T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# PREEKLAMPSİLİ HASTALARIN PLASENTA, PLASENTA YATAĞI VE KORDON DOKUSUNDA GEN EKSPRESYON ANALİZİ

**Zeynep ŞİMŞEK**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Şubat, 2022

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# PREEKLAMPSİLİ HASTALARIN PLASENTA, PLASENTA YATAĞI VE KORDON DOKUSUNDA GEN EKSPRESYON ANALİZİ

Zeynep ŞİMŞEK tarafından hazırlanan tez çalışması 21.02.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

**Jüri Üyeleri**

Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üye. Emel ORDU, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Günay ANACAK, Üye

Ege Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Preeklampsili Hastaların Plasenta, Plasenta Yatağı ve Kordon Dokusunda Gen Ekspresyon Analizi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Zeynep ŞİMŞEK

İmza

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FYL-2020-3844 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

*Aileme*

# TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca deneyimleri ve bilgi birikimi ile bana yol gösteren, tez çalışmalarımda tüm desteği ile yanımda olan öğrencisi olmaktan gurur duyduğum saygıdeğer hocam ve danışmanım Sayın Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gebze Teknik Üniversitesinde çalışmalarım için fırsat sağlayan arkadaşım Maide ŞEKER'e, bu zorlu dönemde laboratuvarının kapılarını açan Sayın Prof. Dr. Tamer YAĞCI'ya, meslek bilgisi ve deneyimlerini sabırla bana aktaran Arş. Gör. Arzu AYSAN'a ve beni büyük bir hoşgörü ile karşılayan GTÜ ailesine,

Laboratuvarda uzun saatler boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, her zaman her konuda yanımda olan değerli arkadaşım Sabina Neziri'ye, çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşım Arş. Gör. Emre AKTAŞ'a,

Üniversitenin ilk gününden beri hayatımın her anında yanımda olan, her şeyi paylaşabildiğimiz, beraberken saatlerce güldüğümüz can dostlarım Hazal ŞAKAR, Didem ÇETİN ve Işılay AKDAĞ'a,

2021'in bana kazandırdığı en özel insan ve seyahat arkadaşım Ceyda YAŞAR'a,

Çıkmış olduğum bu kariyer yolculuğunda bana benden daha çok inanan, "Sen istediğin her şeyi başarabilirsin" gücünü bana aşılayan, yaşadığım tüm sıkıntıları paylaşabildiğim, ellerimi hiç bırakmayan, hayatımdaki en büyük şansım Mümin BAYRAM'a,

Hayatımın her anında maddi ve manevi tüm destekleri ile yanımda olan, her zaman her şeyi yapabileceğime canı gönülden inanan ve sevgilerini hiçbir zaman eksik hissetmediğim aileme bir teşekkürü borç bilirim. Büyük bir sabırla beklemenin de bir lütuf olduğunu gösteren güzel insan annem Elife ŞİMŞEK'e, "İnsanlara hoşgörü ile yaklaşman kalbinde güzellikler açtırır" hayat felsefesi ile yol gösteren babam Mecit ŞİMŞEK'e, bu süreçte yaşamış olduğum duygu değişimlerime birebir şahit olan, tüm desteği ve güzel kalbi ile yanımda olan kardeşim Uğur Ünsal ŞİMŞEK'e, en büyük motivasyon kaynağım, evimizin neşesi Leo'ya en içten dileklerimle teşekkür ediyorum.

Zeynep ŞİMŞEK

# İÇİNDEKİLER

**SİMGE LİSTESİ** viii
**KISALTMA LİSTESİ** ix
**ŞEKİL LİSTESİ** xi
**TABLO LİSTESİ** xii
**ÖZET** xiii
**ABSTRACT** xv
**1 GİRİŞ** 1
1.1 Literatür Özeti ... 1
1.2 Tezin Amacı ... 3
1.3 Hipotez ... 3
**2 GENEL BİLGİLER** 4
2.1 Plasenta Yapısı ve Gelişimi ... 4
2.2 Preeklampsi ... 6
2.2.1 Preeklampsi İnsidansı ve Risk Faktörleri ... 8
2.2.2 Preeklampside Patofizyolojik Mekanizmalar ... 10
2.2.3 Preeklampsi ile İlişkili Genler ... 20
2.3 Gen Ekspresyon Profilleme ... 31
2.4 Real-Time PCR ... 33
**3 MATERYAL VE METOT** 38
3.1 Materyal ... 38
3.1.1 Kullanılan Cihazlar ... 38
3.1.2 Kullanılan Ticari Kitler ... 38
3.1.3 Kullanılan Doku Materyali ... 39
3.2 Metot ... 39
3.2.1 Genlerin Belirlenmesi ... 39
3.2.2 Plasental ve İlişkili Dokuların Hazırlanması ... 40
3.2.3 Total RNA İzolasyonu ... 41
3.2.4 RNA Konsantrasyon ve Miktar Tayini ... 42
3.2.5 RNA Pürifikasyonu ... 43
3.2.6 Agaroz Jel Elektroforezi ... 43
3.2.7 Primer Tasarımı ve Dilüsyonu ... 44

3.2.8 Real-Time PCR ..... 45
**4 SONUÇ VE ÖNERİLER** **47**
4.1 Total RNA İzolasyonu..... 47
4.1.1 RNA Miktar Tayini Sonuçları..... 48
4.1.2 RNA Pürifikasyon Sonuçları ..... 49
4.1.3 Agaroz Jel Elektroforezi ..... 50
4.2 Real-Time PCR Analizi ..... 50
4.3 Tartışma ve Öneriler ..... 56
**KAYNAKÇA** **60**
**A ETIK KURUL RAPORU** **77**
**TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR** **78**

# SİMGE LİSTESİ

| | |
|---|---|
| α | Alfa |
| β | Beta |
| dk | Dakika |
| rpm | Dakikadaki devir sayısı |
| Δ | Delta |
| dL | Desilitre |
| γ | Gamma |
| g | Gram |
| pH | Hidrojen gücü |
| L | Litre |
| $\mu$g | Mikrogram |
| $\mu$L | Mikrolitre |
| $\mu$M | Mikromolar |
| mg | Miligram |
| mL | Mililitre |
| mm | Milimetre |
| mM | Milimolar |
| M | Molar |
| ng | Nanogram |
| nM | Nanomolar |
| pg | Pikogram |
| sa | Saat |
| sn | Saniye |
| °C | Santigrat derece |

# KISALTMA LİSTESİ

| | |
|---|---|
| *ABCB4* | ATP Bağlanma İçeren B Üyesi 4 |
| ACOG | Amerikan Kadın Doğum ve Jinekologlar Koleji |
| AT1-AA | Anjiyotensin Tip 1 Reseptör Agonistik Otoantikorları |
| cDNA | Komplementer Deoksiribonükleik Asit |
| $C_t$ | Eşik değeri döngüsü |
| *DDX3Y* | DEAD – box helicase 3 Y – Linked |
| DEGs | Diferansiyel Olarak Eksprese Edilen Genler |
| DEPC | Dietil Pirokarbonat |
| $dH_2O$ | Distile $H_2O$ |
| DNA | Deoksiribonükleik Asit |
| EGFR | Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü |
| ET | Endotelin |
| *FGA* | Fibrinojen Alfa Zinciri |
| *FIBCD1* | Fibrinojen C Domain İçeren 1 |
| FLT1 | Follistatin Benzeri Tirozin Kinaz 1 |
| HELLP | Hemoliz Aracılı Düşük Karaciğer Platelet |
| HIF-1 | Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 |
| HLA | İnsan Lökosit Antijeni |
| HUVEC | İnsan Göbek Ven Hücreleri |
| Ib | İmmunoglobulin |
| IFN | İnterferon |
| IL | İnterlökin |
| IUGR | Rahim İçi Büyüme Kısıtlaması |
| KDR | Kinaz Domain Bölgesi |
| MHC | Major Doku Uyumluluğu Kompleksi |
| miRNA | Mikro RNA |
| ncRNA | Kodlanmayan RNA |
| NGS | Yeni Nesil Sekanslama |
| NOS | Nitrik Oksit Sentaz |
| OD | Optik yoğunluk |
| PAF | Platelet Aktive Edici Faktör |

| | |
|---|---|
| PBS | Fosfat Tamponu |
| PE | Preeklampsi |
| PGI2 | Prostaglandin I2 |
| PlGF | Plasental Büyüme Faktörü |
| Q-RT PCR | Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| RNA | Ribonükleik Asit |
| RNA-seq | RNA Sekanslama |
| Rnaz | Ribonükleaz |
| ROS | Reaktif Oksijen Türleri |
| *RPS4Y1* | Ribozomal Protein S4 Y – Linked |
| sEng | Çözünür Endoglin |
| sFLT1 | Çözünür Follistatin Benzeri Tirozin Kinaz 1 |
| TGF-β | Tümör Büyüme Faktör β |
| TLR-4 | Toll-Like Reseptör-4 |
| TNF-α | Tümör Nekroz Faktör α |
| TXA2 | Tromboksan AII |
| *TXLNGY* | Taxilin gama Pseudogene Y – Linked |
| UV | Ultra Viyolet |
| VEGF | Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü |
| VKİ | Vücut Kitle İndeksi |

# ŞEKİL LİSTESİ

**Şekil 2.1** Plasenta ve kordon anatomik yapısı .....4
**Şekil 2.2** Segmentasyon sonucunda blastosist oluşumu .....5
**Şekil 2.3** Trofoblast invazyonu sonucu plasenta gelişimi [32] .....6
**Şekil 2.4** Preeklampside patofizyolojik mekanizmalar .....11
**Şekil 2.5** Normal ve preeklamptik durumda trofoblast invazyonu [50].....12
**Şekil 2.6** Normotansif ve preeklamptik plasentadan salınan faktörler [52].....17
**Şekil 2.7** Anormal plasentadan salınan immünolojik faktörler.....18
**Şekil 2.8** Endotelyal disfonksiyon [45] .....20
**Şekil 2.9** Plasentada cinsiyete özgü diferansiyel eksprese edilen miRNA'lar.....24
**Şekil 2.10** *FIBCD1* geninin şematik görüntüsü[1].....26
**Şekil 2.11** *FIBCD1* geninin kromozomal lokasyonu[2] (9q34.12).....26
**Şekil 2.12** *FGA* geninin şematik görüntüsü[1].....27
**Şekil 2.13** *FGA* geninin kromozomal lokasyonu[2] (4q31.3).....27
**Şekil 2.14** *ABCB4* geni şematik görüntüsü[1].....28
**Şekil 2.15** *ABCB4* geni kromozomal lokasyonu[2] (7q21.13).....28
**Şekil 2.16** Y kromozomunda lokalize *RPSY1*, *DDX3Y* ve *TXLNGY* genleri[2].....29
**Şekil 2.17** *DDX3Y* geni şematik görüntüsü[1].....30
**Şekil 2.18** *RPS4Y1* geni şematik görüntüsü[1] .....30
**Şekil 2.19** *TXLNGY* geni şematik görüntüsü[1] .....31
**Şekil 2.20** Real-Time PCR fazları .....36
**Şekil 3.1** Dokuların sıvı azot içerisinde küçük parçalara ayrılması .....40
**Şekil 3.2** Fenol kloroform çöktürmesi sonucunda oluşan faz ayrımı .....42
**Şekil 3.3** Nanodrop cihazı.....42
**Şekil 3.4** Applied Biosystems StepOne Plus Real-Time PCR cihazı .....46
**Şekil 4.1** Cihaz tarafından tespit edilen fenol kontaminasyon analizi .....49
**Şekil 4.2** İzole edilen RNA örneklerinin[1] agaroz jel elektroforezi görüntüsü .....50
**Şekil 4.3** Preeklamptik plasenta dokusularında genlerin ekspresyon seviyeleri..54
**Şekil 4.4** İlgilenilen genlerin kordon dokusuna ait ekspresyon seviyeleri .....55
**Şekil 4.5** Plasental yatak dokusu ekspresyon seviyeleri.....55

# TABLO LİSTESİ

**Tablo 2.1** Preeklampsi klinik tanı kriterleri.....7
**Tablo 2.2** Şiddetli preeklampsi tanı kriterleri[1].....8
**Tablo 2.3** Preeklampsi risk faktörleri.....10
**Tablo 2.4** Preeklampside diferansiyel eksprese edilen genler.....21
**Tablo 2.5** Preeklampsi ile ilişkili bazı miRNA'lar.....23
**Tablo 3.1** Gen ekspresyon farklılıkları belirlenecek olan genlerin listesi.....40
**Tablo 3.2** Genlere ait ileri ve geri primer dizileri.....44
**Tablo 3.3** PCR reaksiyonu için kullanılan bileşenler ve gerekli hacimler.....45
**Tablo 3.4** PCR için Termal Döngü Protokolü.....46
**Tablo 4.1** İzole edilen total RNA'ların kalite ve konsantrasyon ölçüm değerleri[1] 48
**Tablo 4.2** Pürifikasyon işlemi sonrasında gözlemlenen ölçüm sonuçları[1].....49
**Tablo 4.3** Genlerin plasenta dokusunda ortalama Ct değerleri.....51
**Tablo 4.4** Genlerin kordon dokusunda ortalama Ct değerleri.....51
**Tablo 4.5** Genlerin plasental yatak dokusunda ortalama Ct değerleri.....52
**Tablo 4.6** Hedef genlerin kontrol grubuna göre $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....53
**Tablo 4.7** Hedef genlerin kontrol grubuna göre log2 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) değerleri.....53

# ÖZET

## Preeklampsili Hastaların Plasenta, Plasenta Yatağı ve Kordon Dokusunda Gen Ekspresyon Analizi

Zeynep ŞİMŞEK

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Preeklampsi, gebeliğin 20. haftasından sonra gebelik hipertansiyonuna proteinüri klinik belirtisinin eklenmesi ile seyreden %3-8 oranında maternal-fetal morbidite ve mortaliteye sahip, çeşitli patofizyolojik faktörler sonucu gebelikte sık görülen bir komplikasyondur. Hastalığın patogenezi tam olarak aydınlatılamamış olsa da günümüzde yapılan çalışmalarda üzerine en çok yoğunlaşılan mekanizma anormal plasenta oluşumudur. Anormal plasenta oluşumu sonucunda dolaşıma salınan biyoaktif faktörler sistemik endotelyal disfonksiyona sebep olmaktadır. Preeklampsi gelişiminde risk faktörleri, genetik faktörler, anne ve fetüse ait bazı immünolojik faktörler sorumludur. Bu faktörler ilerleyen aşamalarda maternal kardiyovasküler, renal, serebral ve hepatik bozukluklara yol açmaktadır. Kompleks bir hastalık olan preeklampsinin henüz tam olarak bir tedavisi bulunmamakla birlikte, hastalığın sona ermesinin tek çözümü doğum ve plasentanın anneden uzaklaştırılmasıdır.

