

CIVA MARUZİYETİYLE İLİŞKİLİ GENLERİN VE miRNA'LARIN BİYOENFORMATİK VERİ TABANLARI ARACILIĞIYLA ARAŞTIRILMASI

İD Gözde Öztan¹, İD Halim İşsever²

¹Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Istanbul, Türkiye

²Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Public Health, Istanbul, Türkiye

ÖZET

Amaç: Cıva maruziyetiyle ilişkili genlerle bağlantılı olan miRNA'lar, maruziyete bağlı hastalıkların belirlenmesi ve takibinde biyobelirteçler olarak rol oynayabilir. Çalışmanın amacı, cıvayla ilişkili 38 gen üzerinden tespit edilen 11 miRNA'nın Hg toksisitesine yanıtaki fonksiyonlarının biyoenformatik analizlerle araştırılmasıdır.

Materyal ve Metot: Çalışmada ilk aşamada karşılaştırmalı toksikogenomik veri tabanı (CTD)'den Hg maruziyeti ile ilişkili genler belirlendi. İkinci aşamada ise, yolak ve süreç zenginleştirmeleri için Metascape veri tabanı kullanıldı. Ardından, hedef genler ve miRNA'lar arasındaki etkileşimleri belirlemek için MIENTURNET kullanıldı.

Bulgular: CTD veri tabanından Hg toksisitesi ile ilişkili 38 genin olduğu bulundu. MIENTURNET miRNA-hedef zenginleştirme analizi neticesinde 38 genle bağlantısı olan 11 miRNA tespit edildi. miRTarBase veri tabanı üzerinden hsa-miR-24-3p ekspresyon değişikliğinin GCLM, HMOX1, IFNG, IL4, IL1B, TNF ve MT1M, hsa-miR-125b-5p'nin VDR, ABCC1, TARDBP, GSS, TNF, hsa-miR-6792-3p ve

hsa-miR-4691-5p'nin HMOX1, MT1A, SLC22A6 ve VDR, hsa-miR-296-3p'nin IRF1, SLC7A5, MT2A, SLC22A6, hsa-miR-223-3p'nin IL6, ABCB1, SLC7A5, hsa-miR-1238-3p'nin SLC22A6, TARDBP ve MT1A, hsa-miR-451a'nın ABCB1 ve IL6, hsa-miR-433-5p'nin GCLC ve GCLM, hsa-miR-132-5p'nin NFE2L2 ve SLC7A5 genleri aracılığıyla, TargetScan veri tabanından ise hsa-miR-873-5p.1'in HMOX1, ABCC1, ALAD genleri üzerinden Hg maruziyetiyle ilişkili olabileceği belirlenmiştir.

Sonuç: Elde edilen sonuçlar, klinikle bütünleştirilerek hastalara en iyi tedavi seçeneklerinin sunulması ve hastalık patogenezinin aydınlatılmasına yönelik kesin tanının konulmasında yol gösterici olacaktır. Dolayısıyla, Hg maruziyetine bağlı gen-miRNA ilişkisine ait bu verilerin klinik açıdan değerlendirilmesi sonucunda hastalığa yönelik tedaviyi belirleyici potansiyel biyobelirteçlerin kullanımı mümkün hale gelebilecektir. Tespit ettiğimiz bu olası aday biyobelirteçler aracılığıyla Hg maruziyetine bağlı ortaya çıkabilecek mesleki hastalıkların erken aşamada önüne geçilerek bu sayede literatüre önemli katkılar sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Biyobelirteçler, CTD, Hg, Metascape, MIENTURNET, miRNA'lar.

C	İLETİŞİM İÇİN: Gözde Öztan Department of Medical Biology, Istanbul Faculty of Medicine, Istanbul University gozdeoztan@istanbul.edu.tr		
ORCID	GÖ https://orcid.org/0000-0002-2970-1834	ORCID	Hİ https://orcid.org/0000-0002-5435-706X
✓	GÖNDERİLDİĞİ TARİH: 06 / 09 / 2024 • KABUL TARİHİ: 20 / 03 / 2025		

INVESTIGATION OF GENES AND miRNAS THAT MAY BE ASSOCIATED WITH MERCURY EXPOSURE USING IN SILICO TOOLS

ABSTRACT

Objective: Mercury-related gene miRNAs may be biomarkers for exposure-related illnesses. The aim of the study was to investigate the functions of 11 miRNAs identified from 38 mercury-related genes in the response to Hg toxicity through bioinformatic analysis.

Material and Method: In CTD, a comparative toxicogenomic database, Hg -exposed genes were discovered in the first stage. The Metascape database enriched pathways and processes in the second stage. MIENTURNET was then used to identify interactions between target genes and miRNAs.

Results: There were 38 Hg-toxic gene interactions in the CTD database. A MIENTURNET miRNA-target enrichment study found 11 miRNAs associated with 38 genes. Through the miRTarBase database, the expression change of hsa-miR-24-3p is associated with GCLM, HMOX1,

IFNG, IL4, IL1B, TNF, and MT1M; hsa-miR-125b-5p with VDR, ABCC1, TARDBP, GSS, TNF; hsa-miR-6792-3p and hsa-miR-4691-5p with HMOX1, MT1A, SLC22A6, and VDR; hsa-miR-296-3p with IRF1, SLC7A5, MT2A, SLC22A6; hsa-miR-223-3p with IL6, ABCB1, SLC7A5; hsa-miR-1238-3p with SLC22A6, TARDBP, and MT1A; hsa-miR-451a with ABCB1 and IL6; hsa-miR-433-5p with GCLC and GCLM; hsa-miR-132-5p with NFE2L2 and SLC7A5 genes. Additionally, the TargetScan database indicates a potential relationship between hsa-miR-873-5p.1 and Hg exposure through the HMOX1, ABCC1, and ALAD genes.

Conclusion: The clinic will use the data to recommend therapy and produce a definitive diagnosis that explains the disease's pathophysiology. The clinical study of these data on the gene-miRNA interaction linked to Hg exposure might make it possible to use possible biomarkers to check how well a disease treatment is working. Our possible candidate biomarkers will assist in avoiding early occupational disorders caused by Hg exposure and contribute to the literature.

Keywords: Biomarkers, CTD, Hg, Metascape, MIENTURNET, miRNAs.

GİRİŞ

Cıva (Hg), değişen miktarlarda ve kimyasal formlarda maruz kalınan, her yerde bulunan bir çevre kirleticisidir. Mesleki olarak maruz kalmayan insan popülasyonları için endişe kaynağı olan Hg'nin üç ana formu arasında metilcıva (MeHg), cıva buharı (Hg₀) ve etilcıva (EtHg) bulunur. Hg'nin sağlık üzerindeki başlıca olumsuz etkileri arasında nörotoksisite, teratojenite, nefrotoksisite ve immünotoksisite yer almaktadır. Bu toksik etkilerin büyüklüğü, yaşam evresine, doza ve maruz kalma süresine bağlı olarak önemli ölçüde değişebilmektedir ve semptomlar yoğunlaşarak geri döndürülemez hale gelebilir ve sonunda ölüme yol açabilir. Hg bileşiklerinin olumsuz sağlık etkileri iyi bilinmesine rağmen, toksisite gelişiminin altında yatan moleküler temel hala tam olarak anlaşılamamıştır.¹ Hg maruziyetinin toksik etkileri, sülfidril gruplarıyla etkileşim sonucu protein fonksiyonunun bozulması, hücre membranında değişiklikler, enzim inhibisyonu, proteinlerin immünolojik özellik kazanmasıyla B lenfosit çoğalması ve lipofilik alkil Hg komplekslerinin lipitçe zengin dokulardaki proteinlerle etkileşimi gibi farklı mekanizmalarla ortaya çıkabilmektedir.²

Hg, maruz kalan işçilerde nörolojik, nöropsikolojik, kardiyovasküler ve diğer olumsuz etkilere neden olarak önemli bir mesleki risk oluşturur. Mesleki Hg'ye maruz kalmayla ilişkili hastalıklar, küçük ölçekli madencilik faaliyetlerinin bir sonucu olarak küresel şekilde artmaktadır.³

