı durumlarda asidik pH'nın ortadan kalkmasına bağlı DMT-1'in fonksiyonu azalır. Fe^{+2} barsak epitelinde basolateral membrandan plazmaya ferroportin aracılığı ile transfer olmaktadır. Hepsidin aracılığı ile de Fe^{+3} olarak dolaşıma salınmakta ve plazmada transferrine bağlanmaktadır. Demir transferrine bağlanarak kullanılacağı, depolanacağı yerlere taşınmaktadır ve hedef hücreye ise reseptör bağımlı endositoz tarafından alınmaktadır. Hedef hücrede demirin endozomal membrandan sitoplazmaya geçişi ise DMT-1 aracılığıyla olur. Sitoplazmaya geçen demir, mitokondride hem sentezinde ve diğer metabolik işlerde kullanılır (11). Hepsidin ile makrofajlardan ve duodenumdan emilen demirin plazmaya salınımı engellenerek demir dengesini düzenlenmektedir (12).

2.1.3. Epidemiyoloji

Demir eksikliği dünya nüfusunun büyük bir bölümünü, özellikle de üreme çağındaki kadınları, çocukları ve düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşayan bireyleri etkiler. Ancak demir eksikliğinin mutlak prevalansı çalışılan popülasyona bağlıdır (13).

2010 yılında, küresel anemi prevalansı % 32,9 tespit edilmiş ve aralarında en yaygın nedenin demir eksikliği olduğu görülmüştür. 1990'dan 2010'a kadar olan süreçte, küresel anemi yükünün yapılan sistematik bir analizinde, DEA prevalansının

ve genel olarak aneminin azalmış olduğu ancak DEA'nin önemini koruduğu görölmüştür (14).

2.1.4. Etyoloji

Demir eksikliğinin ana nedenlerini başlıca diyetle alımın azalması, emilimin azalması ve kan kaybı oluşturmaktadır. Ancak nedenleri yaşa göre, toplumun gelişmişlik düzeyine göre değişim göstermektedir. Gelişmiş olmayan ölkelerde diyete bağlı iken, gelişmiş ölkelerde ise gizli veya aşıkâr kanamaya sekonder görölmektedir (13). Çocuklarda ön planda diyet, üreme çağındaki kadınlarda ise menstrüal kayıptan kaynaklı DEA söz konusudur. Erişkin erkekler ve postmenapozal kadınlarda ise gastrointestinal sistemden (GİS) olan gizli, kronik kan kaybı ön plandadır (15).

Demir içeriğinin kendisine ek olarak, demirin biyoyararlanımı büyük ölçüde diyet bileşenlerine bağlıdır (16). Hem formundaki demir özellikle biyolojik olarak kullanılabilir ve et içeren diyetler de faydalıdır (17). C Vitamini, demirin diyette kullanılabilirliğini artırırken, çay veya diğer demir şelatlayıcı maddelerden kaçınılması da demir emilimini artırır (18).

Bununla birlikte, demir emilimini engelleyen bazı tıbbi durumlar da mevcuttur. Demir emiliminden sorumlu olan mukozal hücreleri etkileyen atrofik gastrit, *Helicobacter pylori* (H.Pylori) enfeksiyonu, çölyak hastalığı, bariatrik cerrahi gibi bozukluklar klinik olarak önemlidirler (13).

Çölyak hastalığı genetik yatkınlığı olan bireylerde, glutene karşı gelişen immün yanıt neticesinde ortaya çıkan otoimmün bir hastalıktır. Toplumun yaklaşık %1'ini etkilemektedir. Hastalar genellikle kilo kaybı, ishal, steatore, ve anemi bulguları ile başvururlar. Açıklanamayan veya tedaviye yanıtı olmayan DEA'sinde çölyak hastalığı mutlaka akılda tutulmalıdır. Endoskopi yapılan hastalarda çölyak hastalığı açısından endoskopik görünüme bakılmaksızın duodenal biyopsi yapılabilir.

Çölyak hastalığında anemi başta olmak üzere sıklıkla hematolojik anormallikler gelişebilir. Anemi sıklıkla B12 vitamini, folik asit ve demir malabsorbsiyonu nedeniyle oluşur. Tedavide çölyak diyetiyle birlikte eksik olan

maddenin replasmanı önerilmektedir. Çölyak hastalarında en sık saptanan bulgu ise DEA 'dir (19).

Demir emilimini engelleyen kalıtsal bozukluklar çok nadirdir. Demir tedavisine dirençli demir eksikliği anemisi (IRIDA) demir eksikliğinin olduğu durumlarda hepsidin üretimini baskılayan matriptaz-2'yi kodlayan TMPRSS6 genindeki mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir. Hastalığın başlıca özellikleri hipokromik mikrositer anemi, ortalama eritrosit hacminin (MCV) çok düşük olması, oral demir replasmanına yanıtızsızlık (veya kısmi yanıt) ve parenteral demire kısmi yanıtıdır (20).

Demir eksikliği anemisinin etyolojisindeki diğer faktörler tablo 1'de gösterilmiştir (13, 21).

Tablo 1. Demir Eksikliği Anemisinde Etiyolojik Faktörler

Demir alımında azalma	Demir kaybında artma	
1) Diyetle yetersiz alım	1) GİS Kaynaklı	2) Diğer kronik ve gizli kan kayıpları
2) Emilim problemleri		
Çölyak hastalığı Gastrektomi Duodenal bypass IBH Bariyatrik Cerrahi H. Pylori enfeksiyonu Atrofik gastrit KBH Tanatlar, fosfatlar, fitatlar Kalsiyum içeriği yüksek gıdalar Antiasid ilaçlar IRIDA	Özefagit Özefagus Varisleri Gastrit Peptik ülser H. Pylori enfeksiyonu Neoplaziler Hiatal herni IBH Arteriyovenöz malformasyon Parazitler Kortikosteroidler Salisilatlar Non steroid antinflamatuarlar Egzersiz ilişkili kanama Hemoroid	Üriner/pulmoner hemosiderozis Hemodializ hastaları Kanama diatezi Travmatik kanama Hemoptizi Hematüri Menoraji Sık kan bağıışı Gebelik ve laktasyon İntravasküler hemoliz

2.1.5. Semptom ve Bulgular

DEA'nde hem demir eksikliği hem de anemiye bağlı olarak semptomlar görülür. Anemi belirtileri halsizlik, yorgunluk, çarpıntı, baş ağrısı, baş dönmesi, kulak çınlaması, nefes darlığı, alışılmadık bir şekilde buz ya da toprak yeme isteği,

tırnaklarda kırılma, yutma güçlüğü (Plummer Vinson Sendromlu hastalarda), özellikle kadınlarda saç dökülmesi olabilir (22).

En şiddetli semptom, demir depolarındaki hafif düşüşlerde bile görülebilen yorgunluktur. Yapılan bir çalışmada demir eksikliği olan fakat anemik olmayan adölesanlarda demir desteği ile yorgunluk şikayetlerinde iyileşme gösterilmiştir. DEA'nin sık görülen bir başka belirtisi de soğuk intoleransdır. Bu semptomların bazıları anemi nedeniyledir, anemi düzeldiğinde genellikle düzelirler. Bununla birlikte, demir eksikliği olan fakat anemik olmayan bazı hastalarda da soğuk intoleransı görülmüştür. Bu durum tiroid hormonunun etkinliğinin azalmasına bağlı olabilir. Tiroid hormonun hücre içi etkinliği demir depolarına bağlıdır, bu nedenle demir eksikliği hormonun etkinliğini azaltır. Kalp yetmezliği olan hastalarda eksik demir depolarının doldurulmasının kalp fonksiyonlarını ve yaşam kalitesini iyileştirdiği, hastanede kalmayı azalttığı gösterilmiştir. Huzursuz bacak sendromu, hastaların rahatsız edici bacak krampları, bacakları gece hareket ettirme ihtiyacı duyduğu bir durumdur. Çoğunda düşük demir depoları görülür, ancak birçok hastada, demir replasmanı semptomları kontrol eder (23).

Yapılan fizik muayene normal olabileceği gibi DEA'li hastalarda solukluk, kuru cilt, atrofik glossit, mavi sklera, kaşık tırnak ve ağır olgularda alopesi gibi bulgular görülebilir.

2.1.6. Tanı

Vitamin B12 ve folik asit eksikliği, böbrek yetmezliği, inflamatuvar hastalıklar gibi karışık faktörler olmadıkça DEA tanısı koymada zorluk yoktur. Tanı için tüm laboratuvar bulguları birlikte değerlendirilmelidir.

Demir eksikliği ve DEA'sindeki laboratuvar bulguları tablo 2'de verilmiştir (22).

Tablo 1. Demir eksikliği ve demir eksikliği anemisinde laboratuvar

Test	Demir eksikliği	DEA
Hb	N	Azalmış
Serum demiri	N	Azalmış
SDBK	N	Artmış
TS	N	Azalmış
Ferritin	azalmış	Azalmış
MCV	N	Azalmış
RDW*	N	Artmış
PY**	N	Anormal
Kemik iliği demiri	azalmış	azalmış

*RDW: Eritrositlerin büyüklüklerine göre dağılım genişliği

** PY: Periferik yayma

DEA’nde eritrositler hipokromik ve mikrositiktir. Tam kan sayım sonuçlarında eritrosit sayısının azalması DEA’sini talasemiden ayırmada önemlidir. RDW düzeyi artar. RDW anizositoz göstergesi olup, inflamatuvar patolojilerden etkilenmez.

Ferritin düzeyi de DEA tanısında en sık kullanılan testlerden olup, inflamasyonun yokluğunda, serum ferritin ölçümü, toplam vücut demir depolarıyla ilgili en özgün testtir, inflamatuvar durum varlığında makrofajlarda biriken demir nedeniyle düzeyi artabilir ancak DEA dışlanamaz. Ferritin düzeyi 15 µg / L eşik değerinin altı DEA tanısı için anlamlıyken, inflamatuvar durumlar için ferritin konsantrasyonunun 50 µg / L veya daha yüksek değerlerde, KBH ‘nda 100 µg / L üzeri ve hemodiyaliz (HD) durumunda ise 200 µg / L üzeri değerlerin baz alınması önerilmiştir (22).

Demir eksikliği durumunda, serum demiri azalır ve toplam SDBK artar, bu da TS önemli bir düşüşe (yani serum demirinin toplam demir bağlama kapasitesine oranı) neden olur. Saturasyon düzeyi % 15 altı anlamlı olabilir, ancak inflamasyon varlığında % 20 altı kullanılır.