Bu çalışmada preeklamptik gebelere ait plasenta, plasenta yatağı ve kordon dokularında ifade edilen preeklampsi ile ilişkili genler arasındaki ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi ve bu genlerin preeklampsi öngörüsünde biyobelirteç olarak kullanılabilmesi için sonraki çalışmalara bir katkı sağlaması hedeflenmiştir. Bu tez çalışmasının amacı, çalışma grubumuz tarafından yapılan RNA-seq transkriptom analizi sonucunda preeklampside anlamlı diferansiyel ekspresyonu saptanan genler arasından seçilen *FIBCD1, FGA, ABCB4, DDX3Y, RPS4Y1* ve *TXLNGY* genlerinin dokular arasındaki ekspresyon farklılıklarının Real-Time PCR yardımı ile valide edilmesidir. Çalışma kapsamında 3 preeklamptik ve 3 normotansif gebe hastadan alınan plasenta, plasenta yatağı ve kordon dokularından total RNA izolasyonu yapıldı. Preeklampsi ve kontrol gruplarına ait dokular arasındaki ekspresyon seviyeleri Real-Time PCR yardımı ile belirlendi. Çalışmanın sonucunda preeklampsi hastalarına ait plasenta doku örneklerinde ilgilenilen tüm genler için ekspresyon artışı saptanırken kordon ve plasenta yatağı dokularında genlerin ekspresyonlarının azaldığı saptandı.

**Anahtar Kelimeler:** Preeklampsi, plasental dokular, hipertansiyon, gen ekspresyonu, real-time PCR

# ABSTRACT

## Gene Expression Analysis in Placenta, Placental Bed and Cord Tissue of Patients with Preeclampsia

Zeynep ŞİMŞEK

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Preeclampsia is a frequent complication in pregnancy because of various pathophysiological factors, with 3-8% maternal-fetal morbidity and mortality, progressing with the addition of proteinuria clinical signs to gestational hypertension after the 20th week of pregnancy. Although the pathogenesis of the disease has not been fully elucidated, the most focused mechanism in current studies is abnormal placenta formation. Bioactive factors released into the circulation as a result of abnormal placenta formation cause systemic endothelial dysfunction. Risk factors, genetic factors, maternal and fetal immunological factors are responsible for the development of preeclampsia. These factors lead to maternal cardiovascular, renal, cerebral, and hepatic disorders in the later stages. Although there is no complete cure for preeclampsia, which is a complex disease, the only solution to the end of the disease is delivery and removal of the placenta from the mother.

In this study, it was aimed to determine the expression levels among the genes associated with preeclampsia expressed in the placenta, placental bed, and cord tissues of preeclamptic pregnant women and to contribute to future studies in order to use these genes as a biomarker in the prediction of preeclampsia. The aim of this thesis study is to validate the expression differences between tissues of FIBCD1, FGA, ABCB4, DDX3Y, RPS4Y1, and TXLNGY genes selected among the genes with significant differential expression in preeclampsia because of RNA-seq transcriptome analysis performed by our study group, with the help of Real-Time PCR. Within the scope of the study, total RNA was isolated from the placenta, placental bed, and cord tissues were taken from 3 preeclamptic and 3 normotensive pregnant patients. Expression levels between tissues of preeclampsia and control groups were determined with the help of Real-Time PCR. As a result of the study, it was determined that the expression of all genes of interest was increased in the placental tissue samples of preeclampsia patients, while the expressions of the genes were decreased in the cord and placental bed tissues.

**Keywords:** Preeclampsia, placental tissues, hypertension, gene expression, real-time PCR

# 1
# GİRİŞ

## 1.1 Literatür Özeti

Gebelik hipertansif bozukluklardan biri olan preeklampsi dünya çapında gebeliklerin %3-8'ini etkileyen ve maternal-fetal ölümlere sebep olan multifaktöriyel bir hastalıktır [1], [2]. Gelişmekte olan ülkelerde her yıl 60.000'den fazla maternal ölüme sebep olurken gelişmiş ülkelerde preeklampsinin görülme sıklığı gün geçtikçe artmaktadır [3]. Kompleks bir hastalık olan preeklampsinin tam olarak bir tedavisi bulunmamaktadır. Bebeğin anneden uzaklaştırılması preeklampsinin komplikasyonlarını sona erdirmektedir [4]. Bebeğin doğumu ve plasentanın uzaklaştırılması ile teorik olarak preeklampsinin sonlandığı düşünülse de preeklampsi dâhil tüm hipertansif hastalıklarda gebeliğinde bir hipertansif komplikasyona maruz kalmış annelerin, normotansif annelere göre, doğumdan sonraki dönemler için kardiyovasküler hastalığa sahip olma risklerinin ciddi seviyede yükseldiği saptanmıştır [5]. Preeklampsi temel olarak en az dört saat ara ile ölçülen iki ayrı hipertansiyonda sistolik kan basıncı ($\geq$140 mm Hg), diastolik kan basıncı ($\geq$90 mm Hg) ve idrarda $\geq$ 300 mg/L proteinüri/24 saat ile karakterizedir [6]. Proteinüri yokluğunda ise hipertansiyon ile birlikte karaciğer fonksiyon bozuklukları, renal fonksiyonda bozulma, pulmoner ödem veya serebral bozukluk bulgularından herhangi birinin eklenmesi söz konusudur [2]. Preeklampsi insidansını artıran birkaç predispozan faktör vardır. Bunlar arasında nulliparite (daha önce doğum yapmamış), çoğul gebelikler, önceki preeklampsi öyküsü, kronik hipertansiyon, ilk gebelikte >35 yaş, obezite ve diyabet bulunmaktadır [7], [8]. Ayrıca genetik, immünolojik faktörler de preeklampsi gelişmesinde rol almaktadır [9].

Preeklampsinin patofizyolojik mekanizmaları tam olarak ortaya çıkarılamasa anormal plasenta oluşumu preeklampsi ile ilişkilendirilmektedir [10]. Plasenta anne ile bebek arasında köprü görevi gören, fetüse gerekli besin ve oksijenlerin taşınmasını sağlayan bir damar ağ yapısına sahiptir [11]. Bu yüzden plasentasyon

fetüs gelişimi için oldukça fazla önem arz etmektedir. Normal plasenta oluşumunda blastosistin dış katmanında bulunan trofoblast hücreleri desidua tabakasına yeterince invazyon yaparak maternal kanın fetüse ulaşmasını sağlayan spiral arter yeniden şekillenmesini başlatmaktadır [11]. Ancak preeklamptik durumda bu mekanizmanın bozulduğu gösterilmektedir. Anormal plasenta oluşumu spiral arterlerin geniş damarlara dönüşmesini baskılayarak plasental hipoksi olarak da tanımlanan plasentaya yeterli oksijenin ulaştırılamaması durumuna sebep olmaktadır [12]. Anormal plasenta oluşumu sonrasında plasental hipoksi durumunu takiben maternal dolaşıma sFLT1 ve sEng gibi antianjiyogenik faktörler salınmaktadır. Bu faktörler anjiyogenezde görev alan FLT1 (VEGFR) reseptörünün VEGF ve PlGF gibi anjiyogenik faktörlere bağlanmasını engelleyerek endotel disfonksiyonuna sebep olmaktadır [13]. Yapılan çalışmalarda preeklampsi durumunda sFLT1'in dolaşımdaki miktarının arttığı gösterilmektedir [14]. Meydana gelen endotel hasarı maternal olarak karaciğer, böbrek, beyin gibi organları büyük oranda etkilemektedir [15].

Son yıllarda hastalıkların moleküler düzeyde incelenmesini kolaylaştıran transkriptom profili oluşturmaya yönelik araştırmalar, preeklampsinin ortaya çıkmasına neden olan faktörleri saptamak için de kullanılmaktadır. İnsan transkriptom profillerini ortaya çıkarmak için tamamlayıcı DNA dizileme, tamamlayıcı prob hibridizasyonu kullanan SAGE (gen ekspresyonunun seri analizi) yöntemlerinin yerini mikroarray ve ardından Yeni Nesil Sekanslama (NGS) yöntemini kullanan RNAseq analizleri almaktadır [16]. Yüksek çözünürlüklü RNA-seq teknikleri mikroaaray gibi ön sekans bilgisi gerektirmediğinden pratik ve hızlı bir kullanım sunmaktadır. Bu yöntem ile sadece total RNA değil rRNA, miRNA, circRNA gibi gen regülasyonunda görev alan RNA sınıfları da saptanabilmektedir [17].

Preeklampsi kapsamında yapılan gen ekspresyon analizi için plasentadan elde edilen transkriptomlar oldukça yaygın bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Preeklamptik ve kontrol grubu plasenta dokularından izole edilen RNA'ların yeni nesil dizileme yöntemleri ile analiz edilerek ifadesi değişen genler yapılan çalışmalar neticesinde saptanmaktadır [18], [19], [20], [21]. Elde edilen veriler doğrultusunda, preeklampsi durumunda normal gebelik durumuna göre farklı

ifade edilen bazı genler belirlenerek bu genler ile ilişkili metabolik yolaklar araştırılmaktadır. Bu çalışmalar genel olarak plasental veya ilişkili dokulardan elde edilen numunelerden RNA izolasyonu, RNA-seq ve dizilenen verilerden yola çıkılarak farklı ifade edilen genlerin saptanıp, bu genlerin ilişkili olduğu yolakları anlayabilmek için biyoinformatik araçlar ve analiz yöntemleri kullanmaya dayanmaktadır. Bu analizler sonucunda ilişkili yolaklar ve biyolojik prosesler saptanması mümkün olabilmektedir [22], [23], [24], [25]. Transkriptom analizi sonucunda elde edilen verilerin doğrulanması ilgilenilen hastalığın tanı/teşhis/tedavisi için önemli bir adımdır. Farklı ifade edilen genlerin plasental dokuda eksprese olup olmadığını ve/veya ne kadar eksprese olduğunu göstermek için Real-Time PCR yardımı ile validasyon çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda plasenta ve ilişkili dokulardaki gen ekspresyonları belirlenmektedir [26], [27].

## 1.2 Tezin Amacı

Çalışma grubumuz tarafından yürütülen RNA-seq transkriptom analiz çalışmaları sonucunda preeklampsi ile ilişkili olan genler arasından *FIBCD1, FGA, ABCB4, DDX3Y, RPS4Y1 ve TXLNGY* genlerinin ekspresyon seviyelerinin anlamlı derecede değiştiği saptanmıştır. Bu veriler doğrultusunda patofizyolojik mekanizmaları tam olarak açıklanamayan preeklampsinin plasenta, kordon ve plasenta yatağı dokularında ilgilenilen genlerin ekspresyon farklılıklarının Real Time PCR ile belirlenmesi amaçlanmaktadır.

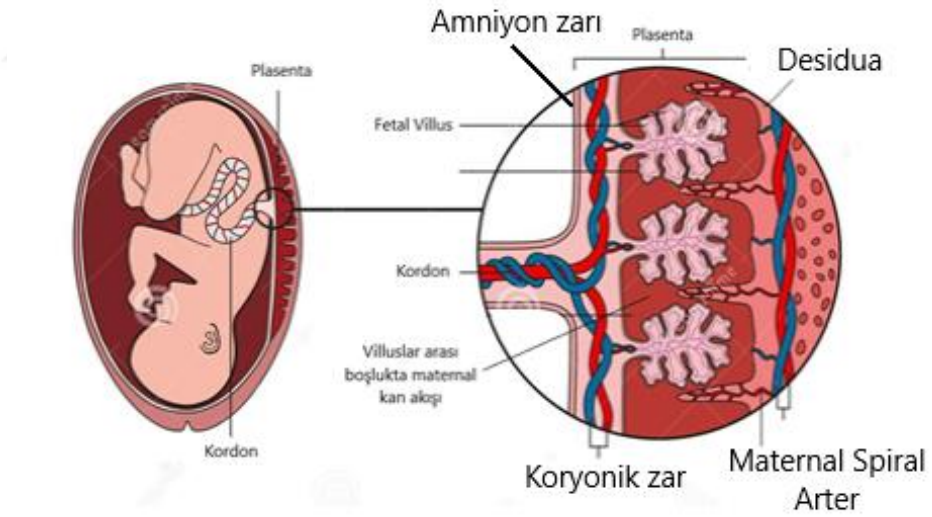
## 1.3 Hipotez

Yapılan literatür taraması sonucunda preeklampsi gelişiminde plasental ve ilişkili dokularda ekspresyon seviyeleri farklı olan bazı genler saptanmıştır. Çalışma grubumuz tarafından yapılmış olan transkriptom analiz sonuçlarını da göz önüne alarak daha önce ekspresyon analizi yapılmayan genler üzerine yoğunlaşarak bu genlerin plasenta, kordon ve yatak dokularındaki ekspresyon farklılıklarının Real-Time PCR yardımı ile araştırılması ve bu genlerin preeklampsi öngörüsünde biyobelirteç olarak kullanılabilmesi için sonraki araştırmalar için bir katkıda bulunmak hedeflenmektedir.