İşyeri hekimleri, işyerinde koruyucu tedbirler almak ve hasar ortaya çıkmadan önce harekete geçmek için, sağlık gözetim programları sırasında sık sık Hg zehirlenmesi görülen işçilerde bireysel duyarlılık koşullarını belirlemek amacıyla genetik testlerin yapılmasına önem vermelidirler.⁴ Cıvalı termometre fabrikasında çalışan kadın işçilerden alınan kan örneklerinde miR-451a ekspresyon düzeyinin yukarı regüle olduğu tespit edilmiştir.⁵ Perera ve Herbstman'ın yaptıkları çalışmalar, MeHg'ye maruz kalmanın embriyogenez sırasında epigenetik modifikasyonları değiştirebileceğini göstermektedir. Çeşitli biyolojik süreçleri içeren, MeHg toksisitesiyle ilişkili çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır. Bu süreçler arasında: artan lipit peroksidasyonu, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve in vivo ile in vitro glutatyonun (GSH) tükenmesi, hücre zarı bütünlüğünün azalması, hücre sinyalinin değişmesi, mitokondriyal etkiler, değişen DNA onarımı, immünomodülatör etkiler, etkilenen Ca²⁺ regülasyonu ve diğer epigenetik işaretlerin yanı sıra değişen DNA metilasyonu (DNAm) yer almaktadır.⁶ Epigenetik değişikliklerin bir sonucu olarak, oksidatif strese, stres tepkisine, gen düzenlenmesine, metabolizmaya, inflamatuvar tepkiye, apoptoz ve hormon düzenlenmesine yanıtta rol oynayan çeşitli genler, MeHg'ye maruz kalan insan hücrelerinde farklı ekspresyonla ilişkilendirilmiştir.⁶

Mikro RNA'lar (miRNA'lar), bitkilerde ve hayvanlarda benzer şekilde önemli biyolojik roller oynayan kısa düzenleyici RNA'lardır. Memeli hücrelerinde miRNA'ların eksprese olduğu görülmektedir. Beyindeki miRNA'ların nöro gelişim, plastisite ve apoptoz gibi birçok temel

fonksiyonda rol oynar.⁷ Doğum öncesi, doğum sonrası ve yetişkin merkezi sinir sistemi (MSS) iyileştirmesinde yer alan süreçler olan hücre bakımı, miRNA'ların yer aldığı işlevlerden biridir. MiRNA'lar, MSS gelişiminde ve nörodejeneratif süreçlerde önemli katkılara sahiptir.⁸

Epigenetik düzenleyiciler olan miRNA'lar, Hg'ye maruz kalmayla ilişkilendirilmiş olsa da, altta yatan moleküler mekanizma iyi aydınlatılamamıştır.⁹ Ding ve ark.'ları hsa-miR-92a ve hsa-miR-486'nın mesleki Hg zehirlenmesinin yeni tanısıl biyobelirteçleri olduğunu doğrulamayı amaçlamışlar ve Hg toksisitesinde miR-92a ve miR-486'nın altında yatan mekanizmayı araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlar, mesleki Hg'ye maruz kalan işçilerde miR-92a ve miR-486 ekspresyon seviyelerinin yukarı doğru düzenlendiğini göstermektedir. miR-92a ve miR-486'nın düzenlenmesi, sırasıyla Krüppel benzeri faktör 4 (KLF4) ve Cezanne (OTUD7B)'yi hedef alarak NF-κB sinyal yolağını ortaklaşa aktive ederek Hg toksisitesinde önemli bir rol oynayabilmektedir.¹⁰

Meslek hastalıkları, çalışanların verimliliğini ve yaşam kalitesini düşürebilmekte ve hastalık nedeni ile işe devamsızlıkları artırabilmektedir. Uluslararası Çalışma Örgütü (ILO), meslek hastalıkları listesini derleyerek bunları bir etkenin neden olduğu hastalıklar (kimyasal, fiziksel, biyolojik) ve hedef organa göre hastalıklar (solunum, deri, kas-iskelet sistemi, zihinsel ve davranışsal, mesleki kanser ve diğer hastalıklar) olarak sınıflandırmakla sorumludur.¹¹ Meslek hastalığının teşhis edilmesi, çalışanların çalışmaya devam edip etmeme kararları, tazminat programları ve diğer yardımlar kapsamında etkili olması nedeniyle oldukça önemlidir.¹²

Ağır bir metal olan Hg'ye mesleki olarak maruz kalmak, özellikle MSS ve böbreklerin fonksiyonlarını etkileyerek çeşitli sağlık problemlerine neden olabilmektedir. MSS üzerinde Hg'ye maruz kalmak; sinirlilik, yorgunluk ve depresyon gibi subjektif semptomlara ve artan titreme, uykusuzluk ve hafıza bozuklukları gibi MSS işlev bozukluklarına yol açabilmektedir. Amalgam, barometre, pil imalatçıları, kimya laboratuvarı çalışanları, klor-alkali petrokimya işçileri, diş hekimleri, floresan lamba imali, altın ve gümüş çıkarıcıları, böcek ilacı üretiminde çalışanlar, Hg madencileri, termometre yapımcıları gibi çeşitli meslek gruplarında Hg ve bileşiklerine mesleki maruziyet görülebilmektedir.¹³

Madencilik nedeniyle çevresel ve mesleki Hg maruziyetinin ortaya çıkması kardiyovasküler, sinir ve bağışıklık sistemlerinde ciddi sağlık risklerine neden olabilir.¹⁴ Yapılan bir çalışmada, mesleki olarak Hg'ye maruz kalan kronik Hg zehirlenmesi grubu, Hg'nin kan dolaşımına katıldığı grup ve Hg termometre tesisinde kontrol grubu olarak ayrılan işçileri içeren bir vaka kontrol çalışmasının plazma örneklerinde miRNA'ların ekspresyonu değerlendirilmiştir. Hg zehirlenmesi grubunda diğer iki gruba kıyasla, dört miRNA'nın (miR-16-5p, miR-30c-3p, miR-181a-5p ve let-7e-5p) aşağı

regüle edildiği ve diğer dört miRNA'nın (miR-92a-3p, miR-122-5p, miR-451a ve miR-486-5p) ise yukarı regüle edildiği tespit edilmiştir.¹⁵ Araştırmacıların hastalık mekanizmalarını daha iyi anlamalarına yardımcı olmak amacıyla çok büyük miktarda biyolojik veriyi analiz etmek ve işlemek için bilgisayar teknolojisini kullanan biyoenformatik; genomik, proteomik, gen regülasyonu, biyolojik ağlar ve diğer alanları içermektedir.¹⁶

Log10(p) ağ zenginleşirmesine göre; "Sayı", kullanıcı tarafından sağlanan listelerde, belirli bir ontoloji terimine üye olan genlerin sayısını göstermektedir. "%", belirli bir ontoloji teriminde bulunan, kullanıcı tarafından sağlanan genlerin tümünün yüzdesidir (hesaplamaya yalnızca en az bir ontoloji terimi açıklamasına sahip veri giriş genleri dahil edilir). "Log10(p)", log 10 tabanındaki p değeridir. "Log10(q)", log tabanı 10'da çoklu testle düzeltilmiş p değeridir.¹⁷ Zenginleştirilmiş terim ağları, Cytoscape'te. cys dosyaları aracılığıyla veya web simgesine tıklayarak bir tarayıcı içinde etkileşimli olarak görüntülenebilmektedir.¹⁸

Karşılaştırmalı toksikogenomik veri tabanı (CTD), çevresel maruziyetlerin insan sağlığını nasıl etkilediğine dair anlayışı ilerletmeyi amaçlayan halka açık bir veri tabanıdır. Kimyasal gen/protein etkileşimleri, kimyasal-hastalık ve gen-hastalık ilişkileri hakkında manuel olarak derlenmiş bilgiler sağlamaktadır. Bu veriler, çevresel olarak etkilenen hastalıkların altında yatan mekanizmaları hakkında hipotezlerin geliştirilmesine yardımcı olmak için işlevsel ve yolak verileriyle entegre edilmiştir.¹⁹

Bu çalışmada, biyoenformatik veri tabanları kullanılarak Hg maruziyetiyle ilişkili genler üzerinden tespit edilen miRNA'ların moleküler düzeyde etkilerinin, Hg'nin neden olduğu hastalıklara yakınlık açısından araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada tespit ettiğimiz miRNA'ların, Hg'nin hücresel düzeyde toksik etkilerinin aydınlatılmasında olası biyobelirteçler olarak kullanılması hedeflenmiştir. Böylece, Hg'ye maruz kalan bireylerde Hg toleransı ile ilişkili anahtar miRNA'ları ve bunların hedef genlerini belirlemek, altta yatan düzenleyici mekanizmaların gösterimi için moleküler bir temel sağlayacaktır. Gelecekte Hg maruziyetiyle yakından bağlantılı genetik ve epigenetik değişiklikler, cıvaya maruz kalma düzeyi ve hücresel yanıtın biyolojik mekanizmalarına ışık tutabilecektir.