PY'da bulgular aneminin süresine şiddetine göre değişmektedir. Eritrositlerde hipokromi, mikrositoz, poikilositoz, anizositoz görülür. Kalem hücreleri, hedef hücreleri, uzun süreli anemide nötrofillerde hipersegmentasyon izlenebilir.

Kemik iliği aspirasyonunun DEA tanısında altın standart olduğu düşünülmektedir. Enflamasyondan etkilenmez ve oldukça spesifiktir. Tanıda prusya mavisi ile boyama sonrası eritroblastlarda ve makrofajlarda demir görülmez. Ancak invaziv bir girişim olması sebebiyle pahalı ve hastalar için rahatsız edicidir. Pratikte DEA tanısı için kullanılmamaktadır.

Demir hem sentezinin son aşamasında protoporfirin halkasına bağlanır. Demir eksikliği durumunda ise çinko protoporfirin halkasına bağlanır, bu nedenle, eritrositlerde artan bir çinko protoporfirin konsantrasyonu, DEA ile ilişkilidir. Demir eksikliği dışındaki enfeksiyon, inflamasyon, kurşun zehirlenmesi, hemolitik anemi, artan bilirubin ve HD gibi durumlar da artmasına neden olabilir. Çinko protoporfirin ölçümleri, testin otomasyon zorluğundan dolayı çoğu klinik laboratuvarında yaygın olarak yapılmamaktadır.

Demir eksikliği durumunda, hepatosit ve eritroid hücrelerde transferrin reseptör seviyesi artar, ligandı ile birleşemeyince de serumda çözünür transferrin reseptörleri (sTfR) artar. Ancak standartizasyon problemi nedeniyle günümüzde pek tercih edilmemektedir.

Hepsidin düzeyi de demir eksikliğinin derinliğine bağlı olarak düşer. Düzeyine sabah aç bakılmalı, ancak inflamatuvar süreçlerde artması, karaciğerde sentezlenip böbrekten atılması sebebiyle de karaciğer ve böbrek fonksiyonları, sedimentasyon hızı ile beraber değerlendirilmelidir. Ancak standartizasyon problemi nedeniyle klinik kullanımı kısıtlıdır (22, 24).

2.1.7. Tedavi

Tedavide amaç; hb değerini normalleştirmek ve demir depolarını doldurmak, böylece semptomları gidermek, yaşam kalitesini ve birçok kronik hastalık sürecini iyileştirmek için yeterli demir replasmanı yapmaktır. Ancak demir eksikliğine neden olan durum hayati tehdit edici bir durum olabilir. Bu nedenle öncelikle etyolojinin aydınlatılması önerilir (24).

Tedavi ile demir replasmanı yapılırsa bile altta yatan neden devam ettiği müddetçe en başa dönülmesi kaçınılmazdır. Tedavi hızı ve şekli hastadan hastaya değişmekle birlikte ciddi kardiyak yakınma durumunda eritrosit süspansiyonu (ES) vermek gerekebilir. Bir ünite ES ile 200-250 mg demir verilmektedir (22).

Tedavide iki farklı yaklaşım vardır: risk altındaki popülasyonlarda DEA'sini önlemek ve kanıtlanmış hastalığı olanlarda terapötik demir takviyesi uygulamaktır (24).

DSÖ tarafından öncelikle diyetle ilgili yaklaşımlar önerilmektedir. Beyaz ve kırmızı et gibi demirden zengin gıdalar, baklagiller ve yeşil yapraklı besinler önerilmektedir. Demirin absorpsiyonunu artırmaya yönelik askorbik asit takviyesinden yararlanılabileceği gibi, emilimin azalmasına sebep olacak fitat, tanen ve kalsiyum, demirden zengin diyet esnasında tüketilmemelidir. Yiyeceklere demir eklenmesi de DEA mücadelesinde düşünülebilir. Demir, toplum tarafından yaygın olarak tüketilen yiyeceklere tat ve fiyat değişimi yapılmadan eklenebilir (24).

Tedavinin verilmiş biçimi hastaya, aneminin derinliğine ve maliyete göre düzenlenir. Emilim problemi olmayan hastalarda öncelikli tercih oral demir preparatlarıdır. Oral tedavi ucuz, etkili, kolay uygulanabilmesi ve güvenli olmasından dolayı ilk tercih edilen yöntemdir. Hastada oral alıma bağlı ciddi intolerans geliştiğinde, sindirim sisteminde demir emilimi engelleyen rahatsızlıklarda, KBH'nda, sistemik inflamatuvar hastalıklarda, IRIDA gibi rahatsızlıklarda ve hızlı bir şekilde demir replasmanı yapmak gerektiğinde intravenöz demire başvurulabilir (13, 22).

Çok sayıda oral demir preparatları bulunmaktadır. Bunlar; ferröz glukonat, ferröz sülfat, ferröz fumarat ve polisakkarit demir kompleksidir. Bunlar arasında etkinlik açısından fark saptanamamıştır (24). Ancak Fe^{+3} ve Fe^{+2} nin karşılaştırıldığı çalışmalarda Fe^{+2} ile tedavinin Fe^{+3} 'e üstün olduğu gösterilmiştir (25).

Önerilen günlük doz 150-200 mgdır. Etkin emilim için yemeklerden bir saat önce alınmalı, çay, kahve, süt ve süt ürünleri ile alınmamalıdır. İlaç etkileşim riskinden dolayı başka ilaçlarla da aynı zamanda alınmamalıdır. Oral tedavi ile dışkı renginde koyulaşma, karın ağrısı, bulantı ve dispeptik yakınmalar, ishal, kabızlık görülebilir. Sindirim sistemi kaynaklı yan etkiler nedeniyle ilacın yemeklerden 2 saat

sonra alınması denenebilir. Düzenli ve uygun tedavi sonrası hb düzeyi 2-4 ayda normale döner ancak demir depolarını doldurmak için tedaviyi 4-6 aya tamamlamak gerekir (22).

Parenteral demir preparatlarının 6 tane formu (demir sükröz, ferrik glukonat, ferrik karboksimaltoz, demir izomaltosid-1000, ferumoksil ve demir dekstran (düşük moleküler ağırlıklı formlar)) mevcuttur. Yüksek moleküler ağırlıklı demir dekstran, diğer preparatlara göre daha yüksek oranda ciddi anafilaktik reaksiyonlarla ilişkili olup, yapılan bir araştırmada, ABD'de 1976 ve 1996 yılları arasında gerçekleşen 31 ölüm bu preparat ile ilişkili saptanmış, piyasadan geri çekilmiştir. Ancak, düşük moleküler ağırlıklı demir dekstran ve diğer yeni formülasyonlar, ferrik glukonat ile aynı güvenlikte görülmektedir (24). Parenteral demir uygulamalarında premedikasyon yapılmasına gerek yoktur. Ancak akut enfeksiyon durumunda, alerjik reaksiyonlarda ve gebelerde ilk trimesterde uygulanmamalıdır.

Verilecek iv demir hesaplanması: (hedef hb- mevcut hb) x kilo x 2,2 bu formüle ek olarak erkek hastalarda 1000 mg ve kadınlarda 600 mg depo demiri olacak şekilde eklenebilir.

Demir tedavisine rağmen hb miktarında düzelme olmazsa öncelikle tanının doğruluğundan emin olunmalıdır. Tedaviye uyum, verilen tedavi yeterliliği, kaybın sürüp sürmediği sorgulanmalıdır (24).

2.2. Demir Eksikliği ve Kanser

Farklı fizyolojik süreçler ve immün sistemin çalışmasında, antioksidan, antienflamatuar ve immünomodülatör özellikleri nedeniyle selenyum, çinko ve demir gibi birkaç temel besin maddesi gerekir (26).

Demir ayrıca hücre çoğalması ve farklılaşması, bağırsak sağlığının korunması, ilaç / toksik metabolizma ve DNA sentezi / onarımı için de gereklidir (27-29). Dahası, DEA'nin gen ekspresyonu üzerinde muhtemelen farklı mekanizmalar tarafından farklı etkileri vardır. DEA; oksidatif stres, mitokondriyal defekt, DNA hasarı / genomik instabilite, anjiyogenez ve hücre karsinogenezine yol açan apoptoz inhibisyonuna neden olur (30). DEA ayrıca antimikrobiyal aktiviteleri ve hücre

aracılı immüniteyi azaltarak, tüm bağışıklık sisteminin işlevsizliğinden de sorumludur (31, 32).

Demir eksikliği sırasında çok yaygın bir özellik olan hipoksi, tümör mikro ortamını da değiştirmiştir (33, 34). Kronik hipoksinin, bir tümör baskılayıcı protein olan Von Hippel-Lindau'yu (VHL) bozduğu, bir fare çalışmasında tümör ilerlemesinde ve tedavi direncinde ana rol oynadığı bildirilmiştir (35).

Apoptoz, programlanmış hücre ölümünün (PCD) sürecidir. Hücrelerin fizyolojik olarak silinmesinden sorumludur; apoptotik cismin varlığı, sitokrom-c'nin sitozola salınması, kaspaz-3 aktivasyonu, kromatin yoğunlaşması ve parçalanması gibi çekirdek ve sitoplazmada belirgin morfolojik değişiklikler ile karakterizedir (36). Apoptozun mitokondriyal yolunda, ana proapoptotik proteinlerden biri olan sitokrom-c, mitokondrinin intermembran boşluğundan sitozole salınır (37). Sitokrom-c, hem içeren bir elektron taşıma proteindir ve redoks ara maddesi olarak görev yapar (38, 39). Longpre ve diğerlerinin yapmış olduğu bir çalışmada; HCT-116 kolon epitel hücrelerinin apoptoz geçirmesi için yeterli hücre içi demirin gerekli olduğunu bildirmişlerdir (40).

Rat beyinlerinin bazı bölgelerinde yapılan bir çalışmada perinatal demir eksikliğinin sitokrom-c oksidaz aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (41). Azalan bu sitokrom-c oksidaz ekspresyonu da apoptoz direnci ile anlamlı olarak korele gelmiş olup demir eksikliği; hipoksiyle hücre sağkalımı ve kanserin ilerlemesine yol açan farklı apoptotik gen ifadelerini de değiştirmiştir (42, 43). Sıçanlarda yapılan iki çalışmada, demir eksikliğinin bağırsak hücrelerinde toksik bileşiklerin metabolize edilmesi için Cytochrome P450 (CYP) sisteminin aktivitesini azalttığını gösterilmiştir (44, 45). Kolorektal hücrelerde ve Xenograft fare modelinde CYP2S1 geninin tükenmesi, kolorektal karsinogenezinin geliştirilmesinden sorumlu olmuştur (46). Bu nedenle DEA, CYP sisteminin faaliyetlerini değiştirebilir ve böylece kolorektal kanser gelişimi için bir risk faktörü olabilir.