# 2
# GENEL BİLGİLER

## 2.1 Plasenta Yapısı ve Gelişimi

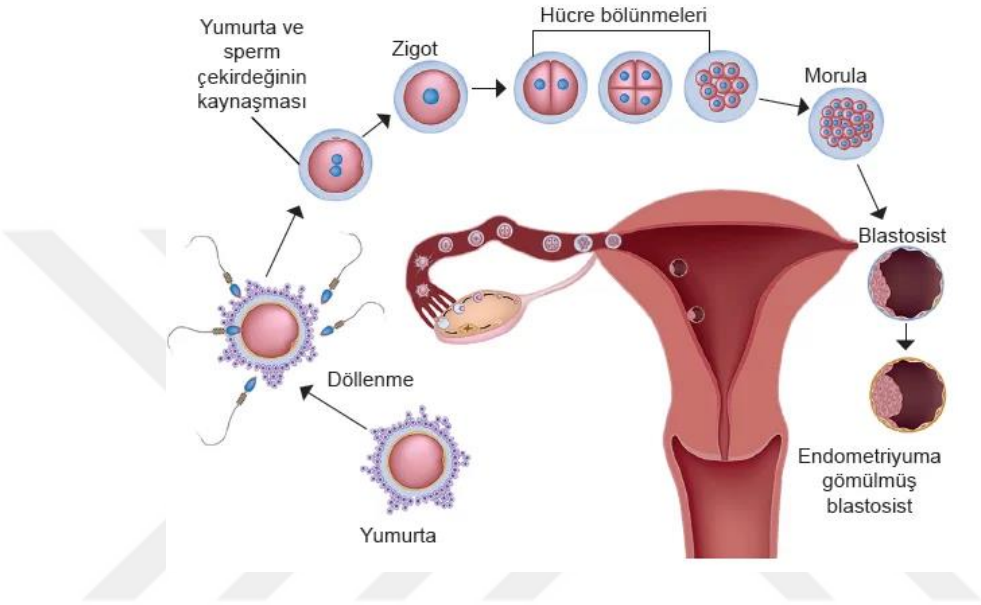
Plasenta anne ile fetüs arasındaki dolaşımı sağlayarak fetüsün beslenmesinde ve metabolik aktivitenin regüle edilmesinde görev almaktadır. Ayrıca sürecin devamlılığında görevli gebelik hormonlarının üretilmesini sağlayan maternal ve fetal kaynaklı yapıları içermektedir. Gebeliğin sonlanması ile plasentanın işlevi de sona ermektedir [11]. Plasenta fetal ve maternal olmak üzere iki farklı kaynaktan köken almaktadır. Fetal kaynaklar göbek kordonu ve amniyotik, koryonik membran yapılarından oluşmaktadır. Endometriyum tabakasından kökenlenen ve desisua adı verilen plasenta yatağı olarak da bilinen yapı ise maternal kökenli olarak gelişmektedir [28]. (Şekil 2.1)




**Şekil 2.1** Plasenta ve kordon anatomik yapısı

Plasenta fetüsün besin ihtiyacını karşılamak için gebeliğin dokuzuncu haftasından itibaren birtakım yapısal değişikliklere uğramaktadır. Plasenta gelişimi sperm ve oositin birleşmesi sonucu oluşan fertilizasyon (döllenme) ile başlamaktadır. Bu süreç segmentasyon ve gastrulasyon ile devam etmektedir. Zigotun mitoz bölünme sonucunda hücre miktarını artırması olayına segmentasyon adı verilmektedir. Zigot her bölünmeden sonra blastomer yapısına dönüşmektedir.

İlerleyen aşamalarda 16 hücreli morula (dut) yapısına dönüşmektedir [29]. Artan hücre sayısı ile birlikte bir kütle artışı söz konusudur. Bu artış sonucunda hücreler dış tabakaya doğru hareket etmeye başlamaktadır. Dış kısımdan tek sıralı hücre tabakası ile çevrili olan ve içi sıvı dolu bir küreye benzeyen bu yapıya blastosist adı verilmektedir [30]. Bir zigota ait segmentasyon aşamaları Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



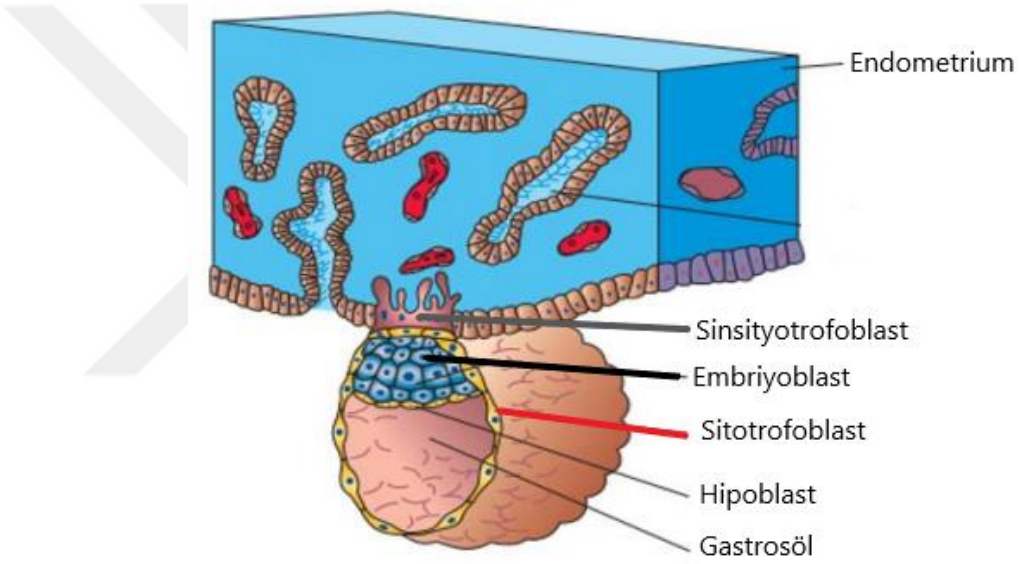

**Şekil 2.2** Segmentasyon sonucunda blastosist oluşumu

Blastosist hücrelerinin iç kısma doğru çökmesi ile gastrulasyon (tabakalaşma) evresi başlamaktadır. Çökme ile birlikte endoderm ve ektoderm olmak üzere iki embriyonik tabaka oluşmaktadır. Bu iki tabakadan ayrılan bazı hücrelerin farklılaşması sonucunda da mezoderm tabakası meydana gelmektedir [31]. Blastosist yapısındaki iç hücrelerden embriyo gelişirken dış hücrelerden de plasenta ve kordon gibi ekstra embriyonik yapıların oluşumunda rol alan trofoblast hücreleri gelişmektedir [28], [29]. Aynı zamanda blastosistin iç kütlesine ait hücreler in vitro fertilizasyonu (IVF) veya çeşitli bilimsel çalışmalar için embriyonik kök hücre (EKH) olarak kullanılabilmektedir [31]. Embriyonal gelişim sürecinde embriyonun korunması için amniyon, koryon gibi bazı ekstraembriyonik dokular meydana gelmektedir. Amniyon içerisinde embriyoyu darbelere karşı korumak ve embriyonun kurumasını önlemek için amniyon sıvısı

bulunmaktadır. Koryon ise ince uzantılar oluşturarak plasenta yapısına katılmakta ve gaz alışverişinde görev almaktadır [31].

Kordon ise plasentayı fetüse bağlayan anne ve fetüs arasında metabolitleri taşımak için iki arter ve bir ven içeren dar bir tüp yapısındadır [28].

Trofoblast hücrelerinin prolifere olması sonucunda endometrium içine doğru uzanan iki hücre tabakası oluşmakta ve bu hücreler plasenta farklılaşmasını sağlamaktadır. Maternal dokuya temas etmeyen içteki hücrelere sitotrofoblast, dışta yer alan ve maternal dokuya temas halinde bulunan hücrelere ise sinsitiyotrofoblast adı verilmektedir [32]. (Şekil 2.3)




**Şekil 2.3** Trofoblast invazyonu sonucu plasenta gelişimi [32]

## 2.2 Preeklampsi

Preeklampsi, gebeliğin 20. haftasından sonra, gebelik hipertansiyonu ve proteinüri ile klinik belirtiler gösteren bir gebelik komplikasyonudur [33]. Preeklampsi, plasental yetmezlik tarafından tetiklendiğinden plasenta hastalığı olarak da adlandırılmaktadır. Gebelikte görülen diyabetin yanında en sık karşılaşılan gebelik ile ilişkili tıbbi komplikasyonlardan biridir [10].

Preeklampsi sınıflandırılmasında hafif preeklampsi tanımı 2013 yılında " American College of Obstetricians and Gynecologist" (ACOG) görev birliği komitesi tarafından ortadan kaldırılmıştır. Preeklampsi şiddetli olmayan preeklampsi ve

şiddetli preeklampsi olarak iki şekilde sınıflandırılmaktadır. Ayrıca preeklampsinin proteinüri tanı kriterine bağlılığı da kabul edilmemiştir. Preeklampsinin birçok organ fonksiyonunu etkileyen daha karmaşık bir durum olduğu sonucuna ulaşılmıştır [2]. Preeklampsi tanı kriterleri Tablo 2.1' de özetlenmiştir.

**Tablo 2.1** Preeklampsi klinik tanı kriterleri

| **Tanı** | **Kriterler** |
|---|---|
| Kan Basıncı | Normotansif bir gebede en az dört saat ara ile yapılan iki ölçüm sonucunda SKB ≥140 mmHg ya da DKB ≥90 mmHg olması<br>20.gebelik haftasından sonra ortaya çıkan SKB ≥160 mmHg ya da DKB ≥110 mmHg olması (Birkaç dakika ara ile ölçülmesi önerilmektedir.) |
| ve | |
| Proteinüri | 24 saatlik idrarda ≥300 mg protein varlığı veya<br>Protein/Kreatinin oranı ≥0,3 mg/ dL olması |
| *Gebeliğin 20. haftasından sonra proteinüri yokluğunda yeni başlangıçlı hipertansiyonu olan hastada, aşağıdaki klinik tablolardan herhangi birinin bulunması* | |
| Trombositopeni | Trombosit sayısı <100.000/ μL |
| Karaciğer Disfonksiyonu | HELLP (hemoliz, yüksek karaciğer enzimleri ve düşük platelet) |
| Böbrek Yetmezliği | Serum kreatinin düzeyi >1.1mg/dL olması ya da serum kreatinin konsantrasyonunun böbrek hastalığı olmadığı durumlarda iki katına çıkması |
| Pulmoner ödem | |
| Serebral ya da görme bozuklukları | |

Tablo 2.2'de ise şiddetli preeklampsi tanı kriterleri görülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar idrardaki protein miktarı ile preeklampsi gelişimi arasında minimal bir ilişki olduğunu göstermektedir ve 2013 yılında ACOG tarafından masif proteinüri (>5g/24 sa) kriteri şiddetli preeklampsi tanı kriterleri arasından çıkarılmıştır. Ayrıca intrauterin gelişme kısıtlılığı ("Intrauterin Growth Restriction" IUGR) da şiddetli hastalık kriterlerinden çıkarılarak IUGR'nin preeklampsiden bağımsız olarak yürütülmesi önerilmektedir [2].

**Tablo 2.2** Şiddetli preeklampsi tanı kriterleri[1]

| Tanı | Kriterler |
|---|---|
| Herhangi bir antihipertansif tedavi almaksızın istirahat halinde hipertansiyon | Dört saat ara ile yapılan iki ölçümde sistolik kan basıncının basıncının ≥160 mmHg veya diastolik kan basıncının ≥110 mmHg olması |
| Trombositopeni | Trombosit sayısı <100.000 /µl |
| Karaciğer fonksiyonlarının bozulması | Karaciğer enzim düzeylerinin normal sınırların iki kat veya üzerine çıkması Herhangi bir tanı ile açıklanamayan süregelen şiddetli sağ üst kadran ağrısı ya da tedaviye yanıt vermeyen epigastrik ağrının olması veya her ikisinin birlikte olması |
| Progresif seyreden böbrek yetmezliği | Serum kreatinin düzeyi >1,1 mg/dL olması ya da herhangi bir böbrek hastalığı olmaksızın serum kreatinin konsantrasyonunun iki kat artması |
| Pulmoner ödem | |
| Yeni başlayan serebral veya görme ile ilgili bozukluklar | |

[1]Bu kriterlerden herhangi biri şiddetli preeklampsi tanımı yapılması için yeterlidir.

### 2.2.1 Preeklampsi İnsidansı ve Risk Faktörleri

Preeklampsi, maternal-fetal mortalite ve morbiditenin ve erken doğumun önde gelen nedenlerinden biridir. Yüksek gelirli ülkelerde anne ölümleri gelişmekte olan ülkelere göre çok daha düşük olmasına rağmen, dünya çapındaki anne ölümlerinin %15'i preeklampsi ile ilişkilendirilmektedir [6]. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) preeklampsi anne ölümlerinin önde gelen sebeplerinden biri olarak bilinmektedir [34]. Türkiye'de yapılan bir çalışmada ise hipertansif hastalıkların gebelikte neden olduğu anne ölüm frekansının %15,5 oranında olduğu raporlanmıştır [35].

Preeklampsinin gelişme olasılığını artıran birçok risk faktörü bulunmaktadır. Genç ve nullipar (daha önce doğum yapmamış olan) gebelerde PE görülme riskinin

daha fazla olduğu bilinmektedir. Ayrıca ileri maternal yaş (>35) preeklampsi oluşumunu tetikleyen bir risk faktörüdür [15]. Hindistan'da yapılan bir çalışma, ileri maternal yaş ile birlikte PE insidansının daha yüksek olduğunu bildirmektedir [36]. Bu durum yaşa bağlı faktörler olan obezite, kronik hipertansiyon ve diyabet ile açıklanmaktadır [10]. Vücut kitle indeksindeki artış obezite olmadığı durumlarda da PE ile ilişkilendirilmektedir [37]. Ayrıca maternal bazı hastalıklar (böbrek hastalıkları, otoimmün bozukluklar, bağ dokusu hastalıkları vs.) preeklampsinin ortaya çıkmasında büyük rol oynamaktadır [10].

Genetik yatkınlık da preeklampsinin meydana gelmesini tetikleyen risk faktörlerinden biridir. Benzer genetik özelliklere sahip kişiler benzer antijen, enzim, reseptör, büyüme faktörü gibi molekülleri sentezledikleri için bu durum preeklampsinin genetik yatkınlığını açıklamaktadır. Preeklampsi görülme sıklığı preeklampsi öyküsüne sahip kadınların kızlarında %20-40 arasında görülürken kız kardeşlerinde bu oran %11-37 olarak görülmektedir. İkiz kız kardeşi olanlara bakıldığında ise preeklampsi görülme oranı %22-47 arasında değişirken monozigotik olanlarda ise bu oran %60'a kadar çıkabilmektedir [38]. İkiz gebeliklerdeki preeklampsi gelişme olasığı tekil gebeliklere göre daha fazla olarak bildirilmektedir [39]. Paternal açıdan bakıldığında ise preeklamptik bebeklerin babaları, başka bir anneden çocuk sahibi olduğunda preeklampsi görülme sıklığı artmaktadır. Bu nedenle preeklampsinin hem maternal hem de fetal kaynaklı, multigenik ve multifaktoriyel bir hastalık olduğu düşünülmektedir [40]. Yapılan çalışmalar etnik kökenin de PE insidans oranlarını etkileyebildiğini göstermektedir. Afrikalı-Amerikalı kadınların Kafkasyalı ve Asyalı kadınlardan daha yüksek PE oranlarına sahip olduğu bildirilmektedir [41]. Ayrıca Afrikalı-Amerikalı kadınlar Avrupalı kadınlara kıyasla plasenta yırtılması ve ölü doğum gibi PE ile ilgili komplikasyonları daha fazla göstermektedir [42]. Genel olarak preeklampsi ile ilişkilendirilen risk faktörleri Tablo 2.3'te özetlenmiştir.