MATERYAL VE METOT

Karşılaştırmalı Toksikogenomik Veri Tabanı Üzerinden Hg Maruziyeti ile İlişkili Genlerin Belirlenmesi

Çalışmamız, ücretsiz web tabanlı biyoenformatik araçlar kullanılarak verilerin toplanması ve veri analizlerinin gerçekleştirilerek yorumlanması kısımlarını içermektedir. Çalışmada Hg araştırması için ilk olarak, Karşılaştırmalı Toksikogenomik Veritabanı (CTD) (<https://ctdbase.org/>) (Ocak-2024) kullanılmış ve Hg ile ilişkili genler tespit edilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Temsili zenginleştirilmiş terimleriyle ilk 16 kümenin ontoloji kaynaklarına göre tanımlanması						
GO	Kategori	Tanım	Sayı	%	Log10 (p)	Log10 (q)
WP2882	WikiPathways	Nükleer reseptörler meta yolağı	14	36,84	-18,02	-13,85
GO:0009636	GO Biyolojik Süreçler	Toksik maddeye tepki	13	34,21	-17,90	-13,85
R-HSA-156590	Reactome Gen Setleri	Glutasyon konjugasyonu	7	18,42	-13,66	-10,09
R-HSA-189445	Reactome Gen Setleri	Porfirinlerin metabolizması	6	15,79	-12,13	-8,86
WP3624	WikiPathways	Akciğer fibrozisi	7	18,42	-11,79	-8,60
GO:0042908	GO Biyolojik Süreçler	Ksenobiyotik taşınması	6	15,79	-10,52	-7,49
hsa01523	KEGG Yolağı	Antifolat direnci	5	13,16	-9,48	-6,64
WP2873	WikiPathways	Aril hidrokarbon reseptör yolağı	5	13,16	-8,56	-5,95
R-HSA-877300	Reactome Gen Setleri	İnterferon gama sinyali	5	13,16	-6,88	-4,65
GO:0071496	GO Biyolojik Süreçler	Dış uyaranlara hücrel tepki	7	18,42	-6,83	-4,62
GO:1904035	GO Biyolojik Süreçler	Epitel hücre apoptotik sürecinin düzenlenmesi	5	13,16	-6,47	-4,32
GO:0009895	GO Biyolojik Süreçler	Katabolik sürecin negatif düzenlenmesi	6	15,79	-5,35	-3,40
GO:0002714	GO Biyolojik Süreçler	B hücre aracı bağışıklığın pozitif düzenlenmesi	3	7,89	-4,69	-2,85
GO:0032660	GO Biyolojik Süreçler	İnterlökin-17 üretiminin düzenlenmesi	3	7,89	-4,52	-2,70
GO:0061024	GO Biyolojik Süreçler	Membran organizasyonu	6	15,79	-3,48	-1,80
GO:0015698	GO Biyolojik Süreçler	İnorganik anyon taşınması	3	7,89	-2,98	-1,37

Tespit Edilen Genlerin Yolak ve Süreç Zenginleştirme Analizleriyle Değerlendirilmesi

Hg maruziyeti ile ilişkili genler belirlendikten sonra ikinci aşamada ise, yolak ve süreç zenginleştirmeleri araştırılmıştır. CORUM, KEGG Yolağı, DisGeNET, WikiPathways, GO Biyolojik Süreçler, Kanonik Yolaklar, TRRUST, PaGenBase, Reactome Gen Setleri, PANTHER Yolağı, Transkripsiyon Faktörü Hedefleri ve COVID ontoloji kaynaklarından alınan verileri içeren yolak ve süreç zenginleştirme analizini gerçekleştirmek için Metascape (<https://metascape.org/>) (Ocak-2024) veritabanı seçilmiştir. Gen listesi yüklenerek ifade analizi yapılmıştır. Analizde zenginleştirme arka planı olarak genomdaki tüm genler kullanılmıştır.

MIENTURNET miRNA-hedef gen zenginleştirme analizi

Mevcut çalışmada, hedef genler ve miRNA'lar arasındaki ilişkileri değerlendirmek için MIENTURNET (<http://userver.bio.uniroma1.it/apps/mienturnet/>)'in (Ocak-2024) ağ analizi kullanılmıştır. miRNA-hedef zenginleştirme yapılarak miRTarBase analiz sonuçları değerlendirilmiştir. MIENTURNET çevrimiçi aracı, Hg maruziyetiyle ilişkili genlere dayalı olarak hangi miRNA'ların Hg tarafından indüklendiğini belirlemek için kullanılmıştır. MiRNA hedef etkileşim ağı oluşturularak ve fonksiyonel zenginleştirme analizi yapılarak bu miRNA'ların biyolojik açıdan fonksiyonları araştırılmıştır.

Verilerin İstatistiksel Yöntemler Kullanarak Değerlendirilmesi

Metascape üzerinden, p değeri $<0,01$, minimum sayısı 3 ve zenginleştirme faktörü $>1,5$ olan terimler toplanarak üyelik benzerliklerine göre kümeler halinde gruplandırılmıştır. p -değerleri, kümülatif hipergeometrik dağılıma dayalı olarak hesaplanmıştır. q -değerleri, çoklu testleri hesaba katmak için Benjamini-Hochberg prosedürü kullanılarak hesaplanmıştır. Zenginleştirilmiş terimler üzerinde hiyerarşik kümeleme yapılırken benzerlik ölçüsü olarak Kappa puanları kullanılarak benzerliği $>0,3$ olan alt ağaçlar bir küme olarak kabul edilmiştir.²⁰

DisGeNET zenginleştirme analizinde terimler arasındaki ilişkileri daha iyi yakalamak için, zenginleştirilmiş terimlerin bir alt kümesi seçilerek benzerliği $>0,3$ olan terimlerin kenarlarla bağlandığı bir ağ grafiği oluşturulmuştur. MIENTURNET miRNA-hedef zenginleştirme analizindeki yanlış keşif oranı (FDR), hipergeometrik testten elde edilen nominal p değeri kullanılarak hesaplanmıştır. FDR değeri, belirli genlerin bir yolak içinde ne kadar güçlü bir şekilde aşırı temsil edildiğini göstermek için kullanılmıştır.

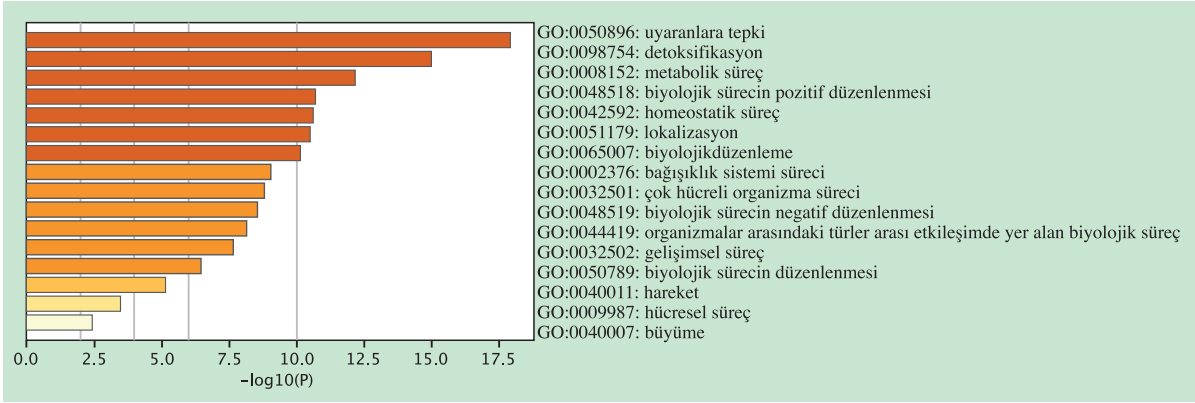
Etik Kurul İzni

Çalışma verileri kamuya açık veritabanları üzerinden toplandığı için herhangi bir etik onay gerekmemektedir.