Yapılan başka bir çalışmada, izole edilmiş insan nötrofillerinde demir şelatörleri ile hücrelerin reaktif oksijen türleri (ROS) üreten enzimler; ksantin oksidaz ve glikoz oksidaz, inkübe edilerek indüklenen apoptoz oluşumunun azaldığı bildirilmiştir. Benzer şekilde vasküler düz kas hücrelerinde de mevcut demirin

bağlanması ve tüketilmesinin, apoptoza giren bu hücrelerin sayısını azalttığı bildirilmiştir. Bu bulgular, demirin hücre ölüm süreci için gerekli bir element olduğunu göstermektedir (40).

2.3. MikroRNA

MiRNA'lar, anlamlı kod içermeyen yaklaşık 22 nükleotidden oluşan DNA'nın korunmuş bölgelerinden kodlanan küçük RNA parçalarıdır.

Son zamanlarda, bu anlamsız ve görevsiz olduğu düşünülen parçacıkların, protein kodlamadığı ancak protein transkripsiyon ve translasyonunda çok önemli işlevler gördüğü bilinmektedir. Gen ekspresyonunu düzenleyerek, hedef genlere bağlanıp veya messenger RNA (mRNA) yıkımını indükleyip protein üretimini engellediği bilinmektedir. Bütün hücrelerde yer alır. Hücrelerin büyümesinde, farklılaşmasında ve apoptoz gibi önemli biyolojik süreçlerde rol oynar. Vücuttaki tüm sistemlerin çalışmaları üzerine etkileri olduğu saptanmıştır (47-49).

MiRNA'lar hem hücre çekirdeğinde hem de sitoplazmada gerçekleşen üç aşamalı süreç sonucunda meydana gelir. İlk aşamada RNA polimeraz II enzimi tarafından genomik DNA'dan primer miRNA (pri-miRNA)'lar sentezlenir. İkinci aşamada nükleustaki pri-miRNA, Drosha ve kofaktörü Pasha (veya DGCR8), aracılığıyla yaklaşık 70 nükleotid uzunluğundaki pre-miRNA'ya dönüştürülür. Üçüncü ve son aşamada pre-miRNA molekülü Exportin 5 reseptörü ve RAN-GTP Proteini aracılığıyla sitoplazmaya taşınır (50). Pre-miRNA'lar RNAaz III enzim (Dicer) aracılığıyla 18-24 nükleotid uzunluğunda kesilerek olgun miRNA'lara dönüşür (48).

2.3.1. MiRNA ve Demir Eksikliği

MiRNA'lar, hücrel demir alımı, depolanması ve kullanımıyla ilişkili genleri post transkripsiyonel olarak düzenleyen demir homeostazında rol oynar. Yeterli demir bulunmadığında hb üretimi düşer, kanın O₂ taşıma kapasitesi azalır ve doku O₂ iletimi sınırlanır. O₂ ve demir arasındaki ilişkide, demir homeostazının devamı için sınırlı demir mevcudiyetinin varlığında demir depoları kullanılmaktadır. O₂ seviyeleri düşük olduğunda, dokularda O₂ kullanılabilirliğini geri kazanmak, hb ve

eritrosit üretimini arttırmak için demir depoları mobilize edilir (51, 52). MiRNA'ların biyogenez ve ekspresyonu büyük ölçüde hipoksi tarafından düzenlenir. Hipoksi ile indüklenebilir miRNA-210 tümörlerin hipoksik bölgelerde hücre çoğalmasını, Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF) ekspresyonunu ve hücre sağkalımını destekler (53, 54). Hipoksiye bağlı olarak, MiRNA-210 ve MiRNA-373'ün aşırı ekspresyonunun, in vitro bir çalışmada sırasıyla RAD52 ve RAD23B genlerini down regüle ettiği bildirilmiştir. Bu genler DNA onarım sistemlerinden sorumludur (55). Bir başka örnek çeşitli in vitro çalışmalarda tümör baskılayıcı miRNA olarak gösterilen let-7 miRNA'dır (56-59). Let-7 ekspresyonu işitsel hücrelerle yapılan in vitro bir çalışmada oksidatif stres ile azalmıştır (60). Yukarıdaki bulgular, demirin miRNA'larda ve hipokside anahtar bir element olduğunu ve DEA'nin neden olduğu ROS'un, kanser riskinin artmasına neden olan miRNA'ların gen düzenleme sistemini olumsuz yönde etkileyebileceğini göstermektedir.

2.3.2. MiRNA ve Kanser

MiRNA'lar spesifik onkogenleri, tümör süpresörleri ve kanser kök hücrelerini düzenleyerek tümör oluşumunda ve metastaz gelişiminde rol oynarlar (61).

MiRNA'ların kanserleşmeye etkisi ilk olarak 2001 yılında miRNA-15a ve miRNA16-1'in keşfiyle, etki mekanizması ise 2005 yılında ortaya konmuştur. Cimmino ve arkadaşları tarafından KLL (Kronik Lenfositik Lösemi) hücrelerinde, anti-apoptotik protein Bcl-2'nin seviyesi ile miRNA-15a ve miRNA16-1 düzeyinin ters ilişkili olduğu, dolayısıyla miRNA-15a ve miRNA16-1'in tümör süpresör aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (48).

MiRNA'ların onkogenik veya tümör baskılayıcı özellik kazanımı, hedefledikleri mRNA'nın moleküler yollardaki özelliğine göre değişir. Onkogen miRNA, bazı kanser vakalarında ekspresyonları artan miRNA'lar olarak tanımlanırken, bir onkogenin ekspresyonunu baskılayıp, kontrol ederek tümör oluşumunu engelleyen miRNA'lar "tümör süpresör miRNA'lar"(TS-mir) olarak adlandırılmaktadır. TS-mir ekspresyonunun azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına dolayısıyla tümör oluşumuna sebep olur (50). MiRNA 17-92, miRNA-372

ve miRNA-373, miRNA-21 onkogenik miRNA'lar olarak bilinirken, miRNA-15a ve miRNA 16-1, Let-7 ve miRNA-143 ise TS-mir'lerdendir (62).

MiRNA-372 ve miRNA-373 onkojenik fonksiyonunu, p53 aracılı siklin bağımlı kinazı (CDK) ve Large Tumor Suppressor Kinase 2 (LATS2) tümör baskılayıcı genin ekspresyonunu inhibe ederek gerçekleştirmektedir. Testis germ hücreli tümörlerde ekspresyonu görülür (63).

Let-7 memelilerde ilk keşfedilen miRNA'lardan olup onkogen olan RAS'ın aktivitesini kontrol etmektedir. Let-7, RAS onkogeninde yer alan kendisi için özel olan mRNA bölgesine bağlanarak protein translasyonunu engeller. Düşük seviyedeki let-7, RAS geninin kontrolsüz bir şekilde fonksiyon göstermesine neden olur. Yapılan son çalışmalarda, yine let-7 ailesinin diğer onkogenlerden c-Myc31 ve HMGA230' un mRNA'larını da inhibe ettiği bildirilmiştir (48, 50).

Yapılan bir çalışmada let-7'nin renal hücreli karsinomda (RCC) tümör baskılayıcı olarak davrandığı, let-7 ailesinden let-7b ve let-7c'nin RCC dokularında down regüle olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, let-7b ekspresyonunun azalmasının RCC'de hastalık derecesi ve kemoterapiye dirençle ile ilişkili olduğu gözlenmiştir (64).

Bir başka çalışmada da akciğer tümörü dokularında, normal akciğer dokusuna göre önemli ölçüde azaltılmış let-7 seviyeleri ve önemli ölçüde artmış RAS proteini seviyeleri gösterilmiştir (48).

Volinia ve arkadaşları tarafından invaziv duktal karsinomlu hastalarda miRNA-210 ekspresyonunun metastaz ve sağkalım süresi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (108).

Jung ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada meme kanseri olan hastalarda plazmada yüksek miRNA-210 ekspresyon düzeyinin tümör yükü ve HER2 pozitif meme kanseri olan hastalarda trastuzumab direnci ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (65). Ancak daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

3. MATERYAL METOD

Bu çalışma için Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 13.12.2018 tarih ve 238 numarayla onay alınmıştır. Çalışmaya alınması planlanan tüm kişiler araştırma hakkında sözel ve yazılı olarak ayrıntılı bilgilendirildi ve çalışmayı kabul edenler 'bilgilendirme ve onay imzaları' alındıktan sonra çalışmaya dahil edildi.

3.1. Çalışmaya Alınacak Olguların Seçimi

Çalışmaya Kasım 2018 ve Haziran 2020 tarihleri arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Polikliniğine başvuran 18-65 yaş arası DEA olan 35 hasta ve kontrol grubu olarak herhangi bir hastalık ve ilaç kullanımını olmayan 10 sağlıklı kişi (SK) dahil edildi.

Demir tedavisi başlanmış olması, inflamasyona neden olabilecek hastalık (akut enfeksiyöz hastalıklar, maligniteler, inflamatuvar romatizmal hastalıklar gibi), gebelik çalışmaya dahil edilmeme kriterleriydi.

3.2. Biyokimyasal Analizler

Tüm hastalardan biyokimyasal tetkikler için brakial venden 10 cc venöz kan örnekleri alındı. Alınan örneklerden hemogram ve ferritin ölçümleri yapıldı.

Tam kan sayımı olan CBC analizi, Beckman Coulter DxH800 (Brea, CA, ABD) cihazında, Coulter yöntemi ile yapıldı. Coulter yöntemi; iletken bir sıvıdaki bir partikül (örneğin bir hücre) küçük bir açıklıktan geçtiği sıradaki elektriksel direnç değişikliklerini belirleyerek ve ölçerek, hücreleri doğru şekilde sayar ve boyutlarını belirler.

Hemoglobin 525 nm 'de fotometrik yöntemle ölçüldü. Hct, MCH, MCHC hesaplandı. MCV, RDW, Rbc histogramından elde edildi.

Ferritin, Cobas e 601 (Mannheim, Almanya) cihazında elektrokemilüminans immünassay (ECLIA) yöntemiyle çalışıldı. Yöntem sandviç prensibine dayanmaktadır.