**Tablo 2.3** Preeklampsi risk faktörleri

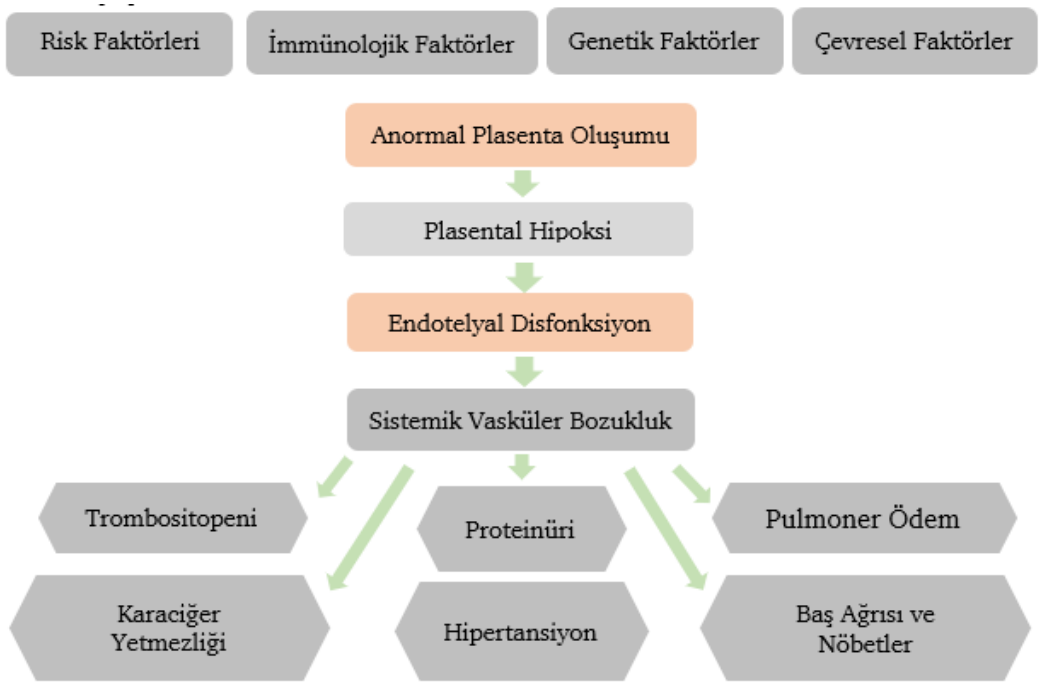
| Gebelik ile ilişkili risk faktörleri | Bireysel risk faktörleri | Beslenme/Çevresel faktörler |
|---|---|---|
| Nulliparite | Kronik hipertansiyon | Düşük Ca++ seviyesi |
| Çoğul gebelik | Obezite/VKİ | Yüksek Na+ seviyesi |
| İkiz gebelik | İleri maternal yaş >35 | Kirleticiler |
| Önceki preeklamptik öykü | Diyabet I ve/veya II | Düşük sosyo-ekonomik durum |
| Aile preeklampsi öyküsü | Trombofili öyküsü | |

### 2.2.2 Preeklampside Patofizyolojik Mekanizmalar

Preeklampsinin nasıl geliştiği, hastalığı nelerin tetiklediği henüz tam olarak açıklanamamaktadır. Preeklampsi patofizyoloji mekanizmaları üzerine çalışmalar halen devam etmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda preeklampsinin plasenta ve plasenta oluşumuna bağlı olarak geliştiği üzerine yoğunlaşılmaktadır [43], [44].

Plasenta gebelikte fetüs gelişimini destekleme görevine sahip vazgeçilemez bir organdır [28]. Ancak preeklampsi durumunda trofoblast hücrelerinin yetersiz invazyonu nedeniyle plasenta gelişimi tam olarak sağlanamamaktadır [10].

Yapılan çalışmalar sonucunda preeklampsi patogenezinde temel olarak iki mekanizma ele alınmaktadır. Anormal plasentasyon ve anormal plasentadan salınan bazı faktörlerin neden olduğu yaygın endotel disfonksiyonudur [10]. Genetik, demografik ve çevresel risk faktörlerinin uteroplasental (rahim ve plasenta ile ilgili) immünolojik uyumsuzluğu tetiklediği ve plasenta gelişimini bozduğu bilinmektedir. Bunun sonucunda anormal plasentadan salınan antianjiyogenik faktörler (damar oluşumunu engelleyen dolaşımda bulunan faktörler), oksidatif stres molekülleri maternal endotel dokuda fonksiyon kaybına yol açmaktadır [45]. Preeklampsi patofizyolojisine dair mekanizmaları özetleyen diyagram Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



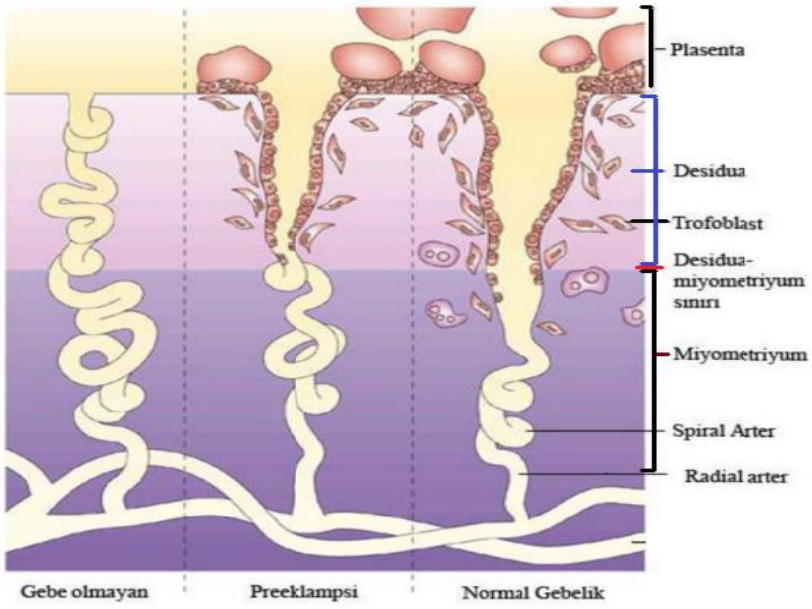

**Şekil 2.4** Preeklampside patofizyolojik mekanizmalar

#### 2.2.2.1 Anormal Plasenta Oluşumu

Plasenta preeklampsinin patogenezinde merkezi organ olarak kabul edilmektedir. Plasentanın çıkarılması ile hastalık ortadan kalkmaktadır [46]. Şiddetli preeklampsili kadınlardan alınan plasentaların patolojik incelemesi, enfarktlar, aterozis, tromboz ve kronik inflamasyon dahil olmak üzere çeşitli anormallikleri ortaya koymaktadır [47]. Preeklamptik plasentada görülen bazı anormalliklerin maternal hipertansiyona ve endotel hasarına sebep olduğu gösterilmiştir [10].

Normal plasenta oluşumunda endometriuma bağlanan blastosist myometriuma uzanarak plasenta gelişimini başlatmaktadır. Plasenta gelişimi, sitotrofoblastların invazyonu ile gerçekleşmektedir [48]. İnvazyon sonrası sitotrofoblastlar, maternal desidual arterlerin düz kas ve endotel tabakalarında bulunur. Sitotrofoblastlar, spiral arterleri invaze ederek gelişmekte olan fetüse besin sağlamak için yeterli plasenta perfüzyonu sağlayabilen büyük damarlara dönüşürler [49]. Ayrıca trofoblast ve maternal hücrelerin etkileşime girdiği yerdeki hücrelerin %40'ını immün sistem hücreleri oluşturmaktadır. Bu hücrelerin %10'unu T hücreleri, %20'sini makrofajlar, %2'sini dentrik hücreler, kalanını da desidual Natural Killer (dNK) hücreler oluşturmaktadır. Bu bağışıklık hücreleri trofoblast invazyonu ve spiral arterin yeniden şekillenmesini destekleme görevine sahiptir [48].

Preeklamptik durumda ise bu süreç anormaldir. Sitotrofoblastların invazyonu tamamlanmamıştır, sitotrofoblast hücreleri sadece desiduanın yüzeysel katmanlarında bulunmaktadır. Bunun sonucunda spiral arter yapısal değişikliği gerçekleşmediği için spiral arter çapı genişlemez ve yüksek dirençli damar yapısı oluşur [12]. (Şekil 2.5) Bir çalışmada preeklamptik gebelerden elde edilen plasenta yatak biyopsilerinde spiral arter yeniden modellemesinin gerçekleşmediği gösterilmektedir. Ayrıca spiral arter duvarında trofoblastik invazyon yetersizliği, spiral arter yapısında kalınlaşma, lümen içerisinde tromboz ve ateroz oluşumu gözlenmektedir [12]. Preeklampside yetersiz trofoblast invazyonu ve uygun olmayan spiral arter yeniden şekillenmesine bağlı gerçekleşen plasental iskemi, preeklamptik durumda tipik olarak görülen immün dengesizliğe katkıda bulunur [13].




**Şekil 2.5** Normal ve preeklamptik durumda trofoblast invazyonu [50]

Ayrıca uteroplasental perfüzyon basıncı azalmış olan (RUPP) farelerde yapılan çalışma sonucunda plasentanın yeterli oksijeni alamadığı ve bunun sonucunda plasental iskemi/hipoksi geliştiği gösterilmektedir [51]. Plasental iskemi, biyoaktif faktörlerin maternal dolaşıma salınmasını teşvik ederek, antianjiyojenik çözünür fms benzeri tirozin kinaz-1 ile çözünür endoglin ve proanjiyojenik vasküler endotelyal büyüme faktörü, plasental büyüme faktörü ve dönüştürücü büyüme faktörü-β arasında bir dengesizliğe neden olur [13]. Plasental iskemi ayrıca

proinflamatuar sitokinlerin, hipoksi ile indüklenebilir faktörün (HIF), reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve anjiyotensin tip 1 reseptör agonistik otoantikorlarının (AT1-AA) salınımını uyarır. Bu dolaşımdaki faktörler vasküler endoteli hedef alarak sistemik, renal, serebral ve hepatik damarlarda genel endotelyoza neden olarak nitrik oksit, prostasiklin ve hiperpolarizasyon faktörü gibi endotel kaynaklı vazodilatörlerde azalmaya ve endotelin-1 (ET-1) ve tromboksan A2 (TXA2) gibi vazokonstriktörlerde artışa yol açar [45].

#### 2.2.2.2 Anjiyogenik-Antianjiyogenik Faktörlerde Dengesizlik

Anjiyogenik faktörler preeklampsi gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Plasentada iyi gelişmiş bir vaskülogenez ve anjiyogenez fetüsün uygun gelişimi için bir ön koşuldur. Gebeliğin ilk haftalarında meydana gelen vaskülogenez, mezenkimal öncü hücrelerinin mezodermden köken alan, kan damarlarının oluşumunu sağlayan embriyonik hücre olarak bilinen hemangiyoblast endotel öncüllere dönüşümünün gerçekleştiği aşamadır. Plasentada yeni kan damarlarının oluşumu bu hücrelerin farklılaşmasından kaynaklanmaktadır [52]. Vaskülogenezi, gebeliğin 21. gününde başlayan anjiyogenez takip etmektedir. Anjiyogenez, önceden var olan damarlardan yeni damarların oluşmasıdır. Plasenta, maternal desidua ve makrofajların trofoblastlarında eksprese edilen çözünür anjiyogenik faktörler, plasentanın koryonik villusunda kılcal oluşumunu uyararak villus kılcal yataklarının gelişimini sağlamaktadır [53].

Anjiyogenik faktörlerdeki değişiklikler damar sistemini etkilemektedir. Çok sayıda çalışma, preeklamptik durumda anjiyogenik dengesizliği desteklemektedir [6], [54]. Preeklampside anjiyogenik ve antianjiyogenik proteinlerin dolaşımdaki seviyesinin değişmesinin endotel disfonksiyonuna sebep olduğu gösterilmiştir [54].

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), plasental büyüme faktörü (PIGF), endoglin, TGF-β ve anjiyopoietinler yaygın damar ağının gelişimi ile ilişkili bazı anjiyogenik faktörlerdir [6].

VEGF-A, VEGF ailesine dahil olan en güçlü endotelyal büyüme faktörüdür. Anjiyogenezi ve endotel hücre proliferasyonunu uyarır ayrıca vaskülogenezde temel rol oynar. Endotel hücrelerinde VEGF, sitozolik serbest $Ca^{++}$

konsantrasyonunu ([$Ca^{++}$]c), endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) aktivitesini ve prostasiklin (PGI2) seviyesini arttırır [55]. Etkilerini esas olarak VEGFR-1/fms benzeri tirozin kinaz-1 (Flt-1) ve kinaz alanı bölgesi (KDR)/VEGFR-2/Flk olmak üzere iki reseptör aracılığıyla gösterir [46]. VEGF reseptörü ve izoformlarının ekspresyonu ve işlevindeki herhangi bir değişiklik, endotel üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olacaktır [10].

Preeklampsi üzerine yapılan çalışmalar sonucunda preeklamptik gebelerde dolaşımdaki serbest VEGF düzeyinin azaldığı bildirilmektedir [56], [57], [58]. VEGF seviyesindeki bir azalma, PE'de glomerüler endotelyozise ve proteinüriye sebep olabilmektedir. VEGF, endotelyal hücre sağlığını koruyan glomerüler hücreler tarafından yapısal olarak sentezlenmektedir [59]. Böbrek podositlerinde bir VEGF aleli bulunmayan fareler, PE'dekine benzer bir böbrek patolojisi geliştirmektedir. Önemli olarak, VEGF infüzyonunun sıçanlarda renal lezyonları iyileştirmesi preeklampside görülen anjiyogenik faktörlerin potansiyel yararlarını ortaya koymaktadır [60].

PlGF plasenta tarafından salgılanan VEGF'nin anjiyojenik etkilerini artıran bir başka anjiyogenik faktördür. PlGF, maternal dolaşım ile doğrudan temas halinde olan plasentanın sinsityotrofoblast tabakasında eksprese edilir. PlGF de VEGF gibi VEGFR-1'e bağlanarak plasentada vaskülogenezi ve anjiyogenezi indükler. Hem VEGFR-1'e hem de VEGFR-2'ye bağlanan VEGF-A'nın aksine, PlGF VEGFR-2'ye bağlanamaz [54]. PlGF, VEGFR-1 için VEGF'nin afinitesinin sadece onda birine sahiptir, ancak seviyeleri normal hamilelik sırasında VEGF'ninkinden ~40 kat daha yüksektir. Plazma PlGF seviyeleri normal gebelikte 21 ve 22. haftalardan itibaren belirgin şekilde yükselmeye başlamaktadır [61].