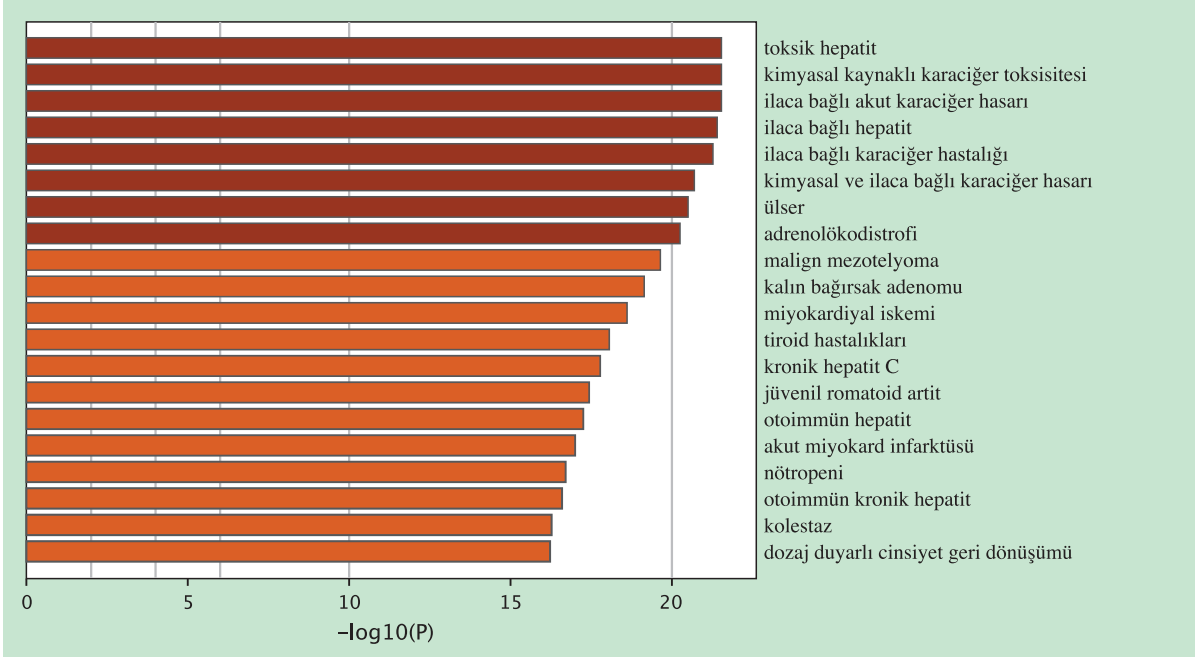
BULGULAR

Belirlediğimiz gen listesi için, Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi (KEGG) Yolağı (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), Reactome Gen Setleri (<https://reactome.org/>), Memeli protein komplekslerinin kapsamlı kaynağı (CORUM) (<https://mips.helmholtz-muenchen.de/corum/>), WikiPathways (<https://www.wikipathways.org/>) ve PANTHER Yolağını (<https://www.pantherdb.org/pathway/>) içeren çeşitli ontoloji kaynakları kullanılarak biyolojik süreçler, hastalıklar, yolaklar ve ağ zenginleştirme yapıldı. Zenginleştirilmiş biyolojik süreçler (Şekil 1) belirlendi. Ardından, yolak ve süreç zenginleştirme analizine göre ilk 16 kümenin sağlanan gen listesi için, Tablo 1'de gösterildiği gibi çeşitli ontoloji kaynakları kullanılarak Log10(p)'a göre ağ zenginleştirme gerçekleştirildi.

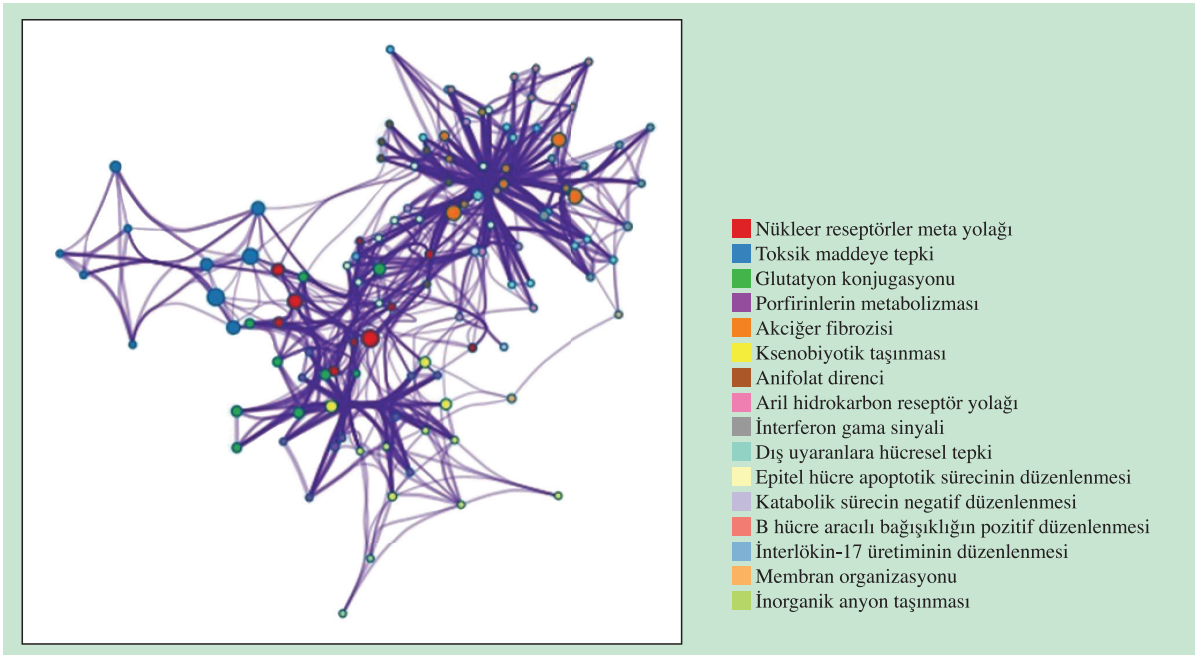
DisGeNET'te zenginleştirme analizi verilerine göre araştırılan Hg ağır metalinin neden olduğu ilişkili hastalıklar Şekil 2'de gösterildi. Küme başına en fazla 15 terim ve toplamda en fazla 250 terim kısıtlamasıyla, 20 kümenin her birinden en iyi p -değerlerine sahip terimler seçildi. Ağ, her düğümün zenginleştirilmiş bir terimi temsil ettiği ve küme kimliğiyle renklendirildiği Cytoscape kullanılarak görselleştirildi (Şekil 3). Zenginleştirilmiş terimler ağındaki aynı küme kimliğini paylaşan düğümler genellikle birbirine yakın olan küme kimliğine göre renklendirilmektedir. Cytoscape üzerinden ağ zenginleştirme sonuçlarına göre; Hg maruziyetiyle ilişkili olabilecek 16 küme belirlendi (Şekil 3).



Şekil 1. Cıvayla ilişkili biyolojik süreçler.



Şekil 2. Gen listelerindeki zenginleştirilmiş terimlerin, p-değerleriyle renklendirilmiş çubuk grafiği.



Şekil 3. Ağ zenginleştirmesiyle ilk 16 kümenin gösterimi (Cytoscape).