3.3. MiRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Hastalardan EDTA'lı tüplere 4cc kan alındı. Alınan kanlar 1-2 saat içinde soğutmalı santrifüjde 15.000 rpm'de 10 dk döndürülerek plazma kısmı cDNA izolasyonu yapılabileceği kadar -80 C'de muhafaza edildi.

Çalışmada; soğutmalı santrifüj (Thermo), mikrosantrifüj (Thermo), -80C derin dondurucu (Thermo), vorteks (Nüve), spektrofotometre (NanoDrop ND-1000), termal Cyclers (Thermo), mikropipetler (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl) (Eppendorf Research), çeker ocak, distile su cihazı (Barnstead), buzdolabı (Profilo), güç kaynağı (Apelex), real-time PCR (Applied Biosystems StepOnePlus) cihazları kullanıldı.

3.3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Çalışmada; RiboEx™ solüsyon (GeneAll), Buffer SW1 (GeneAll), Buffer RBW (GeneAll), Buffer RNW (GeneAll), RNase-free water (GeneAll), GeneAll® Column type B (red ring) (with collection tube) (GeneAll), GeneAll® Column type W (blue ring) (with collection tube) (GeneAll), 2 ml collection tube (GeneAll) ve 1.5 ml collection tube (GeneAll) Hybrid-R miRNA izolasyon kiti (GeneAll) olarak kullanılmıştır.

3.3.2. Primerler

Kontrol olarak U6 gen bölgesine ait diziler kullanılmıştır. Yetkili firma tarafından Erika Varkonyi-Gasic and Roger P. Hellens'in Quantitative Stem Loop RT-PCR for Detection of MicroRNAs (Chapter 10) makalesi kaynak alınarak RT, Forward ve Reverse primerleri tasarlanmıştır. Çalışmada kullanılan primer dizileri aşağıda belirtilmiştir.

Hsa-miR-210:

Forward: AGCCCCTGCCCACCGCACACTG

Hsa-miR-373:

Forward: GAAGTGCTTCGATTTTGGGGTGT

Hsa-let-7:

Forward: CTGTACAACCTTCTAGCTTTCC

3.3.3. Total RNA Kalitesinin ve Miktarının Tayini

Kaliteli total RNA istatistiksel olarak doğru karşılaştırılma yapılması için gereklidir. İzole edilen total RNA'ların nanodrop spektrofotometre cihazıyla ölçümleri yapıldı. A260/230 oranı 1.8'in altındaki veya A260/230 oranı 2.0'ın altında olan örnekler çalışmaya dahil edilmedi. Elde edilen total RNA çalışmaya kadar -20 C'de saklandı. Saklanan total RNA örneklerinden miRNA izolasyonu yapıldı.

3.3.4. miRNA İzolasyon Protokolü

1) 200µL serum+500µL RiboEx pipetaj yaparak eklendi ve 5dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 1,5ml lik tüp üzerine 100µl kloroform eklendi ve alt üst yapılarak 2 dk oda ısısında bekletildi. 12.000g'de 1 dk santrifüj yapılarak sulu faz başka eperdorfa aktarıldı ve üzerine %50 etanol eklenerek başka bir kolona aktarıldı. 11.000rpm'de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi. Altta kalan toplama kabında kalan hacim kadar %100 ethanol eklendi ve pipetaj yapıldı. Karışım başka bir kolona aktarıldı. 11.000 rpm'de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi. Collection tüp değiştirilerek 500µL Buffer eklendi, 11.000 rpm'de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Daha sonra membranın tam merkezine gelecek şekilde 50µL RNase-free su eklendi ve 2dk oda sıcaklığında bekletildi. 11,000rpm de 2 dk santrifüj edilerek elde edilen örnek -20°C' ye kaldırıldı.

3.3.5. cDNA İzolasyon Protokolü

miRNA ekspresyon miktarının tayini için, elde edilen total miRNA'lardan çalışılacak her bir miRNA için ayrı ayrı stem loop primeriyle cDNA elde edildi. Bunun için; 10X Reaction Buffer, Stem-loop primer, 20X dNTP mix, miRNA, WizScript™ RTase, RNase Inhibitor, RNase free Water ürünleri toplam 10µl' ye tamamlanarak PCR striplerine koyularak thermal cycler'a yerleştirildi. Thermal

cycler döngü protokolü 25°C’de 10 dk, 37°C’de 120 dk, 85°C’de 5 dk şeklinde programlandı.

3.3.6. Real Time PCR Protokolü

Çalışmaya başlamadan önce plate dizaynı yapıldı ve cDNA hariç PCR miksi hazırlandı(2X Syber Green Master mix, Forward primer, Reverse Primer, ROX, cDNA, Su). cDNA örneği her bir kuyuya eşit miktarda eklendi (örneğin; 16ul mix+4ul cDNA). Plate kapatılarak RT-PCR cihazına yerleştirildi. RT-PCR koşulları; 95°C’de 10 dk, 95°C’de 15 sn, 60°C’de 1 dk 40 döngü olacak şekilde programlandı.

3.3.7. Verilerin Değerlendirilmesi:

Rölatif kantitasyon analizi “2^{-ΔΔCT} Yöntemi” metodu kullanılarak tanımlandı. Bunun için; miRNA ekspresyon kantifikasyonu küçük nüklear ribonükleoprotein olan U6 snRNA referans olarak kullanılıp kontrol grubuna göre normalize edildi.

Her bir örneğe ait, her bir genin Ct değerleri, o örneğin housekeeping Ct (U6 CT) değerinden çıkartılarak delta siklus eşiği (ΔCt) değerleri hesaplandı.

Daha sonra her bir hastanın ΔCt değerleri kontrol grubunun ortalama Ct değerinden çıkartılarak deltadelta siklus eşiği (ΔΔCt) değerleri hesaplandı.

Son olarak; her bir miRNA’nın ne kadar eksprese olduğunu hesaplamak için, son değerın başlangıca olan oranı alınarak (fold change) 2^{-ΔΔCt} değeri belirlendi. 2^{-ΔΔCt} değeri 2’nin üzerindeyse artış, 1’in altındaysa ekspresyonda azalma olmuştur şeklinde yorumlandı.

3.4. İstatiksel Analiz

Normal dağılıma sahip değişkenlerin 2 bağımsız grup karşılaştırılmasında Student t Testi, normal dağılıma sahip olmayan değişkenler için Mann Whitney U Testi kullanılmıştır. Kategorik verilerin karşılaştırılması ki-kare testi ile yapılmıştır (cinsiyet). Değişkenler arasındaki ilişki Spearman korelasyon analizi ile değerlendirildi. DEA gelişimi üzerinde miRNA’ların bağımsız etkisi lojistik regresyon analizi ile değerlendirilmiştir.

İstatistiksel analizler için SPSS for Windows version 22.0 paket programı kullanılmış ve $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

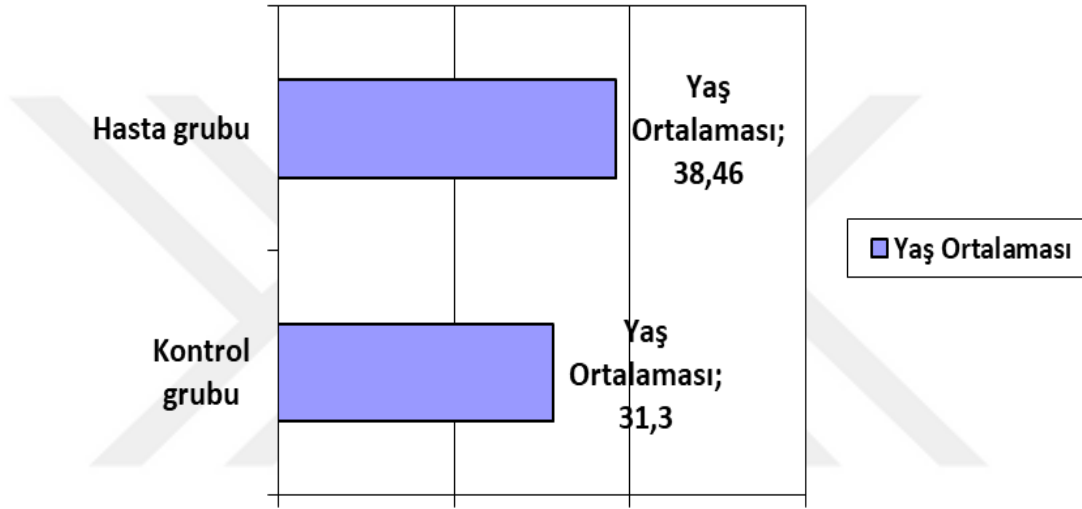
Bu tez çalışması Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğünün TTU-2019-7455 nolu proje desteği ile gerçekleştirilmiştir.



4. BULGULAR

Çalışmamıza kontrol grubuna 10 kişi, hasta grubuna ise 35 kişi olmak üzere toplamda 45 kişi dahil edildi. Hasta ve kontrol grubunun tamamı kadın cinsiyetlendi.

Yaş ortalamalarının gruplara göre dağılımı incelendiğinde kontrol grubunun ortalama yaşı $31.30 \pm 6,25$ idi, hasta grubunun ise ortalama yaşı 38.46 ± 11.29 idi. Kontrol ve hasta grupları yaşları homojen dağılım göstermekteydi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,063$).



Şekil 1. Yaş ortalamalarının gruplara göre dağılımı

Hasta grubundaki katılımcıların %42.9'unda ($n=15$) ek hastalık yoktu, % 57.1'inde ($n=20$) ek hastalık mevcuttu (Bu hastaların 1' inde hipertansiyon, 1' inde koroner arter hastalığı, 2'sinde astım (bu hastaların biri aynı zamanda tiroid hastası), 3'ünde diyabet, 11'inde tiroid hastalıkları, 3'ünde diğer ek hastalıklardan mevcuttu). Hasta grubu ve kontrol grubu arasında ek hastalıklar açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($p=0,01$)(Tablo 3).

Tablo 3. Grupların ek hastalık açısından karşılaştırılması

	Ek hastalık yok	Ek hastalık var	Toplam	p değeri
Hasta	15 (%42,9)	20 (%57,1)	35	0,01
Kontrol	10 (%100)	0 (%0)	10	
Toplam	25	20	45	

4.1. Grupların Hemogram ve Ferritin Açısından Değerlendirilmesi

Katılımcılar hemogram verileri ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde kontrol grubu ile hasta grup arasında LYN, PLT ve MPV açısından anlamlı bir fark saptanmadı. Kontrol grubunda ise WBC, NEU, Hb, HCT, MCV ve Ferritin değerleri hasta grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek iken RDW değeri anlamlı olarak daha düşük saptandı ($p<0.05$) (Tablo 4).