PE çalışmaları kapsamında dolaşımdaki PlGF seviyesinin azaldığı gösterilmektedir [61]. Gebeliğin 21-32. haftalarındaki maternal serum PlGF seviyeleri erken başlangıçlı PE'de, geç başlangıçlı PE'ye göre daha düşüktür. PlGF seviyesindeki bu azalma, klinik belirtiler ortaya çıkmadan hastalığın ilerlemeye başladığının bir göstergesidir. Çalışma sonucunda PlGF'nin birkaç hafta önce ortaya çıkması preeklampsi erken teşhisinde bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir [46]. PIGF aynı zamanda endotelyal hücre büyümesini, plasental

vaskülogenezi ve uterus damarlarının vazodilatasyonunu desteklemektedir. PlGF seviyelerindeki azalma, PE'deki vazodilatör tepkilerini azaltabilmektedir [15].

sFLT1 (sVEGFR1), hem transmembran hem de sitoplazmik alanları içermeyen, VEGFR-1'in çözünür ve endojen formu olarak salgılanan, alternatif uçbirleştirme ile üretilen bir antianjiyogenik faktördür [10], [45]. sFlt-1'in preeklamptik deneklerde anlamlı olarak yükseldiği bildirilmektedir [62]. Preeklampsi durumunda serumda artış gösteren sFlt1 (çözünür fms benzeri tirozin kinaz 1) PlGF ve VEGF'yi kendine bağlamaktadır. Böylece sFLT1 VEGF/PlGF-reseptör etkileşimini engelleyerek normal sinyal yolunu bozan bir tuzak reseptör görevi görür [10]. Normal gebelerde sFlt-1 seviyeleri ~1.5 ng/mL'dir, büyük ölçüde sabit kalır ve 36. gebelik haftasından sonra bir artış gösterir [15]. Preeklamptik gebelerde ise sFlt-1, VEGF ve PlGF arasında dengesizlik gözlemlenmektedir [54]. Yapılan bir çalışmada preeklamptik plasentada VEGF/sFlt-1 ve PlGF/sFlt-1 oranında sırasıyla %53 ve %70 düşüş gözlemlenmiştir [63]. Yapılan bir çalışmada Flt-1/sFlt-1 geninin 13q12 kromozomunda yer aldığı ve trizomi 13 (Patau Sendromu) bozukluğunda bu genin fazladan bir kopyasının dolaşımda aşırı sFlt-1'e, azalan serbest PlGF seviyelerine, artmış sFlt-1/PlGF oranına ve PE'ye yol açabileceği öngörülmüştür [64]. Çalışmalar, erken ve geç PE'de dolaşımdaki sFlt-1 düzeylerinin normal bir gebeliğe göre daha yüksek olduğunu göstermektedir [65]. Serum sFlt-1 ayrıca daha önce PE'si olan kadınlarda (~0.5 ng/mL), önceki gebeliği normal olan kadınlardan (~0.3 ng/mL) daha yüksek seviyede bulunmakta ve artışlar doğumdan 6 ay sonra bile tespit edilebilmektedir [37]. Ayrıca plasental iskemi/hipoksi, sFlt-1 üretimini tetikleyebilmektedir. Plasental hipoksi sırasında HIF-1 (Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör 1) *flt-1* geninin promotör bölgesine bağlanır ve sFlt-1'in yukarı doğru düzenlenmesine yol açmaktadır [56]. sFlt-1'in bir ek varyantı ve plasenta tarafından salınan en bol form olan sFlt-1 e15a, VEGF'yi bağlar ve sırayla endotel hücre göçünü, istilasını ve tüp oluşumunu azaltır. sFlt-1 e15a sinsityotrofoblastlarda eksprese edilir ve serum seviyeleri PE'de normal hamile kadınlara göre 10 kat daha yüksektir [43].

Maternal dolaşımdaki sFlt-1/PlGF oranı, ikinci trimesterden itibaren preeklamptik gebelerde normal gebe kadınlardan daha yüksektir ve erken PE'nin bir göstergesi

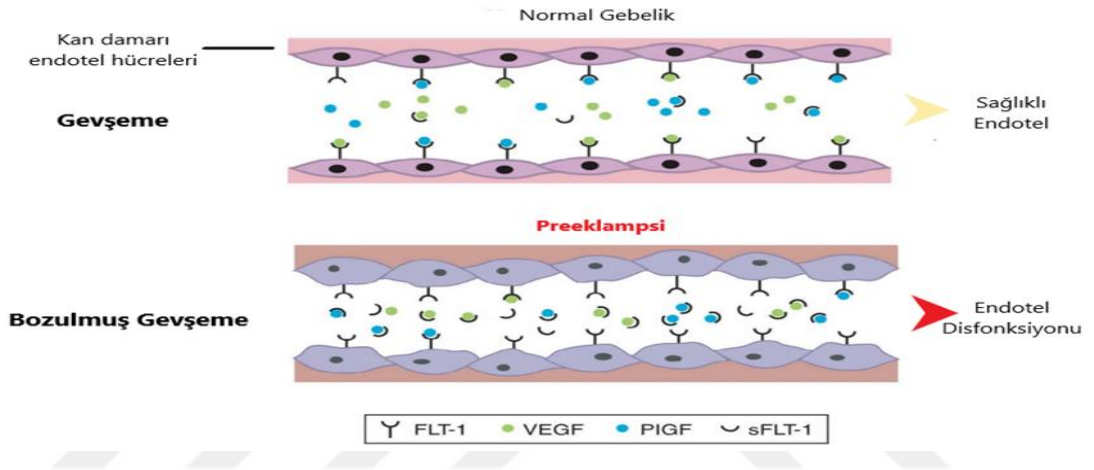
olarak kullanılabilmektedir [65]. PE'de dolaşımdaki sFlt-1 seviyeleri, klinik semptomların başlamasından bir aydan daha uzun bir süre önce yükselmekte ve ilk trimesterin sonundan itibaren PE gelişen kadınlarda PlGF seviyesi ise azalmaktadır [46].

Yapılan bir çalışma sFlt-1 seviyelerinin ve sFlt-1/PlGF oranını (muhtemelen) ikiz gebeliklerdeki daha büyük plasenta kütlesi nedeniyle ikizlerde tekil gebeliklerden daha yüksek olduğunu göstermektedir. İkiz ve tekil gebeliklerde sFlt-1 ve sFlt-1/PlGF oranındaki orantılı artışlar, plasentanın bu faktörlerin ana kaynağı olduğu fikrini desteklemektedir [39]. PE hastalarından dolaşımdaki sFlt-1'in uzaklaştırılması, sFlt-1/PlGF oranını düşürür, semptomları iyileştirir ve gebeliği uzatır ayrıca sFlt-1'in PE'deki rolünü destekler [66]. Bir diğer çalışmada farelere sFlt-1 enjekte edildiğinde, farelerin önemli hipertansiyon ve proteinüri geliştirdiği gözlenmektedir [67].

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise PE'de sFlt-1'in salınımını düzenleyen yukarı akış mekanizmaları olarak anahtar hayatta kalma yolakları, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) sinyali ve mitokondrinin rolleri araştırılmıştır. Çalışma, normotansif kontrollere göre PE plasenta dokusunda EGFR mRNA ve protein ekspresyonun arttığını göstermektedir. siRNA veya küçük molekül inhibitörleri kullanılarak EGFR sinyalleme kaskadı inhibe edilerek birincil sitotrofoblastlardan sFlt-1 salınımı azaltılmaktadır. Bu veriler EGFR'nin PE'de aşırı aktif görünen ve plasental sFlt-1 sekresyonunun düzenlenmesinde kilit rol oynayan hayatta kalma yolu olarak göstermektedir [68].

Preeklampside yer aldığı tespit edilen bir diğer önemli antianjiyogenik faktör çözünür endoglin (sEng)'dir. CD105 olarak da adlandırılan endoglin, TGF-β1 ve TGF-β3 ile zara bağlanan bir proteindir. Bu protein sinsityotrofoblastlarda, çoğalan endotel hücrelerinde, hematopoietik kök hücrelerde ve stromal hücrelerde önemli ölçüde bulunur [69]. sEng, TGF-β1'i bağlayan ve onun doğal reseptörüne bağlanmasını önleyen, böylece postreseptör vazodilatörünü ve anjiyogenik etkilerini önleyen bir antianjiyogenik proteindir [70]. PE'de sEng, 18. haftadan itibaren normotansif gebelere göre daha yüksektir ve gebelik yaşı ile birlikte artmaya devam eder. Plasental endoglin, PE başlangıcından 2-3 ay önce

artarak maternal dolaşıma salınır. RUPP sıçanlarında sEng düzeyi PE benzeri semptomların şiddeti ile artmakta ve doğumdan sonra azalmaktadır [51]. Son yıllarda yapılan çalışmalar dolaşımda bulunan sFlt-1'in ve sEng'in VEGF, PlGF ve TGF-β gibi anjiyogenik faktörlerin etkisini bloke ettiğini göstermektedir. Bu nedenle plasental gelişim sırasında anjiyogenik faktör ekspresyonunun uteroplasental dolaşım ve embriyonik gelişim için gerekli olduğu mevcut kanıtlardan açıkça anlaşılmaktadır [10]. Normotansif ve preeklamptik gebelere ait plasentadan maternal dolaşıma salınan biyoaktif faktörlerin karşılaştırılması Şekil 2.6'da gösterilmiştir.




**Şekil 2.6** Normotansif ve preeklamptik plasentadan salınan faktörler [52]

### 2.2.2.3 İmmünolojik Uyumsuzluk

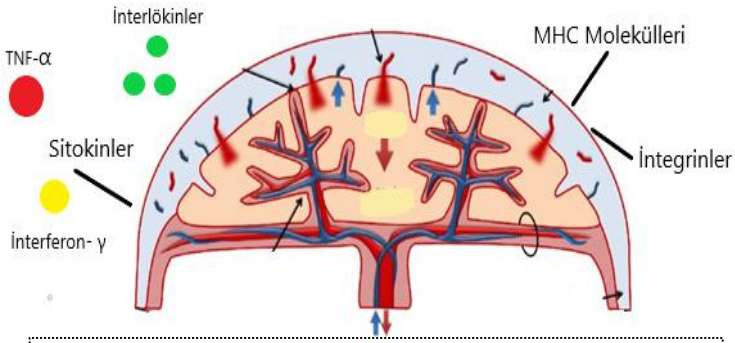
Normal bir plasental yapıda, maternal immün sistem hücreleri ile trofoblast hücreleri desiduada etkileşim içinde yer almaktadır [71]. Normal hamilelik sırasında, doğuştan gelen bağışıklık artmaktadır. Monositler ve granülositler gibi doğuştan gelen bağışıklık hücreleri artarken, NK hücreleri ve dendritik hücreler azalmaktadır. Preeklampsi esnasında ise meydana gelen plasental hipoksi maternal immün yanıtın değişmesine sebep olmaktadır. Böylece PE'de NK hücrelerin ve dendritik hücrelerin üretiminde bir artış gözlenmektedir. Bu durum, otoimmün hastalıklarda görülenlere benzer inflamatuar yolakları başlatmaktadır [72]. Artan dNK'ler IFN-γ, TNF-α ve IL-1, 2, 6, 8, 15, 16 ve 18 gibi proinflamatuar sitokinlerin önemli ölçüde yükselmesine sebep olmaktadır [73]. Vasküler endotelde de TNF-α ve IL-6, endotel disfonksiyonuna katkıda bulunur ve adezyon moleküllerinin artan üretimi ile karakterize edilmektedir. TNF-α ayrıca endotel

hücrelerini aktive eder ve önemli ölçüde güçlü vazokonstriktör endotelin-1 artışına sebep olmaktadır [74]. (Şekil 2.7)

İnsan trofoblast hücreleri major doku uygunluk kompleksi (major histocompatibility complex, MHC) sınıf-I antijenlerinden İnsan Lökosit Antijeni (HLA)-A, -B eksprese etmezken HLA-C, -E, -G ve -F eksprese etmektedir [48]. HLA-G, preeklampsi ile ilgili araştırmaların artan bir odak noktasıdır. HLA-G molekülü esas olarak diğer iki HLA sınıf Ib molekülü olan HLA-E ve HLA-F ile birlikte plasentayı kaplayan ekstravillöz trofoblast hücreleri tarafından eksprese edilmektedir. HLA-G reseptörleri de NK hücreleri, T hücreleri, monositler ve makrofajlar gibi desidual bağışıklık popülasyonlarında eksprese edilmektedir [75]. HLA-G gebelik sırasında vasküler yeniden şekillenme bağlamında bağışıklık tepkilerini modüle etmede görev almaktadır [47].

Ayrıca Th-1 (T helper-1) ve Th-2 oranlarındaki değişikliklerin de PE patofizyolojisinin gelişmesine neden olduğu saptanmıştır. Bu yardımcı T hücreleri immün sistemi düzenleyerek çeşitli sitokinlerin salınımını gerçekleştirmektedir. Th-1 hücreleri IL-2, TNF- α ve İnterferon-γ gibi savunmada görev alan sitokinleri salgılamaktadır [76]. Preeklamptik gebelerde Th-1 aktivasyonu artmakta, proenflamatuar sitokinlerin salınması ile hücresel immün yanıt oluşmaktadır. Bunun sonucunda sitotoksik T hücreleri ve NK hücreleri aktive olmaktadır [77].

Bir çalışmada Toll-Like Reseptör-4'ün (TLR-4) preeklampsi ve HELLP (hemoliz, artan karaciğer enzimleri, düşük platelet) sendromu ile ilişkili olduğu gösterilmektedir [78].