Tablo 2. Cıvayla ilişkili genler	
Gen sembolü	Gen ismi
ABCB1	ATP bağlayıcı kaset alt ailesi B üyesi 1
ABCC1	ATP bağlayıcı kaset alt ailesi C üyesi 1 (ABCC1 kan grubu)
ABCC2	ATP bağlayıcı kaset alt ailesi C üyesi 2
AKR7A3	Aldo-keto redüktaz ailesi 7 üye A3
ALAD	Aminolevulinat dehidrataz
CASP1	Kaspaz 1
CPOX	Koproporfirinogen oksidaz
FCGR1	Fc reseptörü, IgG, yüksek afinite I
GCLC	Glutamat-sistein ligaz katalitik alt birimi
GCLM	Glutamat-sistein ligaz değiştirici alt birimi
GSS	Glutasyon sentetaz
GSTA1	Glutasyon S-transferaz alfa 1
GSTM1	Glutasyon S-transferaz mu 1
GSTP1	Glutasyon S-transferaz pi 1
GSTT1	Glutasyon S-transferaz teta 1
HMOX1	Hem oksijenaz 1
IFI44	İnterferon kaynaklı protein 44
IFNG	İnterferon gama
IL1B	İnterlökin 1 beta
IL4	İnterlökin 4
IL6	İnterlökin 6
INS1	İnsülin I
IRF1	İnterferon düzenleyici faktör 1
IRF8	İnterferon düzenleyici faktör 8
MSR1	Makrofaj temizleyici reseptör 1
MT1A	Metalotiyonin 1A
MT1M	Metalotiyonin 1M
MT2A	Metalotiyonin 2A
MT4	Metalotiyonin 4
NFE2L2	NFE2 benzeri bZIP transkripsiyon faktörü 2
NOX4	NADPH oksidaz 4
RSAD2	Radikal S-adenosil metiyonin domaini içeren protein 2
SELENOP	Selenoprotein P
SLC22A6	Çözünen taşıyıcı aile 22 üye 6
SLC22A8	Çözünen taşıyıcı aile 22 üye 8
SLC7A5	Çözünen taşıyıcı aile 7 üye 5
TARDBP	TAR DNA bağlayıcı protein
TNF	Tümör nekroz faktörü
VDR	D vitamini reseptörü

CTD taraması neticesinde Hg ile ilişkili 39 gen tespit edildi (Tablo 2). Hg metalinin toksik etkisiyle bağlantısının tespiti için araştırılan 39 genin INS1 geni haricindeki 38'inin etkileşimde olduğu bulundu. miRNA-hedef zenginleştirme analizi neticesinde 38 genle ilişkili Hg toksisitesi yanıtında rol oynadığı düşünülen miRNA'lar belirlendi.

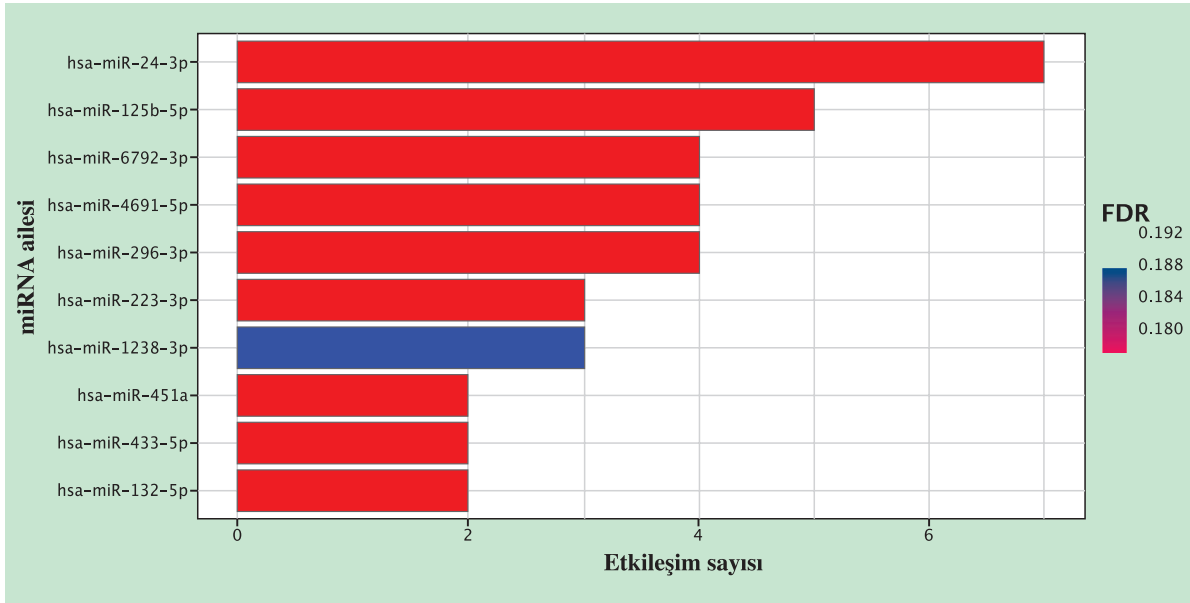
miRNA-mRNA hedef etkileşim ağlarından miRTarBase (Şekil 4) ve TargetScan (Şekil 5) aracılığıyla genlerin etkileşime girdikleri miRNA'lar belirlendi. MIENTURNET (MiRNA Zenginleştirme Dönüşmüş Ağı) miRNA-hedef zenginleştirme analizine göre Hg toksisitesiyle ilişkili bulunan 38 gen arasından FDR'ye göre en iyi yollar seçildi ve daha sonra elde edilen yollar kat zenginleşmesine göre sıralanarak temsil edilen en etkin miRNA'lar tespit edildi (Tablo 3,4).

miRTarBase miRNA hedef zenginleştirme analiziyle hipergeometrik testteki nominal p değerleri üzerinden Hg maruziyetiyle ilişkili 10 miRNA istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0,05$) bulundu. Elde ettiğimiz sonuçlara göre; hsa-miR-1238-3p'nin FDR değeri 0,192 iken (miRTarBase renk skalası mavi) Hg maruziyetiyle ilişkili diğer tüm miRNA'ların FDR değeri 0,180'in altında bulundu ve kırmızı renk skalasıyla gösterildi.

TargetScan miRNA hedef zenginleştirme analiziyle hipergeometrik testteki nominal p değerleri üzerinden Hg maruziyetiyle ilişkili hsa-miR-873-5p.1 miRNA'sı istatistiksel açıdan anlamlı ($p: 0,028$) bulundu. Buna göre; Hg maruziyetiyle ilişkili tüm miRNA'ların FDR değeri 0,863792 olarak tespit edildi ve mor renk skalasıyla gösterildi. hsa-miR-873-5p.1'in HMOX1, ABCC1, ALAD genleriyle yüksek etkileşim içinde olduğu tespit edildi.