Tablo 4. Grupların hemogram ve ferritin değerleri

	Kontrol	Hasta	p değeri
YAŞ	31,3±6,25	38.46±11.29	0.063
WBC	8,25±2.45	6.43±1.44	0.048
NEU	5,14±1.75	3.81 ±1.08	0.005
LYN	2.23±0.84	1.94 ±0.50	0.191
HB*	14,0±0,77	10,78±0,93	p< 0.001
HCT*	40,39±2,33	33.27±2.27	p< 0.001
MCV	84,98±3,40	73.22±7.33	p< 0.001
RDW	13.62±0.79	16.60±1.75	p< 0.001
PLT	270,30±65,12	309,4±76,27	0,148
MPV	8,78±0,87	8.39±0.93	0,25
FERRİTİN*	24,15±13,51	6.28±5,76	p< 0.001

Veriler ortalama±SS ve ortanca±ÇAA*olarak verildi.

Lökosit, WBC; Nötrofil, NEU; Lenfosit, LYN; Hemogloblin, HB; Hematokrit, HCT; Ortalama Eritrosit Hacmi, MCV; Eritrositlerin Büyüklüğüne Göre Dağılım Genişliği, RDW; Trombosit, PLT; Ortalama Trombosit Hacmi, MPV

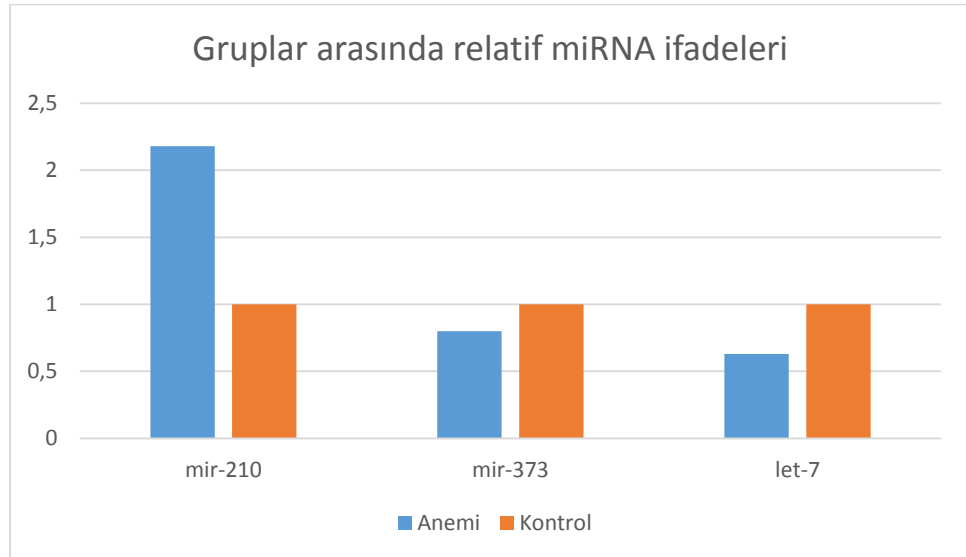
4.2. MicroRNA Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi

Plazma miRNA-210 ekspresyonu hasta grubunda sağlıklı gruba göre upregüle saptandı. MiRNA-210 ekspresyonu açısından gruplar arasında istatistiksel olarak fark saptandı ($p= 0.022$).

Plazma miRNA-373 ve let-7 ekspresyonu ise hasta grubunda sağlıklı gruba göre downregüle saptandı. MiRNA-373 ve let-7 ekspresyonu açısından yapılan istatistiksel değerlendirmede gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla; $p= 0.65$, $p=0.20$)(Tablo 5) (Şekil 2).

Tablo 5. Grupların plazma miRNA Δ Ct düzeyleri

		N	Ortalama \pm SD	<i>p</i> değeri
MiRNA-210 Δ Ct	Hasta	35	-7.27 \pm 2.23	0.022
	Kontrol	10	-6.15 \pm 0,88	
MiRNA-373 Δ Ct	Hasta	35	-7.36 \pm 2,58	0.65
	Kontrol	10	-6,96 \pm 1,93	
		N	Ortanca \pm ÇAA	<i>p</i> değeri
Let-7 Δ Ct	Hasta	35	2.14 \pm 2,15	0.20
	Kontrol	10	3,57 \pm 2,21	



Şekil 2. Gruplar arasında mikroRNA kat değişim $2^{-\Delta$ Ct düzeyleri

4.3. Değişkenler Arasındaki Korelasyon

Çalışmamızdaki katılımcıların hb düzeyi ile MiRNA-210 ekspresyonu arasında negatif korelasyon saptandı ($p=0,013$) (Tablo 6) .

Tablo 6. Değişkenler Arasındaki Korelasyon

		hb	MiRNA-210
Spearman's rho	hb	Correlation Coefficient	1,000
		p değeri	.
		N	45
	MiRNA-210	Correlation Coefficient	-,367*
		p değeri	,013
		N	45

Çalışmamızdaki katılımcıların MiRNA-210 ekspresyonu ile MiRNA-373 ekspresyonu arasında ve MiRNA-210 ekspresyonu ile let-7 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon ilişkisi saptanmıştır (P değerleri sırasıyla $p=0,02$; $p=0,01$) (Tablo 7).

Tablo 7. MiRNA'lar Arasındaki Korelasyon

		MiRNA-210	MiRNA-373	let-7
MiRNA-210	P	-	0,002	0,001
	Yön	1000	447	488
MiRNA-373	P	0,002	-	0,186
	Yön	447	1000	201
let-7	P	0,001	0,186	-
	Yön	488	201	1000

4.4. DEA Gelişiminde MiRNA'ların Etkisi

MiRNA ekspresyon düzeyleri ile ilgili ileri test için regresyon analizi yapıldı. Hasta grubundakiler kontrol grubuna göre değerlendirildiğinde her bir birim let-7 artışı ile kişilerin hasta olma riskleri 1,15 kat artmaktadır.

Her bir birim miRNA-373 artışıyla kişilerin hasta olma riskleri 1,01 kat artmaktadır. Her bir birim miRNA-210 azalmasıyla kişilerin hasta olma riskleri 1,25

kat artmaktadır. Bu değerler istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 8).

Tablo 8. DEA gelişimi üzerinde miRNA'ların etkisi

	Exp(B)	95% C.I.for EXP(B)		<i>p</i>
		lower	upper	
MiRNA-210 dct	1,25	0,79	1,97	0,33
MiRNA-373 dct	1,01	0,72	1,42	0,91
Let-7dct	1,15	0,64	2,07	0,62

5. TARTIŞMA

Anemi; hb miktarının bireyin yaş ve cinsiyeti için normal olarak kabul edilen değerlerin altında olmasıdır (1). DEA ise, anemi ile toplam vücut demirinde azalma olarak tanımlanır. Dünyada en sık görülen anemidir. Bu durum erişkinlerde iş kapasitesinde azalma, konsantrasyon güçlüğü, sınav başarısında azalma, hayat kalitesinde düşme gibi durumlar için bir risk faktörüdür (2).

Yapılan birçok çalışmada DEA'nin birçok kronik hastalıkla (KBH, KKY, IBH gibi) ve kanser ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (4-6). DEA olan hastada oksidatif stres artmaktadır. Demir eksikliği sonucu vücutta pro-oksidan ve antioksidan sistem arasında denge bozulup, antioksidan sistemlerin seviyesi düşebilir. Bunun sonucunda da aşırı ROS üretilir. ROS üretimindeki bu artış oksidatif strese yol açabilir, böylece lipitler, membranlar, proteinler ve DNA gibi hücrel bileşenlere zarar verebilir ve mitokondriyal solunum zincirini değiştirebilir. Gelişen mitokondriyal ve genomik instabilitenin tümör anjiogenez ve metastazına yol açabildiği, apoptozisi inhibe edebileceği ve tedavi direncine sebep olabileceğini gösteren işaretler bulunmaktadır. Ayrıca, DEA'nin, doğal öldürücü hücreler ve lenfositlerin aktivitesini bozduğu, peroksidazın çalışmasını engellediği için immün sistemin doğru şekilde çalışmasını engellediği ve bu durumun, enfeksiyonlarla birlikte malignite oluşumuna da davetiye çıkardığı düşünülmektedir (66, 67).

Yapılan bir çalışmada, izole edilmiş insan nötrofillerinde demir şelatörleri ile hücrelerin ROS üreten enzimler, ksantin oksidaz ve glikoz oksidaz inkübe edilerek indüklenen apoptoz oluşumunun azaldığı bildirilmiştir. Benzer şekilde vasküler düz kas hücrelerinde de mevcut demirin bağlanması ve tüketilmesinin, apoptoza giren bu hücrelerin sayısını azalttığı bildirilmiştir. Bu bulgular, demirin hücre ölüm süreci için gerekli bir element olduğunu göstermektedir (44).

Yalçın ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada da DEA olan hastalar sağlam gruba kıyaslandığında tiol/disülfid dengesinin oksidan tarafa doğru bozulduğu, ve oksidatif hasar gelişiminin olabileceği gösterilmiştir (68).

MiRNA'lar anlamlı kod içermeyen yaklaşık 22 nükleotidden oluşan DNA'nın korunmuş bölgelerinden kodlanan küçük RNA parçalarıdır. Bu parçacıkların, protein kodlamadığı ancak protein transkripsiyon ve translasyonunda çok önemli işlevler gördüğü bilinmektedir. Gen ekspresyonunu düzenleyerek, hedef genlere bağlanıp veya mRNA yıkımını indükleyip protein üretimini engellediği bilinmektedir. Bütün hücrelerde yer alır. Hücrelerin büyümesinde, farklılaşmasında ve apoptoz gibi önemli biyolojik süreçlerde rol oynar. Vücuttaki tüm sistemlerin çalışmaları üzerine etkileri olduğu saptanmıştır (51-53).

Weber ve ark. plazma, idrar, beyin omurilik sıvısı, seminal sıvı, tükürük ve göz yaşı dahil toplamda 12 farklı vücut sıvısını analiz edip, potansiyel hastalık mikrobelerine olabilecek 600 miRNA türü belirlediler (69). MiRNA'ların vücut sıvıdaki konsantrasyonları önemli olup, farklı sıvılarda düzeyleri değişkenlik göstermekteydi. Bir kısım miRNA tüm sıvılarda yaygın bir şekilde tespit edilmişken, sıvıya spesifik miRNA'lar da gözlenmiştir. Bu sıvılardaki değiştirilmiş miRNA ekspresyonlarının birtakım hastalık durumlarının nedeni veya sonucu olabileceği gösterilmiş, dolaşımdaki bazı miRNA'ların biyobelirteçler olarak kullanılması önerilmeye başlanmıştır (70).