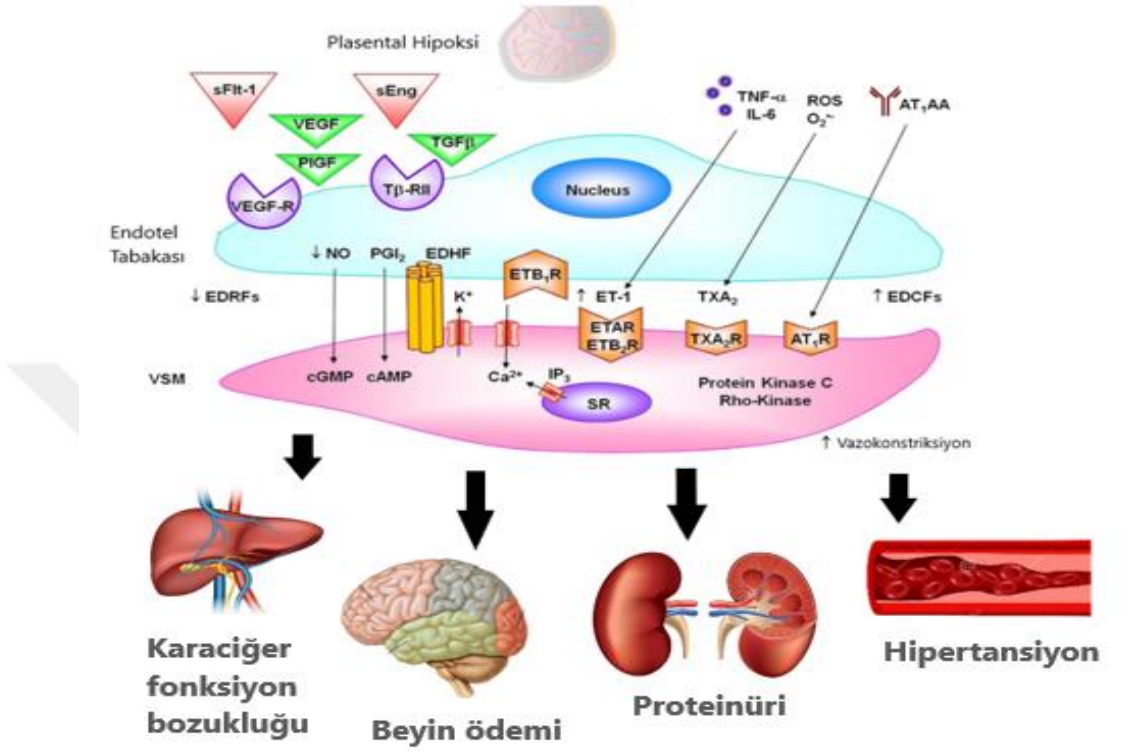

**Şekil 2.7** Anormal plasentadan salınan immünolojik faktörler

#### 2.2.2.4 Endotel Disfonksiyonu

Preeklampsinin klinik bulgularına dair bir diğer mekanizma ise endotel disfonksiyonudur. Endotel hücreleri kan akışını düzenler, bazal vazomotor tonusu ayarlar. Bu işlev, vazodilatasyon için nitrik oksit (NO), vazokonstrüksiyon için ise Platelet Aktive Edici Faktör (PAF) ve endotelin (ET) gibi faktörlerin endotel hücrelerinden salınımı ile yapılır. Preeklampside gelişen endotelyal vasküler tonus kaybı sonucu hipertansiyon, endotelin vasküler geçirgenliğinin artması sonucu proteinüri ve ödem, anormal endotelyal prokoagülanların salınımı sonucu ise koagülopati gelişir. Aynı şekilde beyin, karaciğer, böbrek ve plasenta gibi hedef organdaki endotel disfonksiyonu sonucunda baş ağrısı, görme problemleri, epigastrik ağrı gelişmektedir. Bu endotelyal hücre hasarı plasental hipoksi/ iskemi veya herhangi bir uyarıya bağlı olarak salgılanan faktörlere yanıt olarak başlar [79]. Normal gebelik sırasında plasenta, plasentadaki artan mitokondriyal aktivite nedeniyle aşırı reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine yol açan bir oksidatif stres durumuna maruz kalmaktadır. Bununla birlikte preeklampsi sırasında, anormal yerleşim nedeniyle bu etki artış göstermektedir. Birkaç çalışma, normal gebe kadınlara kıyasla preeklamptik kadınlarda yüksek seviyelerde lipid peroksit bildirmiştir [80], [81]. Preeklamptik kadınlarda C, A ve E vitaminleri, glutatyon seviyeleri ve demir bağlama kapasitesi gibi bazı temel antioksidanlar azalırken preeklamptik plasentada, özellikle kan damarı içinde ve çevresinde ROS'un arttığı bulunmuştur [13]. Bu stres molekülleri de enflamasyonu tetikler. Sitokinlerin aşırı salınımı özellikle TNF-α'nın ve interlökinlere bağlı NO'nun üretimini azaltır ve buna bağlı olarak prostaglandin dengesizliği oluşur [13], [79]. Şekil 2.8'de biyoaktif moleküllerinin sebep olduğu maternal endotel disfonksiyonu sonucunda etkilenen sistemler gösterilmiştir.

Preeklampside anormal plasental gelişim sonucunda ortaya çıkan hipoksik ortamın, plasentadan maternal dolaşıma salınan ve endotelyal disfonksiyona neden olan bazı anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörlerin de salınımına sebep olduğu da düşünülmektedir [13]. Preeklampsi gelişecek gebelerin trofoblastik dokularında, maternal dolaşıma giren en az iki anti-anjiogenik faktörün (sFlt-1 ve sEng) aşırı üretildiği tespit edilmiştir. Maternal serumda sFlt-1 düzeylerindeki artış dolaşımdaki serbest PlGF ve VEGF etkisiz hale getirerek endotel fonksiyon

bozukluğuna yol açar [6], [62]. sEng ise TGF-ß (Transforming Growth Factor Beta)'yı bloke eder ve NO bağımlı vazodilatasyonu azaltır. Her iki faktör de preeklampsi gelişiminden aylar önce artış gösterir. Maternal dolaşımda artarken, fetal dolaşımda ve amniyon sıvısında artmazlar [70].




**Şekil 2.8** Endotelyal disfonksiyon [45]

### 2.2.3 Preeklampsi ile İlişkili Genler

Preeklampsi ile ilişkili genlerin belirlenmesinin preeklampsi öngörüsünü önemli ölçüde kolaylaştıracağı düşünülmektedir. PE, gebeliğin geç döneminde ortaya çıktığı için hastalığı erken dönemde keşfetmek tedavide büyük kolaylık sağlayacaktır [10]. Multifaktöriyel bir hastalık olan preeklampsinin oluşumuna fetal ve maternal genlerin neden olduğu yapılan çalışmalar sayesinde aydınlatılmaya çalışılmaktadır.

Transkriptom profilleme çalışmaları hastalık durumunda diferansiyel eksprese olan genleri belirlemek için yapılmaktadır. Preeklampsili hastalar üzerinde yapılan bir transkriptom analiz çalışmasında plasental ya da ilişkili dokulardan alınan örneklerden yapılan transkriptom analizleri sonucunda diferansiyel ekspresyonu saptanan genler Tablo 2.4'te özetlenmiştir.

**Tablo 2.4** Preeklampside diferansiyel eksprese edilen genler

| Örnek | Yöntem | DEGs sayısı | Yukarı Düzenlenen Genler | Aşağı Düzenlenen Genler | Ref. |
|---|---|---|---|---|---|
| Plasenta | RNA seq | 53 (32↑ 21↓) | *BHLHE40, FSTL3, HK2, *HTRA4, *LEP, PVRL4, SASH1, SIGLEC6, TET3* | **LGALS14, FCGR3A, *DEFA1, *DEFA1B, CXCL9, KRT6A* | [82] |
| Plasenta | RNAseq qPCR* | 225 (215↑ 10↓) | *LEP*, FLT1*, HEXB, TREM1, TET3** | **HSD17B1, *GRAMD1A, *STX1B* | [21] |
| Desidua bazalis | Mikroarray qPCR* | 455 | *ATP2A2, FKBP2, HMOX1, *PLA2G7 *MAN1A, *ARL5B, ATF6, EIF2AK3, XBP1* | *DTX3, *SLITRK4, *FZD4, *ANGPTL2, HES1, NOTCH 3, NOTCH 4* | [83] |

*RNAseq veya Mikroarray analizi sonucunda diferansiyel eksprese edilen genlerin bazıları qPCR ile valide edilmiştir.

Kaartokallio ve ark. tarafından plasenta dokuları üzerinde yapılan RNAseq çalışmaları sonucunda 53 farklı eksprese edilen gen tanımlanmıştır. Çalışmada 20 preeklampsi ve 19 kontrol olmak üzere toplamda 39 örnekten total RNA izolasyonu yapılmıştır. Yapılan çalışma ile daha önceki mikroarray çalışmalarında ekspresyonu gözlenen *HTRA4* (high temperature requirement factor A4), *LEP* (Leptin), *SASH1* (SAM (steril alfa motif) ve SH3 1), *PLIN2* (perilipin 2), *BHLHE40* (Basit heliks-loop-heliks aile üyesi e40), *SIGLEC6* (Sialik asit immünoglobulin benzeri lektin 6) ve *LGALS14* (Galektin 14) genlerinin ortak olduğu saptanmıştır. Ayrıca *HTRA4, LEP, SASH1, PLIN2* ve *LGALS14* ekspresyon seviyeleri qPCR ile valide edilmiştir. *HTRA4, LEP, SASH1, PLIN2, BHLHE40* ve *SIGLEC6* genlerinin ifadesinin yüksek olduğu; *LGALS14* geninin ise ifadesinin düşük olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışma kapsamında daha önceki çalışmalarda preeklampsi ile bağlantısı gösterilmemiş olan veya tek bir çalışmada gösterilen 19 gen saptanmıştır [82].

PE'deki aday genlerin ve yolakların daha yakın tarihli bir incelemesinde ise normal plasentaya kıyasla PE plasentasında 228'i yukarı regüle ve 22'si aşağı regüle edilmiş olan üç profil veri setinden 250 farklı şekilde eksprese edilmiş gen tanımlanmıştır. Çalışma sonucunda *LEP*, *NRIP1*, *SASH1* ve *ZADHHC8P1* genleri *PE'de* aday genler olarak belirlenmiştir [84].

Preeklampsinin patofizyolojisini aydınlatmak üzere yapılan transkriptom analiz çalışmalarında plasenta dokusunun yanı sıra plasental yataktan alınan desidua bazalis, maternal plasma, kordon kanı, kordon dokusu ve kordon kökenli mezenkimal kök hücreler de kullanılmaktadır [23], [85]. Olaya ve ark. tarafından preeklampside plasenta ve kordon dokusundaki VEGF gen ailesi ekspresyonlarının paralel olduğu üzerine bir hipotez kurulmuştur. Çalışmada hipertansiyon, kordon anomalitesi, her ikisi görülen ve kontrol olmak üzere dört farklı gruptan doku incelenmiştir. Sonuç olarak, ilginç bir şekilde plasenta ve kordon dokusunda sFLT1 ve VEGF gen ekspresyonlarının anlamlı bir fark saptanmıştır. Plasentada sFLT1 ekspresyonunun yükselmesine karşılık kordon dokusunda gen ekspresyonu azalmıştır [58]. Yapılan bir çalışmada preeklamptik gebelerden alınan plasental yatak dokularında ifadesi değişen 455 gen saptanmıştır. Plasental yatak dokusunda bulunan desidua bazalis bölgesi plasentanın maternal kısmını oluşturmaktadır. Çalışma sonucunda plasental yatak dokusunda hem yeni (*ARL5B*, *SLITRK4*) hem de önceden rapor edilmiş preeklampsi ile ilişkili genler (*PLA2G7*, *HMOX1*) tanımlanmıştır [83].

Günümüzde yapılan çalışmalarda protein kodlayan mRNA'lar yerine gen regülasyonunda yapısal rollere veya önemli işlevlere sahip olan çok çeşitli kodlamayan RNA'ların kullanıldığı da bilinmektedir. Kodlamayan RNA sınıfına ait miRNA (mikro RNA), yaygın bir şekilde kullanılan en önemli transkript olarak bilinmektedir [16]. miRNA'lar, çeşitli hastalıklar için tanı veya prognostik belirteçler olarak miRNA olasılığını sağlayan serum, plazma ve idrar gibi hücre dışı sıvılarda ise oldukça kararlı bir karakter sergileyen kodlamayan RNA (ncRNA) sınıfına aittir [20]. Kodlamayan RNA, protein translasyonu yapmayan bir RNA sınıfını ifade etmektedir. Dizinin uzunluğuna göre uzun (200 nükleotitten fazla) ve küçük (200 nükleotitten az) kodlamayan RNA olarak ikiye ayrılmaktadır. Bunlar arasında ~22 nükleotidden oluşan küçük tek zincirli moleküller miRNA

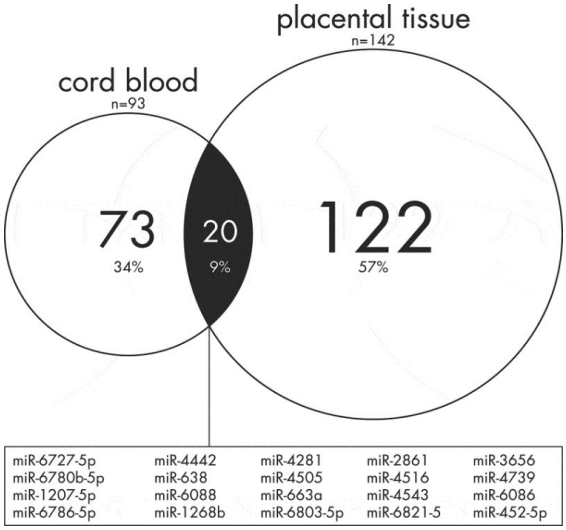
olarak tanımlanmaktadır [86]. Birçok olgun miRNA'nın dizileri, farklı organizmaların evriminde yüksek oranda korunmaktadır [87]. Bu nedenle miRNA'lar uzun yarılanma ömrü ve yüksek stabilite ile karakterize edilmektedir. Ayrıca stabiliteleri mRNA'lardan 10 kat daha yüksektir [88].

Birçok patolojik koşulda post-transkripsiyonel düzeyde gen düzenlemesinde [89] son derece önemli olan miRNA'lar preeklampsi patofizyolojisinde de değerlendirilmektedir. Preeklampsi patofizyolojik mekanizmalarını ortaya çıkarmak için bugüne kadar yapılan miRNA analizleri sonucunda ifade edilen miRNA'lar ve o miRNA'ların hedeflediği gen/genler Tablo 2.5'te gösterilmiştir.

**Tablo 2.5** Preeklampsi ile ilişkili bazı miRNA'lar

| miRNA | Örnek Türü | Ekspresyon (Yukarı/Aşağı) | Hedef Gen | Kaynak |
|---|---|---|---|---|
| **miR-155-5p** | Plasenta | Yukarı | eNOS | [90] |
| **miR-182-5p** | Plasenta | Yukarı | RND3 | [91] |
| **miR-193b-3p** | Plasenta | Yukarı | TGF-β | [92] |
| **miR-126** | Plasenta | Aşağı | VEGF | [93] |
| **miR-483** | Plasenta/Kordon kanı | Aşağı | IGF1 | [94] |
| **miR-206** | Plasma | Yukarı | VEGF | [95] |
| **miR-29b** | Desidual kökenli MKH | Yukarı | VEGF | [96] |

İlk defa Tsamou ve ark. tarafından insan plasenta dokusunda yenidoğanın miRNA ekspresyonunun cinsiyete göre farkını ortaya çıkaran bir çalışma yapılmıştır. Şekil 2.9'da plasental doku ve kordon kanında ortak ifade edilen miRNA'lar gösterilmiştir [89].