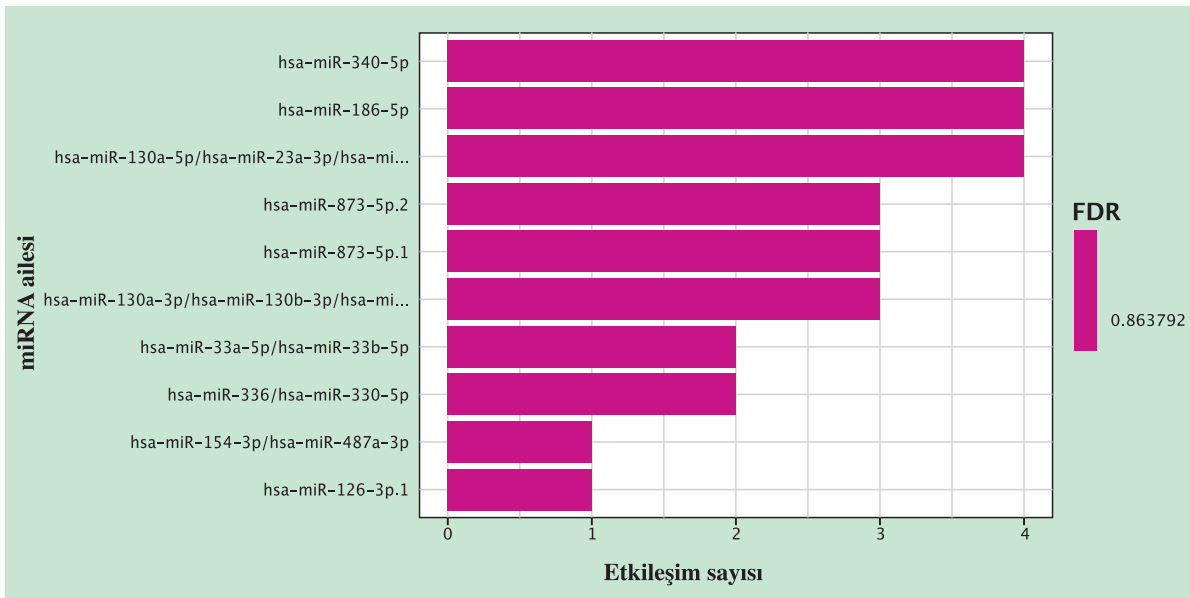
TARTIŞMA

Bu çalışmada, Hg ile ilişkili 38 gen üzerinden miRTarBase aracılığıyla tespit edilen hsa-miR-24-3p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-6792-3p, hsa-miR-4691-5p, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-1238-3p, hsa-miR-451a, hsa-miR-433-5p, hsa-miR-132-5p miRNA'ları ile TargetScan aracılığıyla istatistiksel açıdan anlamlı olarak tespit edilen hsa-miR-873-5p.1 miRNA'sının Hg toksisitesiyle ilişkili potansiyel biyobelirteçler olarak araştırılması hedeflenmiştir. Temsili zenginleştirilmiş terimleriyle ilk 16 kümenin ontoloji kaynaklarına tanımlanan yollardan nükleer reseptörler meta yolağının ilişkili olduğu genler ABCC2, GCLC, GCLM, GSTA1, GSTM1, GSTP1, HMOX1, IFNG, IL1B, NFE2L2, ABCB1, TNF, VDR, SLC7A5, GSS, GSTT1, ALAD, ABCC1, SLC22A8, AKR7A3, NOX4, IL4, IL6, CASP1'dir. WikiPathways üzerinden akciğer fibrozisi ile ilişkili yolda ise HMOX1, IL1B, IL4, IL6, MT2A, NFE2L2, TNF, IFNG, VDR, CASP1, IRF8, IRF1, FCGR1A, ABCC1, SLC7A5, RSAD2, NOX4, GSTP1, ALAD, IFI44, GCLC, TARDBP, SELENOP, ABCB1, MSR1 genleri rol oynamaktadır. KEGG yolağı üzerinden antifolat direnciyle ilişkili ABCC2, IL1B, IL6, ABCC1, TNF, CASP1, NFE2L2 genler fonksiyon göstermektedir. Ayrıca, WikiPathways aracılığıyla aril hidrokarbon reseptör yolağıyla bağlantılı IFNG, IL1B, NFE2L2, TNF, SLC7A5, IL6, ABCB1, HMOX1, IL4 genleri önemli bir role sahiptir.



Şekil 4. miRNA-hedef zenginleştirme analizi sonuçları (miRTarBase)

FDR: yanlış keşif oranı



Şekil 5. miRNA-hedef zenginleştirme analizi sonuçları (TargetScan)

FDR: yanlış keşif oranı

Sonuçlarımız, gen-miRNA ilişkisine bağlı sinyal yolları yoluyla metabolik, homeostatik, gelişimsel ve hücrel süreçlerin düzenlenebileceğini ve tespit ettiğimiz miRNA'ların Hg maruziyetinde potansiyel biyobelirteçler olarak hizmet edebileceğini göstermektedir. Yaptığımız çalışma neticesinde Hg ağır metalinin neden olduğu hastalıklarda özellikle karaciğer hastalıkları ve bazı maligniteler dikkat çekmektedir. DisGeNET'te zenginleştirme analizi verilerimize göre, Hg maruziyetiyle ilişkili hsa-miR-24-3p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-6792-3p, hsa-miR-4691-5p, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-1238-3p, hsa-miR-451a, hsa-miR-433-5p, hsa-miR-132-5p miRNA'ların literatürle paralel olarak Hg maruziyetinden bağımsız akut miyokard infarktüsü, akut karaciğer yetmezliği,

romatoid artrit, malign mezotelyoma, kalın bağırsak adenomu ve ülser ile bağlantılı olduğunu tespit ettik.²¹⁻²⁵ Belirlediğimiz bu hastalıkların Hg maruziyeti ve çalışmaya dahil ettiğimiz miRNA'larla doğrudan bağlantısı olmadığı için elde ettiğimiz tüm bu verilerin literatüre önemli katkı sağlayacağı görüşündeyiz, miRNA'lar, çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerin tanı ve takibinde kullanılabilecek potansiyel biyobelirteçlerdir. Çeşitli çalışmalar, çevresel olarak Hg'ye maruz kalan genel popülasyonda miRNA'ların ekspresyon profilleri üzerinde Hg'nin potansiyel etkilerini incelemiştir. Çalışmamızda Hg maruziyetiyle bağlantılı bir diğer hastalık olan kalın bağırsak adenomunun miR-24-3p ile olan ilişkisi araştırılmıştır. miR-24-3p, hücre döngüsü kontrolü, hücre büyümesi, çoğalması ve apoptoz dahil

Tablo 3. Cıva toksisitesiyle ilişkili miRNA'lar (miRTarBase)						
Mikro RNA (miRNA)	Hedef genler	p değeri	FDR	Odds oranı (OR)	Etkileşim sayısı	
hsa-miR-24-3p	GCLM, HMOX1, IFNG, IL4, IL1B, TNF, MT1M	0,00216	0,177	0,268	7	
hsa-miR-125b-5p	VDR, ABCC1, TARDBP, GSS, TNF	0,00232	0,177	0,189	5	
hsa-miR-6792-3p	HMOX1, MT1A, SLC22A6, VDR	0,00158	0,177	0,127	4	
hsa-miR-4691-5p	HMOX1, MT1A, SLC22A6, VDR	0,00155	0,177	0,127	4	
hsa-miR-296-3p	IRF1, SLC7A5, MT2A, SLC22A6	0,00233	0,177	0,141	4	
hsa-miR-223-3p	IL6, ABCB1, SLC7A5	0,00126	0,177	0,0716	3	
hsa-miR-1238-3p	SLC22A6, TARDBP, MT1A	0,00316	0,192	0,0986	3	
hsa-miR-451a	ABCB1, IL6	0,00208	0,177	0,034	2	
hsa-miR-433-5p	GCLC, GCLM	0,00265	0,179	0,0383	2	
hsa-miR-132-5p	NFE2L2, SLC7A5	0,00105	0,177	0,0241	2	
FDR: Yanlış keşif oranı						

Tablo 4. Cıva toksisitesiyle ilişkili miRNA'lar (TargetScan)						
Mikro RNA (miRNA)	Hedef genler	p değeri	FDR	Odds oranı (OR)	Etkileşim sayısı	
hsa-miR-186-5p	IRF8, GCLM, ABCC2, ABCC1	0,083	0,864	0,421	4	
hsa-miR-130a-3p/hsa-miR-130b-3p/ hsa-miR-301a-3p/hsa-miR-301b-3p/ hsa-miR-3666/hsa-miR-4295/ hsa-miR-454-3p	IRF1, TNF, TARDBP	0,271	0,864	0,605	3	
hsa-miR-873-5p.1	HMOX1, ABCC1, ALAD	0,028	0,864	0,223	3	
hsa-miR-326/hsa-miR-330-5p	ABCC1, ALAD	0,231	0,864	0,455	2	
hsa-miR-873-5p.2	HMOX1, MT1A, ALAD	0,0613	0,864	0,305	3	
hsa-miR-340-5p	IFNG, IL4, IRF1, NFE2L2	0,226	0,864	0,614	4	
hsa-miR-130a-5p/hsa-miR-23a-3p/ hsa-miR-23b-3p/hsa-miR-23c	IRF1, VDR, CPOX, TARDBP	0,207	0,864	0,592	4	
hsa-miR-33a-5p/hsa-miR-33b-5p	MT1A, TARDBP	0,25	0,86	0,481	2	
FDR: Yanlış keşif oranı						

olmak üzere kanserle ilişkili hücrel süreçlerde rol oynamaktadır. Yüksek miR-24-3p ekspresyonunun, kolorektal adenokarsinom hastalarındaki kötü seyirli sağ kalımla ilişkili olduğu gösterilmiştir.²² Fakat; Hg maruziyetiyle ilişkili kalın bağırsak adenomunun miR-24-3p ve diğer miRNA'larla olan bağlantısını ortaya koyacak herhangi bir literatüre rastlanmamıştır.