MiRNA'lar, hücrel demir alımı, depolanması ve kullanımıyla ilişkili genleri post transkripsiyonel olarak düzenleyen demir homeostazında da rol oynar. Yeterli demir bulunmadığında hb üretimi düşer, kanın O₂ taşıma kapasitesi azalır ve doku O₂ iletimi sınırlanır. O₂ ve demir arasındaki ilişkide, demir homeostazının devamı için sınırlı demir mevcudiyetinin varlığında demir depoları kullanılmaktadır. O₂ seviyeleri düşük olduğunda, dokularda O₂ kullanılabilirliğini geri kazanmak, hb ve eritrosit üretimini arttırmak için demir depoları mobilize edilir (55, 56).

MiRNA'ların biyogenez ve ekspresyonu büyük ölçüde hipoksi tarafından düzenlenir. Hipoksi sonrası, miRNA-210 ve miRNA-373'ün aktive olarak DNA tamirinde sorumlu gen ekspresyonlarını azalttığı, in vitro çalışmada gösterilmiştir (55). DEA'nde, hipoksi önemli bir yer tutmaktadır; buradan yola çıkarak, DEA'nde hipoksiye sekonder DNA tamirinden sorumlu genlerin ekspresyonlarının azalabileceği speküle edilmektedir. Oksidatif stres sonrası, in vitro çalışmalarda önemli bir tümör supresör olan let-7'nin azalabileceği speküle edilmektedir (60).

Crosby ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada hipoksik stresin insan hücrelerinde bir dizi miRNA ekspresyonunu indüklediğini gösterilmiştir. Bunlardan biri olan miRNA-210'un, DNA onarım geni RAD52'nin mRNA'sını, miRNA-373'ün hem RAD52'yi hem de RAD23B'yi hedeflediği tahmin edildi. Yapılan analizlerde miRNA-210 veya miRNA-373'ün aşırı ekspresyonunun RAD52 seviyelerini düşürdüğü ve miRNA-373'ün RAD23B ekspresyon seviyelerini de baskıladığını gözlenmiştir (55, 60). RAD52, iyonlaştırıcı radyasyon kaynaklı DNA çift zincirli kopmalarının onarımında rol oynayan bir grup genin tanımlayıcı üyesidir. Bu RAD52 aktivitelerinin düzenlenmesi ve bunun yanı sıra subnükleer lokalizasyonu, çok sayıda endojen ve eksojen DNA lezyonunun düzenli ve doğru onarımını sağlamak için önemlidir (71). RAD23 ise nükleotit-eksizyon onarım proteinidir. DNA onarımının ve stres faktörlerinin stabilizasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (72).

MiRNA-210 ekspresyonunun hipoksik ortamda, hem normal hem de kanserli hücrelerde arttığı gösterilmiştir (73, 74). MiRNA-210'un, proliferasyon ve apoptosiz üzerine etkileri de bilinmektedir (75). MiRNA-210'un seviyesinin yüksek olmasının, Glioblastoma multifome hücre dizileri üzerinde proliferatif ve anti apoptotik etkileri olduğu gösterilmiştir (76). İlginç olarak, miRNA-210 hipoksik olmayan ortamda pro-apoptotik iken, hipoksik ortamda anti-apoptotik özellikler sergilemektedir (77). Ayrıca eritroid prekürsörler erişkin eritrositlere dönüşüncüye kadarki dönemde miRNA-210'un ekspresyonu artmış durumdadır (78). Beta talasemi ve HgE hastalarının dahil edildiği bir çalışmada miRNA-210 düzeyi hem serum hem de eritrositlerde artmış olduğu saptanmıştır ve miRNA-210 düzeyinin, hb düzeyi ile negatif korelasyon gösterdiği saptanmıştır (79).

Bizim çalışmamızda da plazma miRNA-210 ekspresyonu hasta grubunda sağlıklı gruba göre upregüle saptandı. MiRNA-210 ekspresyonu açısından gruplar arasında istatistiksel olarak fark saptandı ($p= 0.022$). Anemik durumda miRNA-210'un seviyesinin yüksek bulunması, literatürle uyumlu bir bulgudur. DEA'lı hastanın herhangi bir sebeple, uzun süreli olarak tedaviye ulaşamaması veya yetersiz tedavi alması sonrası, hipoksik ortamda, kronik miRNA-210 yüksekliğine yol açacaktır. Bu durumda, hipotetik olarak, miRNA-210 yüksekliğinin DEA'lı hastada anti apoptotik etkilere yol açması ve normal şartlar altında apoptosiz ile elimine

olabilecek tümör hücrelerinin çoğalmasına yol açması teorik olarak mümkündür. Kronik DEA'lı hastalarda uzun süreli izlem çalışmaları yapılarak, kanser insidansı artış olup olmadığını araştırılması değerli olacaktır.

MiRNA-373 ise paradoksal etkileri bulunan bir miRNA'dır. Bazı hastalıklarda, hücre proliferasyonu, hücre göçü ve tümör invazyonu üzerine etkileri bulunurken, diğer bazı kanserlerde bunun tersi etki gözlenmektedir (80). Hipoksi durumunda, hipoksi ile indüklenebilen faktör 1 aracılığı ile seviyesi yükselmektedir (55). Seminom hücre kültürü çalışmasında, normal testis dokusuna göre 1530 kat daha fazla artış gösterdiği saptanmıştır (81). Meme kanserinde yapılan vivo ve in vitro çalışmalarda hem metastazı arttırdığı hem de azalttığına ilişkin bilgiler bulunmaktadır. Bir hücre kültürü çalışmasında, miRNA-373'ün ekspresyonundaki artış, kanser hücre migrasyon ve invazyonunu anlamlı şekilde arttırmıştır (82). Endojen miRNA-373 sekrete edebilen bir hücre kültüründe yapılan çalışmada, miRNA-373 düzeyinde azalma ile kanser hücrelerin migrasyon ve invazyon kabiliyetleri belirgin azalmıştır (83). Agresif bir meme kanseri kültürü ile yapılan çalışmada ise miRNA-373'ün düzeyindeki artış migrasyon ve invazyonu belirgin azaltmıştır (84). MiRNA-373 düzeyi lenf nodu metastazı olan meme kanserli hastalarda, olmayanlara göre yüksek bulunmuştur (85). Ayrıca sağlıklı insanlara kıyasla, meme kanserli hastalarda da artmış miRNA-373 düzeyi vardır. HER2 negatif meme kanserli hastalarda ekspresyonu, HER2 pozitiflere kıyasla anlamlı artmış olduğu saptanmıştır (82).

Cairo ve ark. tarafından hepatoblastomlarda miRNA-373'ün düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. MiRNA-373 sadece agresif hepatoblastomlarda değil, aynı zamanda invaziv hepatosellüler kanserlerde de ayırt edici bir belirteç olarak kullanılabilir. MiRNA-373'ün yüksekliği, karaciğer kanserlerinde kötü prognoz için belirteçidir (86).

Hepatosellüler kanserlerde miRNA-373'ün potansiyel rollerini inceleyen iki araştırmada tümör dokularındaki miRNA-373'ün belirgin şekilde arttığı gözlenmiştir. Wu ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, miR-373'ün onkogen işlevi gördüğünü kanıtlanmıştır (87, 88).

Bununla birlikte, prostat kanserinde hem tümör dokularında, hem de kanser hücre dizilerinde azalmış miRNA-373 ekspresyon seviyeleri gözlenmiştir ve ekzojen olarak miRNA-373'ün, tümörün büyümesini durdurmadığı, tam tersine CD44 translasyonunu engelleyerek migrasyon ve invazyonu hızlandırdığı görülmüştür (89). Bizim çalışmamızda da plazma miRNA-373 ekspresyonu ise hasta grubunda, sağlıklı gruba göre azalmış olduğu saptandı. MiRNA-373'ün azalması da, diğer miRNA'lardaki pro-onkojen değişiklikler göz önüne alınarak, prostat kanserinde olduğu gibi, kanser oluşumunu engellemeye yönelik bir savunma mekanizması olabilir. MiRNA-373 ekspresyonu açısından yapılan istatistiksel değerlendirmede gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ($p= 0.10$).

Let-7, memelilerde, tümör supressor aktivite gösteren bir miRNA'dır (90). Let-7'nin hücre siklus regülatörleri olan siklin D1, siklin D3, siklin A ve CDK4'ü inhibe ettiği ve tümör büyümesini durdurduğu gösterilmiştir (91). Hücre kültürü çalışmalarında Burkitt lenfoma hücrelerinde inhibitör etki göstermiştir (92). Memelilerde, embriogeneze ve beyin oluşumu esnasında yüksek olduğu gösterilmiştir (93). Ayrıca, yapılan çalışmalarda let-7'nin hematopoetik kök hücre regülasyonu yaptığı gösterilmiştir (94). Özellikle let-7'nin supresyonu ile eritroid hücrelerin büyümesi baskılanmıştır (95). Ancak let-7'nin memelilerdeki aktiviteleri halen tam olarak bilinmemektedir. Bizim çalışmamızda da, DEA'lı hastalarda let-7'de düşüş gözlenmiştir, ancak istatistiksel açıdan anlamlı değildir; bu durum çalışma grubumuzun küçük olmasından kaynaklanıyor olabilir. Let-7 düşüşü, sıklıkla kanserlerde gözlenen bir durumdur ve çoğunlukla kötü prognoz ile ilişkilidir (96). DEA'de de aynı düşüklüğün saptanması ilgi çekicidir. Bu durum, DEA ile kanser gelişimi arasında bir ilişki olabileceğini göstermektedir. DEA tanısı olan insanlarda tedavi öncesi ve sonrası let-7 düzeyinin değişip değişmediğine yönelik çalışmalar yapılması ve kronik DEA olup tedaviye ulaşamayan veya çeşitli nedenlerle yeterli tedavi alamayan hastalarda kanser insidansının toplum ile karşılaştırmalı çalışmalarının yapılması önemlidir. Ayrıca miRNA-210 yüksekliği ile eritropoez indüklenirken, let-7 supresyonu ile eritropoez baskılanmaktadır; yani, DEA'da bu iki miRNA eritropoez konusunda antagonistik, karsinogenez konusunda ise sinerjistik etki göstermektedirler.