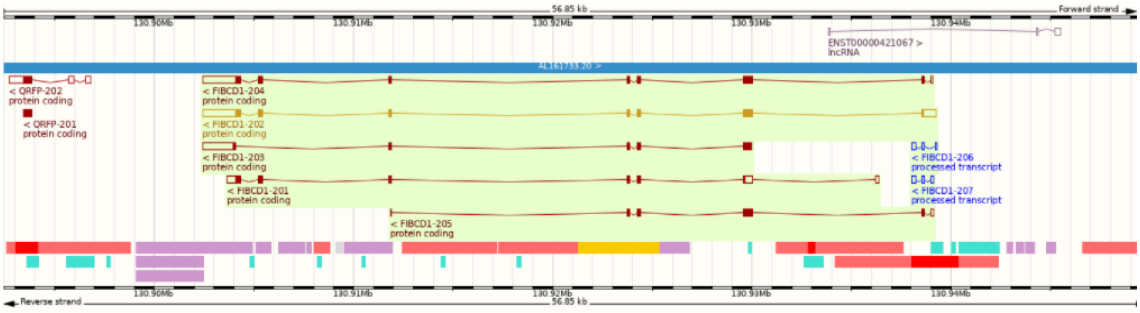

**Şekil 2.9** Plasentada cinsiyete özgü diferansiyel eksprese edilen miRNA'lar

Preeklampsi oluşumunda genetik faktörlerin önemli bir role sahip olduğu bilindiği için birçok çalışma gen polimorfizmlerine odaklanmaktadır. Genetik polimorfizm, bireyler, gruplar veya popülasyonlar arasındaki DNA dizisindeki farklılıklar olarak bilinmektedir. Kaynaklar, tek nükleotid polimorfizmlerini (SNP'ler), dizi tekrarlarını, eklemeleri, silmeleri ve rekombinasyonu içermektedir [97]. Ayoub ve ark. tarafından 80 PE ve 80 normal gebelerden alınan maternal kan kullanılarak mir-155rs767649 polimorfizminin preeklampsi ile ilişkisi ilk kez ortaya çıkarılmıştır [98]. Preeklampside gen polimorfizmlerini tespit etmek amacıyla Tarani ve ark. miRNA-196a2 ve miRNA-499 üzerine yoğunlaşmıştır. Çalışma sonucunda maternal kandan yapılan çalışmalarda miRNA-196a2 ile PE ilişkisi saptanamamıştır. Ancak plasental dokular üzerinde yapılan çalışamada miRNA-499'da gerçekleşen rs3746444 polimorfizmi PE yüksek riski ile ilişkilendirilmiştir [99]. Kathryn ve ark. preeklampsinin genetik mekanizmalarının daha iyi anlaşılması için yaptıkları çok etnikli gen merkezli meta analiz çalışmasında *PLEKHG1*'e ait intron bölgesinde yer alan bir SNP olan rs9478812'nin preeklamptik durumda anlamlı bir ekspresyon sergilediğini bildirmişlerdir [5]. *PLEKHG1* (Plekstrin Homoloji Domain G1), geniş bir doku yelpazesinde eksprese edilen bir Rho guanin nükleotid değişim faktör proteinini kodlayan 15 ekzonlu 232 kb uzunluğunda bir gendir [5]. *PLEKHG1* varyantları kan basıncı, vücut ağırlığı ve nörolojik bozuklukların genom analiz çalışmaları kapsamında incelenmiştir [100], [101].

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda kapalı dairesel RNA'ların (circRNA'ların) birçok hastalığın gelişimine katkıda da bulunduğu bildirilmektedir. circRNA'lar da tıpkı miRNA'lar gibi ncRNA sınıfında değerlendirilmektedir. Başlıklı 5' terminali ve poli(A) kuyruklu 3' terminali olmadığı için nükleik asit eksonükleazları tarafından bozunmaya karşı dirençlidirler. Bu özellikler, circRNA'ların miRNA için moleküler süngerler olarak hareket etme, gen transkripsiyonunu ve translasyonunu düzenleme ve RNA bağlayıcı proteinlere bağlanma gibi birçok biyolojik işlevi yerine getirmesini sağlamaktadır [102]. Özellikle son beş yılda circRNA'ların PE'nin patofizyolojisinin altında yatan potansiyel mekanizmalar hakkında yeni bilgiler sağlayabileceği savunulmaktadır. 2018'de Jiang ve ark. tarafından yapılan çalışma PE'li hastalarda semptomların başlangıcından önce circRNA profilini bildiren ilk çalışma olarak literatürde yer almaktadır. Çalışma sonucunda *PAPP-A* (Pregnancy-associated plasma protein A) ile birlikte hsa_circ_0004904 ve hsa_circ_0001855'in PE'nin tespiti için umut verici biyobelirteçler olabileceği öne sürülmektedir [4]. Ou ve ark. tarafından şiddetli PE'li hastaların plasental dokuları kullanılarak RNA sekanslama ile diferansiyel eksprese edilen 49 circRNA keşfedilmiştir ve ayrıca Real-Time PCR analizi ile hsa_circ_0001438, hsa_circ_0001326 ve hsa_circ_32340'ın yukarı regüle edilen ekspresyon doğrulanmıştır. Çalışmada ayrıca circRNA'lar ve miRNA'lar arasındaki etkileşimi belirlemek için Kyoto Gen Ansiklopedisi ve Genomik veritabanı kullanılmıştır. Çalışma sonucunda hsa_circ_0001438, hsa_circ_0001326 ve hsa_circ_32340 tarafından oluşturulan circRNA-miRNA-mRNA etkileşim ağının PE'nin patojenezinde rol oynayabileceğini birdirmişlerdir [103].

Tez çalışmasında kullanılacak olan genlere ait bilgiler ve PE ile ilişkileri şöyledir:

***FIBCD1* (fibrinogen C domain içeren 1),** kitin ve diğer asetillenmiş bileşikleri yüksek afinite ile bağlayan bir transmembran reseptörüdür. Von Huth ve ark. *FIBCD1* ekspresyon dağılımını tanımlamak amacıyla çeşitli insan dokuları üzerinde immünohistokimyasal boyama ve qPCR analizi yapmışlardır. *FIBCD1*'in göreceli ekspresyonu, 20 farklı insan dokusundan alınan RNA'da araştırılmıştır. Sonuç olarak *FIBCD1*'in en yüksek ifadesi testis, beyin (fetal beyin dahil), adrenal bez ve plasentada saptanmıştır [104]. *FIBCD1* genine ait şema Şekil 2.10'da, kromozomal lokasyon ise Şekil 2.11'de gösterilmiştir.




**Şekil 2.10** *FIBCD1* geninin şematik görüntüsü[1]

[1]İlgilenilen genlerin şematik görüntüleri ensembl.org internet adresinden alınmıştır [105].

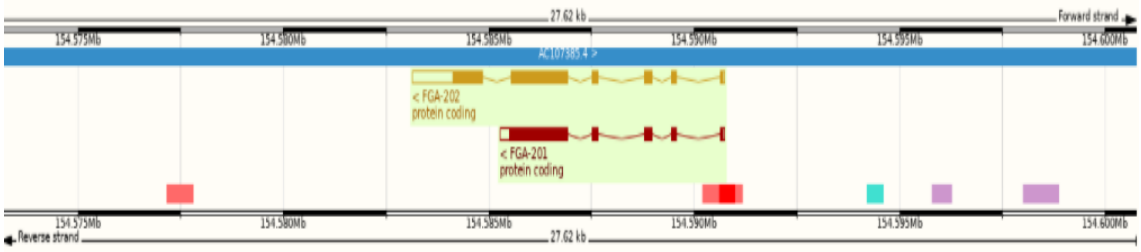



**Şekil 2.11** *FIBCD1* geninin kromozomal lokasyonu[2] (9q34.12)

[2]İlgilenilen genlere ait kromozomal lokasyonlar genecards.org adresinden alınmıştır [106].

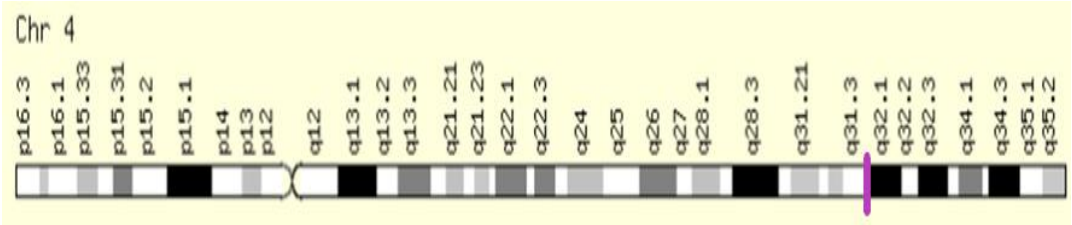
***FGA* (Fibrinogen Alfa Chain),** hücre adhezyonunda ve hücre-hücre etkileşimlerinde rol oynayan bir proteindir. Pıhtılaşmada platelet aktivasyonunu sağlayan önemli genlerden biridir [107]. Yapılan araştırmalar sonucunda birçok gen polimorfizminin PE etiyolojisinin gelişmesini tetiklediği saptanmaktadır. PE gelişiminde ana rol oynayan genler *FLT1, VEGFA ve FGA* (fibrinogen alpha chain) olarak belirlenmiştir [108]. 2021 Nisan ayında Timofeeva ve ark. tarafından preeklampsi ve IUGR arasındaki moleküler benzerlikleri saptayabilmek için plasenta ve plasental yatak dokularında protein kütle spektrometresi, miRNA

sekanslama ile ekspresyon analizi yapılmıştır. Transkriptom analizinde *FGA* geninin PE ve IUGR durumunda mRNA ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Ancak aynı zamanda miR-654-3p ve *FGA* ekspresyon seviyelerinin oranındaki azalmanın, PE gruplarında IUGR kontrol grubuna göre daha belirgin olduğu bildirilmiştir. Örneklerdeki transkriptom ve proteomik profillerin karşılaştırılması sonucunda PE'nin plasentada IUGR'nin plasenta yatağında meydana gelen moleküler değişiklikleri gösterilmiştir. Sonuç olarak *FGA* geninin plasenta dokusunda yukarı regüle edilirken plasental yatak dokularında aşağı regüle edildiği saptanmıştır [107]. *FGA* geninin şematik görüntüsü Şekil 2.12'de, kromozomal lokasyonu Şekil 2.13'te gösterilmiştir.




**Şekil 2.12** *FGA* geninin şematik görüntüsü[1]

[1]İlgilenilen genlerin şematik görüntüleri ensembl.org internet adresinden alınmıştır [105].

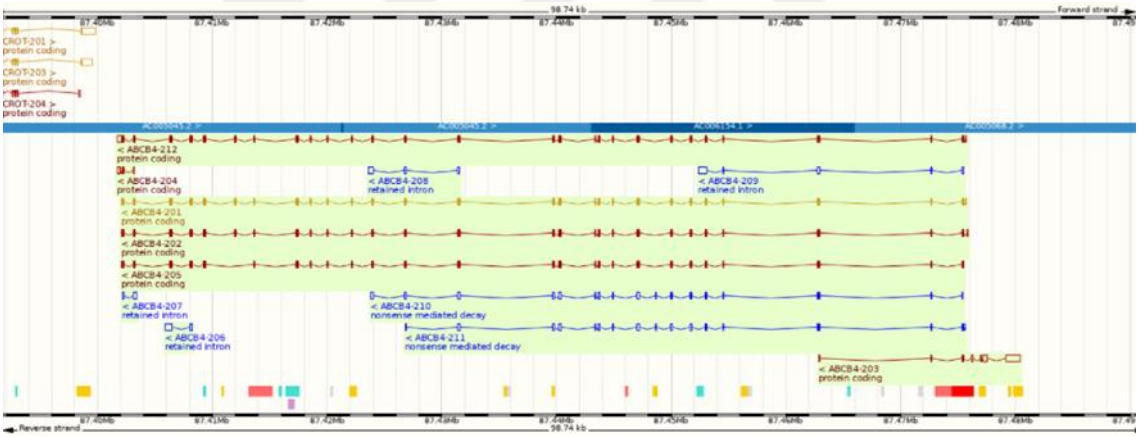



**Şekil 2.13** *FGA* geninin kromozomal lokasyonu[2] (4q31.3)

[2]İlgilenilen genlere ait kromozomal lokasyonlar genecards.org internet sitesinden alınmıştır [106].

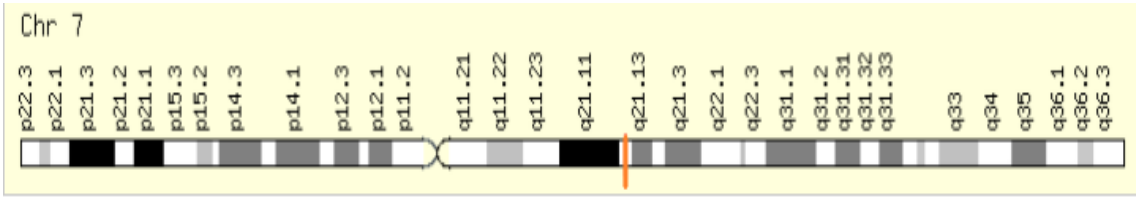
***ABCB4* (ATP bağlayıcı kaset alt ailesi B üyesi 4)** geni tarafından kodlanan zarla ilişkili protein, ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcılarının üst ailesinin bir üyesidir. ABC proteinleri, çeşitli molekülleri hücre dışı ve hücre içi zarlar boyunca taşır. Bu protein, MDR/TAP alt ailesinin bir üyesidir. MDR/TAP alt ailesinin üyeleri, antijen sunumunun yanı sıra çoklu ilaç direncinde rol oynar. Bu gen, tam bir taşıyıcıyı ve substratı olarak fosfatidilkolin içeren membran proteinlerinin p-glikoprotein ailesinin bir üyesini kodlar [109]. İlk defa Bacq ve ark. İntrahepatik Gebelik Kolestazı (ICP) gösteren kadınlarda *ABCB4* gen mutasyonlarının saptanabileceğini

ve bu genin bu bozukluğun patogenezinde rol oynadığını göstermişlerdir. Sunmuş oldukları hipotezde *ABCB4* gen ekspresyonunu veya safra akışını düzenleyen ve dişi cinsiyet hormonlarına bağlı olan diğer genlerdeki kusurların gelecekte keşfedilmesi ve bu karmaşık karaciğer hastalığının anlaşılması üzerine daha çok çalışmalar yapılması gerektiğini belirtmişlerdir [110]. Lammert ve ark. tarafından yapılan yakın zamanlı bir araştırmada ise ICP'li hastalardan alınan toplam safra asit örnekleri kullanılarak populasyon araştırması yapılmıştır. Araştırma sonucunda ABC protein ailesine ait olan *ABCB11, ATP8B1* ve *ABCB4* gibi birkaç ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı genindeki varyantlar ICP'li hastalarda tanımlanmıştır [111]. Preeklampsi, ICP, HELLP sendromu ve akut karaciğer yağlanması da gebelikte görülen hepatik sistem hastalıkları olarak bilinmektedir [112]. Yule ve ark. preeklampsi ve ICP arasında bir korelasyon göstermiştir [113]. *ABCB4* geninin şematik görüntüsü Şekil 2.14'te, kromozomal lokasyonu Şekil 2.15'te gösterilmiştir.