Yine çalışmamızda, aday miRNA'ların akut karaciğer yetmezliğiyle olan ilişkisi bulunmuştur. Literatürde, Hg'ye bağlı akut karaciğer yetmezliği ve miRNA ile ilişkili bilgiye rastlanmamıştır. Ancak, Yang ve ark.'larının fare modellerinde yapmış olduğu bir çalışmada; akut inorganik cıvaya maruz kalmanın neden olduğu hepatotoksisiteyi azaltmak için luteolin tedavisi uygulamışlardır. Anti inflamatuvar, antikarsinogenik ve antioksidatif etkiye sahip olan luteolinin Hg kaynaklı anemi ve hepatotoksisiteyi

iyileştirdiğini, in vitro radikal oksijen türlerinin üretimini, hepatosit canlılığını, in vivo oksidatif stres ve apoptozu düzenlediğini göstermişlerdir. Luteolinin, NF- κ B, TNF- α , Sirt1, mTOR, Bax, p53 ve Bcl-2'yi içeren inflamasyon ve apoptozla ilişkili proteinlerin seviyelerindeki değişiklikleri tersine çevirdiği ve P38 mitojenle aktifleşen protein kinaz (p38 MAPK) aktivasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Aksine, luteolin ve Hg'nin, karaciğerde nükleer faktör (eritroid türevli 2) benzeri 2'yi (Nrf2) hedef alan miRNA-146a transkripsiyonu üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır.²⁶

Çalışmamızda, hsa-miR-223-3p'nin IL6, ABCB1, SLC7A5 genleriyle yüksek etkileşim içinde olduğu tespit edildi. hsa-miR-223-3p ile ilişkili IL6 ve ABCB1 genlerinin Hg maruziyetinden bağımsız hepatosellüler kanser ve vasküler endotel hasarıyla bağlantılı olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.^{27,28} VDR, ABCC1, TARDBP, GSS, TNF hedef genleriyle ilişkili olan miR-125b-5p'nin, Hg maruziyetiyle bağlantılı olduğunu çalışma verilerimiz göstermektedir. Sanders ve ark.'ları miR-125b-5p'nin ayak tırnağındaki Hg seviyeleriyle önemli ölçüde negatif ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. Üreme sistemi hastalıklarına ilişkin olarak Hg ile ilişkili bir dizi miRNA'nın ve bunların mRNA hedefleri de tanımlanmıştır. Fonksiyonel analiz sonuçları, üreme sistemi gelişimi ve morfolojisinde yer alan mRNA hedeflerinin farklı alt kümelerini göstermiştir. Anormal üreme sistemi morfolojisinin miR-125b-5p tarafından düzenlenen TP53 (tumor protein p53) mRNA hedefine sahip olduğu zenginleştirilmiş gen alt kümesiyle belirlenmiştir. Sonuçlar, Hg maruziyetinin erken doğum riskinin artmasıyla bir ilişkinin var olabileceğini göstermektedir.²⁹

Ding ve ark.'ları mesleki olarak Hg'ye maruz kalan kadın işçilerde Hg ile ilişkili miRNA'ları araştırmışlardır. Hg zehirlenmesi grubunda dört miRNA'nın (miR-16-5p, miR-30c-3p, miR-181a-5p ve let-7e-5p) aşağı regüle olduğu diğer dört miRNA'nın (miR-92a-3p, miR-122-5p, miR-451a ve miR-486-5p) ise yukarı regüle olduğu gösterilmiştir. miR-451a, AMPK/AKT yolağıyla proinflamatuvar sitokini inhibe etme özelliğine sahiptir.³⁰ Bu çalışmayla benzer şekilde bizim çalışmamızda da miR-451a, Hg maruziyetiyle ilişkili olarak anlamlı bulunmuştur. Yüksek verimli miRNA profillemeye, sentetik taklitlerle fonksiyonel analiz ve modüle edilmiş yolakların moleküler karakterizasyonu, miR-296-3p ve miR-298-5p'nin spesifik olarak aşağı düzenlenmesiyle IGF1R β ve TNF α gibi hedeflerinin yukarı düzenlenmesinin, memeli pankreatik α hücrelerinin sitokinler tarafından apoptoz indüksiyonuna karşı direncinin önemli bir belirleyicisi olduğunu göstermektedir.³¹ Çalışmamızda, miR-296-3p Hg maruziyetiyle ilişkili bulunurken, literatürde Hg ve diğer ağır metallerle olan ilişkisini ortaya koyacak çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda, Hg ağır metaliyle ilişkili hastalıklar arasında akut miyokard infarktüsü ve miyokardiyal iskemi de yer almaktadır. Hu ve ark.'larının zebra balığı mRNA ve miRNA ekspresyon modellerinde yapmış oldukları araştırmada, silika nanopartiküllere (SiO₂-NP) ve metil cıva (MeHg)'ya birlikte maruz kalmanın önemli değişikliklere neden olabileceği tespit edilmiştir. MeHg ile birlikte SiO₂-NP'lerin, zebra balığı embriyolarında miR-7147, miR-26a ve miR-375'i içeren miRNA'ları yeniden şekillendirdiği ve inflamatuvar yollar aracılığıyla kardiyovasküler toksisiteye yol açtığı gösterilmiştir.³²

Diğer birçok kimyasal element gibi ağır metaller de çevrede doğal olarak bulunur; ancak bu metallerin çeşitli çevresel matrislerdeki konsantrasyonları, bunların birçok insan faaliyetinde (sanayi, madencilik ve tarım gibi) yoğun kullanımı nedeniyle artmıştır. Hg, demir dışı metal rafinasyonu ve evsel atık yakma fırınları da dahil olmak üzere çeşitli insan faaliyetlerinde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Hg, endüstriyel atıklara ve atık suya boşaltıldığı için çeşitli çevresel matrislerdeki konsantrasyonları yüksektir. Etki şekline ve maruz kalma yoluna bağlı olarak, Hg biyolojik olarak birikebilir, protein denatürasyonunu indükleyebilir, DNA metiltransferaz gibi temel enzimleri bozabilir ve hatta oksidatif stres nedeniyle hücre zarlarına zarar verebilir.³³ Bu moleküler etkiler; hareket, sindirim aktivitesi ve sinir sistemi gibi kritik fonksiyonları bozar.³³

Sonuç olarak, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-6792-3p, hsa-miR-4691-5p, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-1238-3p, hsa-miR-451a, hsa-miR-433-5p, hsa-miR-132-5p miRNA'ların Hg zehirlenmesinin biyobelirteçleri olarak kullanılabileceğini ve miRNA-gen ilişkili sinyal yollarının Hg toksisitesinde önemli bir role sahip olabileceğini düşünmekteyiz. miRTarBase miRNA hedef zenginleştirme sonuçlarına göre; Hg toksisitesiyle bağlantılı hsa-miR-1238-3p'nin FDR değeri diğer miRNA'lara göre daha yüksek olarak (FDR:0.192) bulunduğu için renk skalasında mavi olarak gösterilmiştir. Ayrıca, Hg ile ilişkili genler, miRNA'lar ve hastalıklarla arasındaki bağlantıyı değerlendirmek için deneysel yöntemler kullanarak daha ileri çalışmalar yapılabilir. Literatürde, Hg maruziyeti olan kişilere yönelik miRNA çalışmaları oldukça kısıtlıdır. Bu nedenle, bu çalışma Hg maruziyetiyle ilişkili biyoenformatik alanında özgün bir çalışma içeriğine sahiptir.

Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, Hg aracılı toksisitenin altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik belirlediğimiz bu miRNA'ların, toksik etkiyi öngörebilecek potansiyel

yeni biyobelirteçler olarak seçimi ve tespit edilen bu miRNA'ların Hg maruziyeti risk değerlendirmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu doğrultuda, Hg'ye maruz kalmanın neden olduğu hastalıkların ortaya çıkmasından sorumlu gen-miRNA aracılı nükleer reseptörler meta yolağı, aril hidrokarbon reseptör yolağı, interferon gama sinyal yolağı başta olmak üzere çeşitli moleküler yollar ve gelişimsel, hücresel ve organizmalar arasındaki türler arası etkileşimde yer alan biyolojik süreçler belirlenmiştir.

Çalışmamızda kamuya açık veri tabanları üzerinden biyoenformatik analizler kullanılarak Hg maruziyetinin miRNA ekspresyon düzeyi ile olan ilişkisi araştırıldı. Bu çalışmadan elde edilen sonuçları desteklemesi açısından deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu doğrultuda, miRNA ekspresyon profillemesi ve gerçek zamanlı kantitatif PCR yöntemiyle Hg maruziyetiyle ilişkili miRNA'ların belirlenmesiyle elde ettiğimiz biyoenformatik analiz verileri doğrulanabilir.