Çalışmamızın kısıtlı yanları; katılımcıların sadece kadın cinsiyetten oluşması, katılımcı sayısının az olup, çalışmamızın kesitsel olmasıdır. Katılımcıların kadınlardan oluşmasının sebebi DEA prevalansının kadınlarda daha yüksek görülmesi ile ilgili durumdan kaynaklanmaktadır. Daha güvenilir sonuçlar için prospektif ve büyük çaplı araştırmalara ihtiyaç vardır.



ÖZET

Demir Eksikliği Anemisi Olan Hastalarda Karsinogenez ile İlişkili Mikrorna Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Amaç: Amacımız, DEA'lı hastalarda maligniteler ile direkt olarak ilişkileri gösterilen miRNAlardan miRNA-210, miRNA-373 ve let-7'nin düzeylerinde değişiklik olup olmadığını incelemektir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 18-65 yaş arası demir eksikliği anemisi olan 35 hasta ve 10 sağlıklı kontrol dahil edildi. Hemogram ve ferritin ölçümleri yapıldı, miRNA ekspresyon düzeyleri real-time PCR yöntemi ile saptandı.

Bulgular: Kontrol grubunun ortalama yaşı $31.30 \pm 6,25$ idi, hasta grubunun ise ortalama yaşı 38.46 ± 11.29 idi, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,063$). Plazma miRNA-210 ekspresyonu hasta grubunda sağlıklı gruba göre upregüle olup, istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p= 0.022$). Plazma miRNA-373 ve let-7 ekspresyonu ise hasta grubunda sağlıklı gruba göre downregüle olup istatistiksel değerlendirmede anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla; $p= 0.65$, $p=0.20$).

Sonuçlar: Plazma miRNA-210 ekspresyonu DEA grubunda sağlıklı gruba göre upregüle saptanırken, miRNA-373 ve let-7 ekspresyonu ise down regüle saptanmıştır. Sonuçlar literatürle uyumludur. Kronik DEA'lı hastalarda uzun süreli izlem çalışmaları yapılarak, kanser insidansı artış olup olmadığını araştırılması değerli olacaktır.

Anahtar kelimeler: Demir Eksikliği Anemisi, MikroRNA

ABSTRACT

Evaluation of MicroRNA Levels Associated with Carcinogenesis in Patients with Iron Deficiency Anemia

Aim: Our aim is to examine whether there are changes in the levels of miRNA-210, miRNA-373 and let-7, among the miRNAs that have direct relationships with malignancies in patients with Iron Deficiency Anemia (IDA).

Material and Method: The study included 35 patients with iron deficiency anemia and 10 healthy controls.

Results: The mean age of the control group was 31.30 ± 6.25 , the mean age of the patient group was 38.46 ± 11.29 , and there was no statistically significant difference between the groups ($p=0,063$). Plasma miRNA-210 expression was upregulated in the patient group compared to the healthy group, and a statistically significant difference was detected ($p=0.022$). Plasma miRNA-373 and let-7 expression were downregulated in the patient group compared to the healthy group, and there was no significant difference in statistical evaluation ($p=0.65$, $p=0.20$, respectively).

Conclusions: Plasma miRNA-210 expression was upregulated in the IDA group compared to the healthy group, while miRNA-373 and let-7 expression were downregulated. It will be valuable to investigate whether there is an increase in cancer incidence by conducting long-term follow-up studies in patients with chronic IDA.

Keywords: Iron Deficiency Anemia, MicroRNA

KAYNAKLAR

1. Akman N. Erişkinde Anemilere Genel Yaklaşım. İÜ Cerrahpafla Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. 2001(Anemiler Sempozyumu).
2. Joosten E. Iron deficiency anemia in older adults: A review. *Geriatrics & gerontology international*. 2018;18(3):373-9.
3. Yetişkinde Demir Eksikliği. Türk Hematoloji Derneği Ulusal Tedavi Kılavuzu. 2011.
4. Enjuanes C, Klip IT, Bruguera J, Cladellas M, Ponikowski P, Banasiak W, et al. Iron deficiency and health-related quality of life in chronic heart failure: results from a multicenter European study. *International journal of cardiology*. 2014;174(2):268-75.
5. Fishbane S, Pollack S, Feldman HI, Joffe MM. Iron indices in chronic kidney disease in the National Health and Nutritional Examination Survey 1988–2004. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2009;4(1):57-61.
6. Bager P, Befrits R, Wikman O, Lindgren S, Moum B, Hjortswang H, et al. The prevalence of anemia and iron deficiency in IBD outpatients in Scandinavia. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2011;46(3):304-9.
7. Guyton A, Hall J. Alyuvarlar, anemi ve polistemi. *Textbook of Medical Physiology çev ed Çavusoğlu H B*. 1996;9.
8. Uzel C, Conrad ME, editors. Absorption of heme iron. *Seminars in hematology*; 1998.
9. Finch C, Huebers H. Iron metabolism. *Clinical physiology and biochemistry*. 1986;4(1):5-10.
10. Gutteridge JM. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico Biological Interactions*. 1994;91(2):133-40.
11. GÜRSEL O, İbrahim E, KÜREKÇİ AE. Demir Metabolizması ve Bozuklukları. *Türkiye Çocuk Hastalıkları Dergisi*. 2014;9(1):71-7.
12. UYSAL Z. Demir Metabolizması ve Demir Eksikliği Anemisi.
13. Michael Auerbach M, FACP. Causes and diagnosis of iron deficiency and iron deficiency anemia in adults. *uptodate*. 2019.
14. Kassebaum NJ, Jasrasaria R, Naghavi M, Wulf SK, Johns N, Lozano R, et al. A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. *Blood*. 2014;123(5):615-24.
15. Çalım A, Kanat E, Mazı EE, Oygen Ş, Karabay U, Borlu F. Orijinal Araştırma. 2018.
16. Sharp PA. Intestinal iron absorption: regulation by dietary & systemic factors. *Int J Vitam Nutr Res*. 2010;80(4-5):231-42.
17. Lopez MA, Martos FC. Iron availability: An updated review. *International journal of food sciences and nutrition*. 2004;55(8):597-606.

18. Thankachan P, Walczyk T, Muthayya S, Kurpad AV, Hurrell RF. Iron absorption in young Indian women: the interaction of iron status with the influence of tea and ascorbic acid. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;87(4):881-6.
19. Kutlu R, Büyükyörük C, Oltulu P. Anemi etiolojisi ile 56 yaşında tespit edilen Çölyak hastalığı. *Genel Tıp Derg* 2014; 24: 64. 2014;7.
20. Yılmaz Keskin E, Yenicesu I. Iron-refractory iron deficiency anemia. *Turkish journal of haematology : official journal of Turkish Society of Haematology*. 2015;32(1):1-14.
21. Camaschella C. New insights into iron deficiency and iron deficiency anemia. *Blood reviews*. 2017;31(4):225-33.
22. pişkin ö. demir eksikliği ve anemisi. *hematolog*. 2017.
23. DeLoughery TG. Iron Deficiency Anemia. *The Medical clinics of North America*. 2017;101(2):319-32.
24. Lopez A, Cacoub P, Macdougall IC, Peyrin-Biroulet L. Iron deficiency anaemia. *Lancet (London, England)*. 2016;387(10021):907-16.
25. Dinlen N, Çayır A, Fettah A, Şaylı TR. Demir eksikliği anemisi tedavisinde iki ve üç değerlikli demirin etkinliği ve multivitamin desteğinin tedaviler üzerine etkisi. 2012.
26. Safaralizadeh R, Kardar G, Pourpak Z, Moin M, Zare A, Teimourian S. Serum concentration of selenium in healthy individuals living in Tehran. *Nutrition Journal*. 2005;4(1):32.
27. Liu L, Huang M. Essential role of the iron-sulfur cluster binding domain of the primase regulatory subunit Pri2 in DNA replication initiation. *Protein & cell*. 2015;6(3):194-210.
28. Dostal A, Lacroix C, Pham VT, Zimmermann MB, Del'homme C, Bernalier-Donadille A, et al. Iron supplementation promotes gut microbiota metabolic activity but not colitis markers in human gut microbiota-associated rats. *British journal of nutrition*. 2014;111(12):2135-45.
29. Bohnsack BL, Hirschi KK. Nutrient regulation of cell cycle progression. *Annu Rev Nutr*. 2004;24:433-53.
30. Hung N, Shen C-C, Hu Y-W, Hu L-Y, Yeh C-M, Teng C-J, et al. Risk of cancer in patients with iron deficiency anemia: a nationwide population-based study. *PloS one*. 2015;10(3).
31. Ahluwalia N, Sun J, Krause D, Mastro A, Handte G. Immune function is impaired in iron-deficient, homebound, older women. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;79(3):516-21.
32. Kumar V, Choudhry V. Iron deficiency and infection. *The Indian Journal of Pediatrics*. 2010;77(7):789-93.
33. Fraga A, Ribeiro R, Príncipe P, Lopes C, Medeiros R. Hypoxia and prostate cancer aggressiveness: a tale with many endings. *Clinical genitourinary cancer*. 2015;13(4):295-301.

34. Huang X. Does iron have a role in breast cancer? *The lancet oncology*. 2008;9(8):803-7.
35. Xue X, Taylor M, Anderson E, Hao C, Qu A, Greenson JK, et al. Hypoxia-inducible factor-2 α activation promotes colorectal cancer progression by dysregulating iron homeostasis. *Cancer research*. 2012;72(9):2285-93.
36. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516.
37. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig P, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death & Differentiation*. 2006;13(9):1423-33.
38. Travaglini-Allocatelli C. Protein machineries involved in the attachment of heme to cytochrome c: protein structures and molecular mechanisms. *Scientifica*. 2013;2013.
39. Kim HJ, Khalimonchuk O, Smith PM, Winge DR. Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2012;1823(9):1604-16.
40. Longpre J, Loo G. Inhibition of deoxycholate-induced apoptosis in iron-depleted HCT-116 cells. *Apoptosis*. 2012;17(1):70-8.
41. deUngria M, Rao R, Wobken JD, Luciana M, Nelson CA, Georgieff MK. Perinatal Iron Deficiency Decreases Cytochrome c Oxidase (CytOx) Activity in Selected Regions of Neonatal Rat Brain. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 2001;56(4):191-3.
42. Payne CM, Holubec H, Bernstein C, Bernstein H, Dvorak K, Green SB, et al. Crypt-restricted loss and decreased protein expression of cytochrome C oxidase subunit I as potential hypothesis-driven biomarkers of colon cancer risk. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2005;14(9):2066-75.
43. Zhang X, Zhang W, Ma S-F, Miasniakova G, Sergueeva A, Ammosova T, et al. Iron deficiency modifies gene expression variation induced by augmented hypoxia sensing. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2014;52(1):35-45.
44. Dhur A, Galan P, Herberg S. Effects of different degrees of iron deficiency on cytochrome P450 complex and pentose phosphate pathway dehydrogenases in the rat. *The Journal of nutrition*. 1989;119(1):40-7.
45. Rao NJ, Jagadeesan V. Effect of long term iron deficiency on the activities of hepatic and extra-hepatic drug metabolising enzymes in Fischer rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 1995;110(1):167-73.
46. Yang C, Li C, Li M, Tong X, Hu X, Yang X, et al. CYP2S1 depletion enhances colorectal cell proliferation is associated with PGE2-mediated activation of β -catenin signaling. *Experimental cell research*. 2015;331(2):377-86.
47. Iwakawa H-o, Tomari Y. The functions of microRNAs: mRNA decay and translational repression. *Trends in cell biology*. 2015;25(11):651-65.

48. Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV. MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi*. 2011;38(1).
49. Gong Q, Su G. Roles of miRNAs and long noncoding RNAs in the progression of diabetic retinopathy. *Bioscience reports*. 2017;37(6).
50. Karagün BŞ, Antmen B, Şaşmaz İ, Kılınç Y. *Mikro RNA ve Kanser*. 2014.
51. Borel MJ, Smith SH, Brigham DE, Beard JL. The impact of varying degrees of iron nutriture on several functional consequences of iron deficiency in rats. *The Journal of nutrition*. 1991;121(5):729-36.
52. Wang GL, Semenza GL. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. 1993.
53. Bao B, S Azmi A, Li Y, Ahmad A, Ali S, Banerjee S, et al. Targeting CSCs in tumor microenvironment: the potential role of ROS-associated miRNAs in tumor aggressiveness. *Current stem cell research & therapy*. 2014;9(1):22-35.
54. Devlin C, Greco S, Martelli F, Ivan M. miR- 210: More than a silent player in hypoxia. *IUBMB life*. 2011;63(2):94-100.
55. Crosby ME, Kulshreshtha R, Ivan M, Glazer PM. MicroRNA regulation of DNA repair gene expression in hypoxic stress. *Cancer research*. 2009;69(3):1221-9.
56. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2006;29(5):903-6.
57. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer research*. 2004;64(11):3753-6.
58. Yang Q, Jie Z, Cao H, Greenlee AR, Yang C, Zou F, et al. Low-level expression of let-7a in gastric cancer and its involvement in tumorigenesis by targeting RAB40C. *Carcinogenesis*. 2011;32(5):713-22.
59. Chang C-J, Hsu C-C, Chang C-H, Tsai L-L, Chang Y-C, Lu S-W, et al. Let-7d functions as novel regulator of epithelial-mesenchymal transition and chemoresistant property in oral cancer. *Oncology reports*. 2011;26(4):1003-10.
60. Wang Z, Liu Y, Han N, Chen X, Yu W, Zhang W, et al. Profiles of oxidative stress-related microRNA and mRNA expression in auditory cells. *Brain research*. 2010;1346:14-25.
61. Mansoori B, Mohammadi A, Shirjang S, Baradaran B. Micro-RNAs: The new potential biomarkers in cancer diagnosis, prognosis and cancer therapy. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*. 2015;61(5):1-10.
62. Çelik DA, Koşar PA, Özçelik N. MikroRNA'lar ve kanser ile ilişkisi. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*. 2013;20:121-7.
63. Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, et al. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(24):9136-41.

64. Peng J, Mo R, Ma J, Fan J. let-7b and let-7c are determinants of intrinsic chemoresistance in renal cell carcinoma. *World journal of surgical oncology*. 2015;13(1):175.
65. Jung EJ, Santarpia L, Kim J, Esteva FJ, Moretti E, Buzdar AU, et al. Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients. *Cancer*. 2012;118(10):2603-14.
66. Zohora F, Bidad K, Pourpak Z, Moin M. Biological and immunological aspects of iron deficiency anemia in cancer development: a narrative review. *Nutrition and cancer*. 2018;70(4):546-56.
67. Harrison IP, Selemidis S. Understanding the biology of reactive oxygen species and their link to cancer: NADPH oxidases as novel pharmacological targets. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2014;41(8):533-42.
68. YALÇIN S, Çifci A, DURMAZ ŞA, Kübra Ö, Doğan M, Kültür T, et al. Reprodüktif dönemdeki kadınlarda demir eksikliği anemisinin oksidatif strese etkisi. *Anadolu Güncel Tıp Dergisi*. 2020;2(2):38-41.
69. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, How Huang K, Jen Lee M, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical chemistry*. 2010;56(11):1733-41.
70. Andreeva K, Cooper NG. MicroRNAs in the neural retina. *International journal of genomics*. 2014;2014.
71. Mortensen UH, Lisby M, Rothstein R. Rad52. *Current Biology*. 2009;19(16):R676-R7.
72. Ortolan TG, Tongaonkar P, Lambertson D, Chen L, Schaubert C, Madura K. The DNA repair protein rad23 is a negative regulator of multi-ubiquitin chain assembly. *Nature cell biology*. 2000;2(9):601-8.
73. Huang X, Ding L, Bennewith KL, Tong RT, Welford SM, Ang KK, et al. Hypoxia-inducible mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation. *Molecular cell*. 2009;35(6):856-67.
74. Qin Q, Furong W, Baosheng L. Multiple functions of hypoxia-regulated miR-210 in cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2014;33(1):50.
75. Bavelloni A, Ramazzotti G, Poli A, Piazzini M, Focaccia E, Blalock W, et al. MiRNA-210: a current overview. *Anticancer research*. 2017;37(12):6511-21.
76. Zhang S, Lai N, Liao K, Sun J, Lin Y. MicroRNA-210 regulates cell proliferation and apoptosis by targeting regulator of differentiation 1 in glioblastoma cells. *Folia Neuropathol*. 2015;53(3):236-44.
77. Favaro E, Ramachandran A, McCormick R, Gee H, Blancher C, Crosby M, et al. MicroRNA-210 regulates mitochondrial free radical response to hypoxia and krebs cycle in cancer cells by targeting iron sulfur cluster protein ISCU. *PloS one*. 2010;5(4):e10345.

78. Kosaka N, Sugiura K, Yamamoto Y, Yoshioka Y, Miyazaki H, Komatsu N, et al. Identification of erythropoietin- induced microRNAs in haematopoietic cells during erythroid differentiation. *British journal of haematology*. 2008;142(2):293-300.
79. Siwaponanan P, Fucharoen S, Sirankapracha P, Winichagoon P, Umemura T, Svasti S. Elevated levels of miR-210 correlate with anemia in β -thalassemia/HbE patients. *International journal of hematology*. 2016;104(3):338-43.
80. Wei F, Cao C, Xu X, Wang J. Diverse functions of miR-373 in cancer. *Journal of Translational Medicine*. 2015;13(1):1-8.
81. Bing Z, Master S, Tobias J, Baldwin D, Xu X, Tomaszewski J. MicroRNA expression profiles of seminoma from paraffin-embedded formalin-fixed tissue. *Virchows Archiv*. 2012;461(6):663-8.
82. Eichelser C, Flesch-Janys D, Chang-Claude J, Pantel K, Schwarzenbach H. Deregulated serum concentrations of circulating cell-free microRNAs miR-17, miR-34a, miR-155, and miR-373 in human breast cancer development and progression. *Clinical chemistry*. 2013;59(10):1489-96.
83. Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, Le Sage C, Nagel R, Nair S, et al. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nature cell biology*. 2008;10(2):202-10.
84. Keklikoglou I, Koerner C, Schmidt C, Zhang J, Heckmann D, Shavinskaya A, et al. MicroRNA-520/373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor negative breast cancer by targeting NF- κ B and TGF- β signaling pathways. *Oncogene*. 2012;31(37):4150-63.
85. Chen W, Cai F, Zhang B, Barekati Z, Zhong XY. The level of circulating miRNA-10b and miRNA-373 in detecting lymph node metastasis of breast cancer: potential biomarkers. *Tumor Biology*. 2013;34(1):455-62.
86. Cairo S, Wang Y, de Reyniès A, Duroure K, Dahan J, Redon M-J, et al. Stem cell-like micro-RNA signature driven by Myc in aggressive liver cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(47):20471-6.
87. Wu N, Liu X, Xu X, Fan X, Liu M, Li X, et al. MicroRNA- 373, a new regulator of protein phosphatase 6, functions as an oncogene in hepatocellular carcinoma. *The FEBS journal*. 2011;278(12):2044-54.
88. Arzumanyan A, Friedman T, Kotei E, Ng IO, Lian Z, Feitelson MA. Epigenetic repression of E-cadherin expression by hepatitis B virus x antigen in liver cancer. *Oncogene*. 2012;31(5):563-72.
89. Yang K, Handorean AM, Iczkowski KA. MicroRNAs 373 and 520c are downregulated in prostate cancer, suppress CD44 translation and enhance invasion of prostate cancer cells in vitro. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2009;2(4):361.
90. Lee H, Han S, Kwon CS, Lee D. Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. *Protein & cell*. 2016;7(2):100-13.

91. Schultz J, Lorenz P, Gross G, Ibrahim S, Kunz M. MicroRNA let-7b targets important cell cycle molecules in malignant melanoma cells and interferes with anchorage-independent growth. *Cell research*. 2008;18(5):549-57.
92. Sampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, Soteropoulos P, et al. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer research*. 2007;67(20):9762-70.
93. Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome biology*. 2004;5(3):R13.
94. Emmrich S, Rasche M, Schöning J, Reimer C, Keihani S, Maroz A, et al. miR-99a/100~125b tricistrons regulate hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis by shifting the balance between TGF β and Wnt signaling. *Genes & development*. 2014;28(8):858-74.
95. Copley MR, Babovic S, Benz C, Knapp DJ, Beer PA, Kent DG, et al. The Lin28b-let-7-Hmga2 axis determines the higher self-renewal potential of fetal haematopoietic stem cells. *Nature cell biology*. 2013;15(8):916-25.
96. Balzeau J, Menezes MR, Cao S, Hagan JP. The LIN28/let-7 pathway in cancer. *Frontiers in genetics*. 2017;8:31.