SONUÇ

Yapılacak genetik araştırmalar ile Hg maruziyetine bağlı olası meslek hastalıklarının ortaya çıkmadan erken evrede teşhisi mümkün olabilecektir. Bu sayede tümüyle önlenabilir meslek hastalıklarının beraberinde getireceği maddi ve manevi kayıpların önüne geçilerek tanıya yönelik tarama standardı oluşturulabilecektir. Daha sonrasında olası hücresel ve genomik değişikliklerin neden olduğu kayıpların önlenmesinde de yarar sağlayabileceği görüşünü paylaşmaktayız. Mesleki maruziyetin karakterizasyonunun, rutinde kullanılan cıva maruziyetine yönelik tarama testlerinin, miRNA biyobelirteç testleriyle birlikte ele alınması, meslek hastalıklarında genetik yatkınlığın rolünün ortaya konulmasında yarar sağlayacaktır. Bu çalışma neticesinde miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanımının işyerlerinde rutin tarama programlarına dahil edilmesi mevcut aşamada maliyet etkili olmamakla birlikte, çeşitli genetik test kitlerinin kullanıma girmesi ve maliyetlerinin düşürülmesi ile mevcut tarama testleri ile birlikte kullanımı meslek hastalıklarına karşı önlem alınmasında oldukça faydalı olacaktır. Sonuç olarak, bu çalışma, tespit ettiğimiz 11 miRNA üzerinden hedeflenen yeni biyobelirteçler aracılığıyla Hg maruziyetine bağlı ortaya çıkabilecek mesleki hastalıkların erken aşamada önüne geçme fırsatı sunacak, işyerlerinde çalışan sağlığı ve güvenliğinin geliştirilmesi için gerekli koşulların sağlanmasında bilgilendirici olacaktır.

*Yazarlar herhangi bir çıkar ilişkisi içinde bulunmadıklarını bildirmiştir.



**CİVA MARUZİYETİYLE
İLİŞKİLİ GENLERİN
VE miRNA'LARIN
BİYOENFORMATİK
VERİ TABANLARI
ARACILIĞIYLA
ARAŞTIRILMASI**

KAYNAKLAR

1. Branco V, Caito S, Farina M, et al. Biomarkers of mercury toxicity: Past, present, and future trends. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2017; 20: 119-154.
2. Duru E, Yalçın HT, Çakır DA, et al. Cıva maruziyetinin nörodejeneratif hastalıklar üzerindeki etkisi: geleneksel derleme. *Hacettepe Univ J Fac Pharm* 2024; 44: 62-74.
3. Chirico F, Scoditti E, Viora C, et al. How occupational mercury neurotoxicity is affected by genetic factors. A Systematic Review. *Applied Sciences* 2020; 10: 7706.
4. Magnavita N, Sabatelli M, Scoditti E, et al. Personalized prevention in mercury-induced amyotrophic lateral sclerosis: a case report. *Applied Sciences* 2020; 10: 7839.
5. Wallace DR, Taalab YM, Heinze S, et al. Toxic-metal-induced alteration in miRNA expression profile as a proposed mechanism for disease development. *Cells* 2020; 9.
6. Lozano M, Yousefi P, Broberg K, et al. DNA methylation changes associated with prenatal mercury exposure: A meta-analysis of prospective cohort studies from PACE consortium. *Environ Res* 2022; 204: 112093.
7. Wang WX, Wilfred BR, Baldwin DA, et al. Focus on RNA isolation: obtaining RNA for microRNA (miRNA) expression profiling analyses of neural tissue. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1779: 749-757.
8. Tunçdemir MT and Yerlikaya FH. The relationship between plasma micrornas and serum mercury levels in patients with amalgam filling and dentists. *Selcuk Dent J* 2021; 8: 736-743.
9. Marsit CJ. Influence of environmental exposure on human epigenetic regulation. *J Exp Biol* 2015; 218: 71-79.
10. Ding E, Guo J, Bai Y, et al. MiR-92a and miR-486 are potential diagnostic biomarkers for mercury poisoning and jointly sustain NF-kappaB activity in mercury toxicity. *Sci Rep* 2017; 7: 15980.
11. Awaluddin SM, Mahjom M, Lim KK, et al. Occupational disease and injury in Malaysia: a thematic review of literature from 2016 to 2021. *J Environ Public Health* 2023; 2023: 1798434.
12. Jumat MI, Hayati F, Syed Abdul Rahim SS, et al. Occupational lung disease: A narrative review of lung conditions from the workplace. *Ann Med Surg (Lond)* 2021; 64: 102245.
13. Shirkhanloo H, Golbabaie F, Hassani H, et al. Occupational exposure to mercury: air exposure assessment and biological monitoring based on dispersive ionic liquid-liquid microextraction. *Iran J Public Health* 2014; 43: 793-799.
14. Hu XF, Lowe M and Chan HM. Mercury exposure, cardiovascular disease, and mortality: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Environ Res* 2021; 193: 110538.
15. Tumolo MR, Panico A, De Donno A, et al. The expression of microRNAs and exposure to environmental contaminants related to human health: a review. *Int J Environ Health Res* 2022; 32: 332-354.
16. Wang X, Yang B, Xiong T, et al. Identification of potential biomarkers of gout through weighted gene correlation network analysis. *Front Immunol* 2024; 15: 1367019.
17. Hochberg Y and Benjamini Y. More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat Med* 1990; 9: 811-818.
18. Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003; 13: 2498-2504.
19. Comparative Toxicogenomics Database (<https://ctdbase.org/query.go?type=ixn&chemqt>equals&chem=name%3AMercury&actionDegreeTypes=increases&actionDegreeTypes=decreases&actionDegreeTypes=affects&actionTypes=ANY&geneqt>equals&gene=&pathwayqt>equals&pathway=&taxonqt>equals&taxon=&goqt>equals&go=&sort=chemNmSort&perPage=50&action=Search>). Access Date: January-2024.
20. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas* 1960; 20: 27-46.
21. Oliveto S, Alfieri R, Miluzio A, et al. A polysome-based microRNA screen identifies miR-24-3p as a novel promigratory miRNA in Mesothelioma. *Cancer Res* 2018; 78: 5741-5753.
22. Kerimis D, Kontos CK, Christodoulou S, et al. Elevated expression of miR-24-3p is a potentially adverse prognostic factor in colorectal adenocarcinoma. *Clin Biochem* 2017; 50: 285-292.
23. Gao Z, Zhou L, Hua S, et al. miR-24-3p promotes colon cancer progression by targeting ING1. *Signal Transduct Target Ther* 2020; 5: 171.
24. Tao YC, Wang YH, Wang ML, et al. Upregulation of microRNA-125b-5p alleviates acute liver failure by regulating the Keap1/Nrf2/HO-1 pathway. *Front Immunol* 2022; 13: 988668.
25. Reid G, Johnson TG and van Zandwijk N. Manipulating microRNAs for the treatment of malignant pleural mesothelioma: past, present and future. *Front Oncol* 2020; 10: 105.
26. Yang D, Tan X, Lv Z, et al. Regulation of Sirt1/Nrf2/TNF-alpha signaling pathway by luteolin is critical to attenuate acute mercuric chloride exposure induced hepatotoxicity. *Sci Rep* 2016; 6: 37157.
27. H EA, El-Guendy N, Radwan EM, et al. Possible use of miR-223-3p as a prognostic marker in transarterial chemoembolization treatment of hepatocellular carcinoma patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2022; 23: 4125-4135.
28. Wang X, Ding YY, Chen Y, et al. MiR-223-3p Alleviates vascular endothelial injury by targeting IL6ST in Kawasaki disease. *Front Pediatr* 2019; 7: 288.
29. Sanders AP, Burris HH, Just AC, et al. Altered miRNA expression in the cervix during pregnancy associated with lead and mercury exposure. *Epigenomics* 2015; 7: 885-896.
30. Ding E, Zhao Q, Bai Y, et al. Plasma microRNAs expression profile in female workers occupationally exposed to mercury. *J Thorac Dis* 2016; 8: 833-841.
31. Barbagallo D, Piro S, Condorelli AG, et al. miR-296-3p, miR-298-5p and their downstream networks are causally involved in the higher resistance of mammalian pancreatic alpha cells to cytokine-induced apoptosis as compared to beta cells. *BMC Genomics* 2013; 14: 62.
32. Hu H, Shi Y, Zhang Y, et al. Comprehensive gene and microRNA expression profiling on cardiovascular system in zebrafish co-exposed of SiNPs and MeHg. *Sci Total Environ* 2017; 607-608: 795-805.
33. Frat L, Chertemps T, Pesce E, et al. Single and mixed exposure to cadmium and mercury in *Drosophila melanogaster*: Molecular responses and impact on post-embryonic development. *Ecotoxicol Environ Saf* 2021; 220: 112377.