**Şekil 2.14** *ABCB4* geni şematik görüntüsü[1]

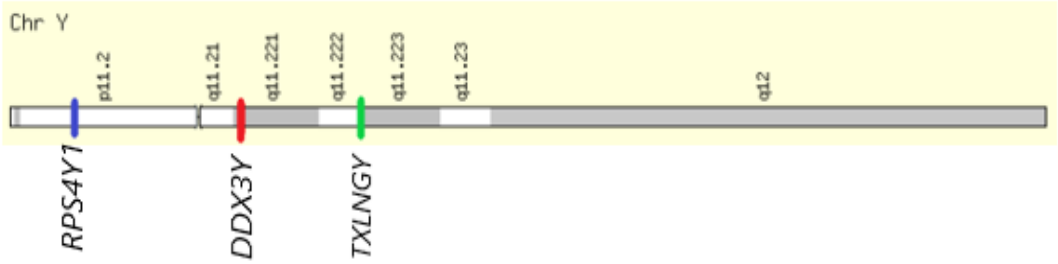
[1]İlgilenilen genlerin şematik görüntüleri ensembl.org internet adresinden alınmıştır [105].




**Şekil 2.15** *ABCB4* geni kromozomal lokasyonu[2] (7q21.13)

[2]İlgilenilen genlere ait kromozomal lokasyonlar genecards.org internet sitesinden alınmıştır [106].

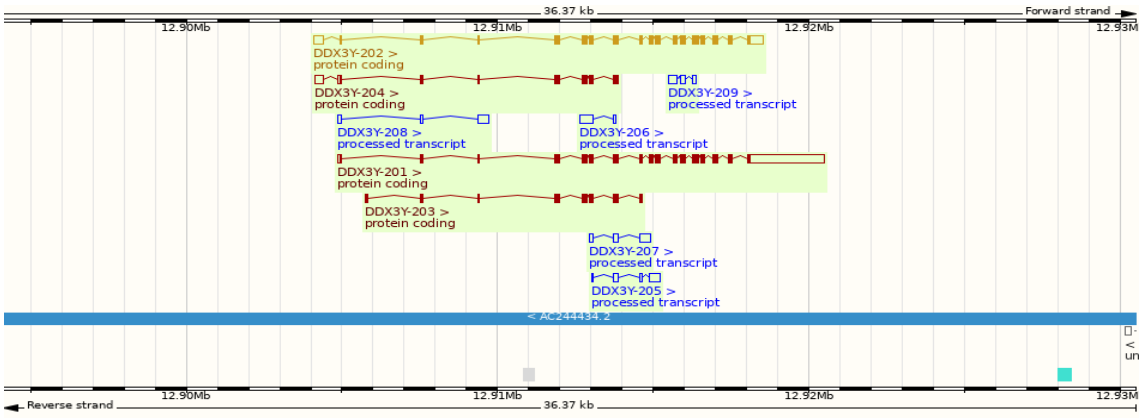
Preeklampside plasental gelişimin, fetüsün normal büyümesini sağlamak için kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir. Cinsiyete özgü varyasyonlardaki gelişimsel farklılıklar daha sonraki dönemlerde diyabetes mellitus [114] ve preeklampsi [115] çalışmaları sonucunda keşfedilmiştir. *DDX3Y* (DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 3, Y-linked), *RPS4Y1* (Ribozomal Protein S4 Y'ye bağlı 1) ve *TXLNGY* (taxilin gamma pseudogene Y bağlı) genleri fetal cinsiyete bağlı genler olarak belirlenmiştir [116]. Y kromozomu üzerinde lokalize olan *DDX3Y*, *RPS4Y1* ve *TXLNGY* genlerine ait kromozom üzerindeki yerleşimleri Şekil 2.16'da gösterilmiştir.




**Şekil 2.16** Y kromozomunda lokalize *RPSY1*, *DDX3Y* ve *TXLNGY* genleri[2]

[2]İlgilenilen genlere ait kromozomal lokasyonlar genecards.org internet sitesinden alınmıştır [106].

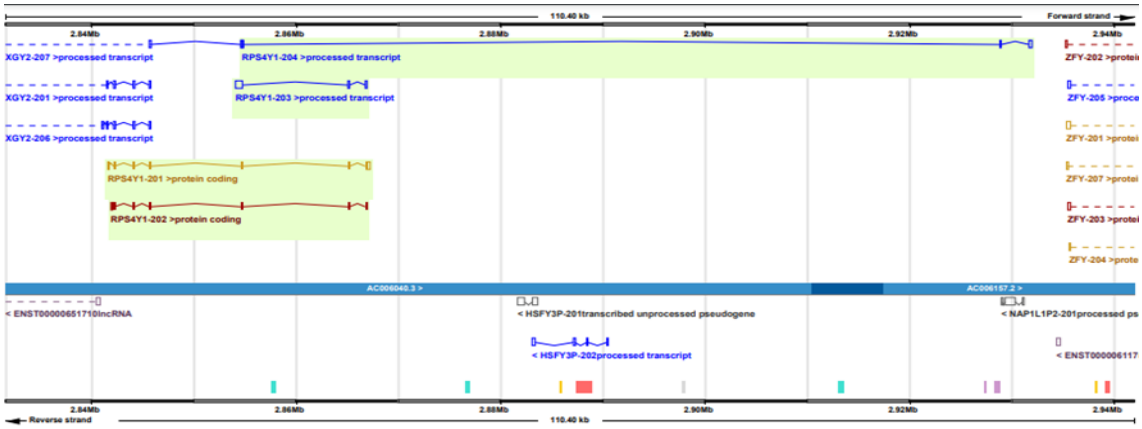
***DDX3Y* (*DBY*) geni,** korunmuş Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD) motifini içeren dokuz korunmuş motif ile karakterize edilen DEAD kutusu RNA helikaz ailesine ait proteini kodlamaktadır. Bu protein ATP'ye bağımlıdır ve çift sarmallı RNA yapılarının çözülmesinde ve RNA protein etkileşimlerinin yeniden şekillenmesinde görev almaktadır [117]. Bu nedenle, transkripsiyon, alternatif splicing, RNA taşınımı, ribozom biyogenezi, RNA bozunması ve translasyonun başlatılması dahil olmak üzere RNA metabolizması için çok önemlidirler [118]. Ackerman ve ark. tarafından *DDX3Y* geninin fetal erkek plasentaya sahip preeklamptik gebelerde ifade edildiği saptanmıştır [119]. DDX3Y genine ait şema şekil 2.17'de gösterilmiştir.




[1]İlgilenilen genlerin şematik görüntüleri ensembl.org internet adresinden alınmıştır [105].

**Şekil 2.17** *DDX3Y* geni şematik görüntüsü[1]

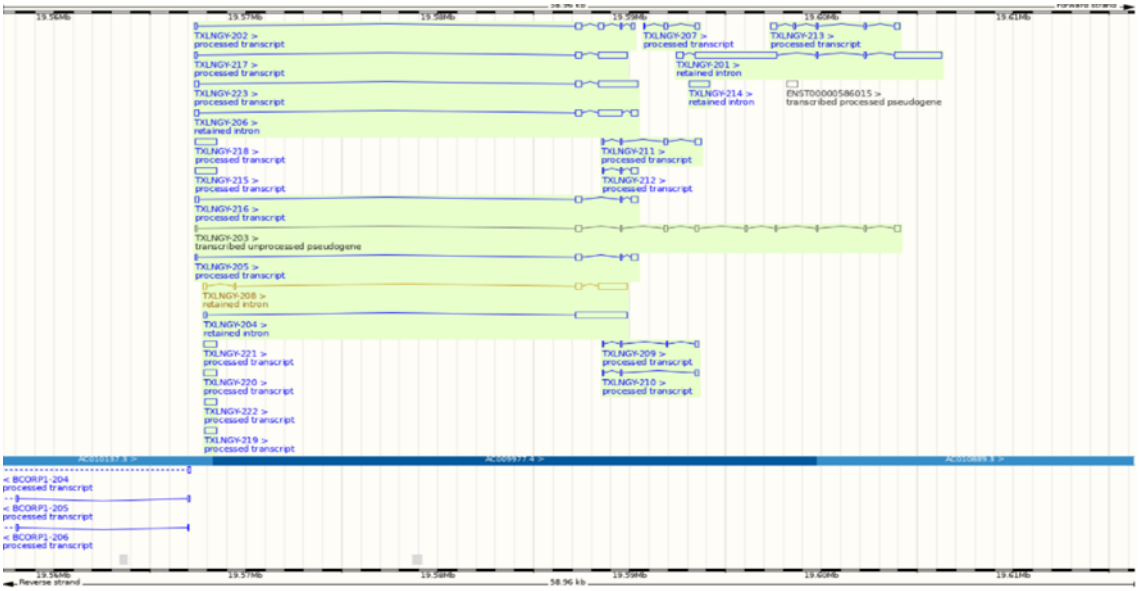
***RPS4Y1***, S4E ribozomal protein ailesinin bir üyesidir. Chen ve ark. Tarafından preeklamptik hastalardan alınan plasental örneklerde, normotansif gebe kadınlara kıyasla RPS4Y1 düzeylerinin yükseldiği saptanmıştır. Çalışmada immünfloresan boyama tekniği RPS4Y1 proteinin aşırı ekspresyonu gözlenirken western blot ile protein ekspresyonu doğrulanmıştır. Sonuç olarak *RPS4Y1*'in aşırı ekspresyonu trofoblast invazyonunun azalmasına neden olmaktadır [120]. *RPS4Y1* geninde bölgelerin görüntüsü Şekil2.18'de gösterilmiştir.




**Şekil 2.18** *RPS4Y1* geni şematik görüntüsü[1]

[1]İlgilenilen genlerin şematik görüntüleri ensembl.org internet adresinden alınmıştır [105].

***TXLNGY,*** Y kromozomu üzerinde yer alan bir pseudogendir. Gonzalez ve ark. plasenta üzerinde yapmış oldukları çalışma sonucunda *TXLNGY* genini fetal cinsiyete bağlı gen ekspresyonu ile ilişkilendirmiştir. Fetal erkek plasentalarında ekspresyon gözlenirken fetal dişi plasentalarında ekspresyon gözlenmemiştir [116]. Brunner ve ark. trofoblast altpopulasyonları üzerinde yaptıkları RNA Profilleme çalışması sonucunda *TXLNGY* geninin preeklampsi ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir [121]. *TXLNGY* geni şematik görüntüsü Şekil 2.19'da verilmiştir.



**Şekil 2.19** *TXLNGY* geni şematik görüntüsü[1]

[1]İlgilenilen genlerin şematik görüntüleri ensembl.org internet adresinden alınmıştır [105].

## 2.3 Gen Ekspresyon Profilleme

Gen, genom dizisinde yeri belirlenen, transkripsiyonu yapılan ve düzenleyici bölgelere sahip kalıtımın en basit ve fonksiyonel birimi olarak tanımlanmaktadır [122]. Genom ise bir organizmanın kalıtım materyalinde bulunan genetik şifrelerin tamamını kapsamaktadır [123].

Genomik, bir organizmanın tüm gen bilgisini tanımlayarak bu genlerin birbirleri ve çevreleri ile etkileşimlerini inceleyen ve ortaya çıkan bilgiyi veritabanlarında analiz eden, karşılaştıran ve saklayan bir alandır. Genel olarak genomların yapısını ve işlevini sıralamak, birleştirmek ve analiz etmek için rekombinant DNA, DNA dizileme yöntemleri ve biyoinformatik gibi alanların kombinasyonel bir yaklaşımı olarak bilinmektedir. Tek seferde bir gen veya gen ürünü yerine bir organizmanın kalıtsal materyalinin tamamının incelenmesi bakımından klasik genetikten

ayrılmaktadır. Dahası genomik, genom içindeki lokuslar ve aleller arasındaki etkileşimlere de odaklanmaktadır. Hem Frederick Sanger'in çalışmaları hem de yeni nesil dizileme teknolojileri sayesinde genomik alanı gelişmeye devam etmektedir [124].

Gen ekspresyonu, DNA'nın mRNA'ya çevrilmesi ve özel mRNA'ların kalıp olarak kullanması ile özel proteinlerin sentezlenmesini içeren bir süreçtir [125]. Moleküler biyolojide belirli bir hücresel aktivite ile ilgili çok sayıda genin işlevinin aynı anda izlenmesine ve ölçülmesine gen ekspresyon profillemesi adı verilmektedir [1]. İnsan genom projesinin tamamlanması aynı anda binlerce gen transkriptinin (transkriptomik), proteinlerin (proteomik), metabolitlerin (metabolomik) ve kromatin modifikasyonlarının (epigenomik) tek bir düzeyde incelenmesine izin veren teknolojik gelişmeleri de beraberinde getirmiştir. Sekanslama, hibridizasyon ve PCR yöntemlerine dayalı yeni teknolojiler geliştirilmektedir. Bu yeni teknolojiler sayesinde hastalık tespitinde ve tedavisinde potansiyel DNA, RNA ve protein molekülleri saptanabilmektedir [126].

Transkriptom, belirli bir doku veya hücre tipinde, belirli bir gelişim aşamasında ve belirli bir fizyolojik veya patolojik koşul altında genom tarafından kopyalanan RNA ile ilgili tüm bilgilerin bütünüdür [127].

Transkriptom analizi, sadece transkripsiyon seviyesinde bir anlatım olmamakla birlikte aynı zamanda gen yapısı ve işlevi, gen ekspresyonu ve regülasyonu gibi karmaşık konuların anlaşılmasını da sağlamaktadır. Daha da önemlisi, insan hastalıklarını tetikleyen biyolojik süreçlerin anahtar değişikliklerini saptayabilir böylece yalnızca altta yatan mekanizmaların anlaşılması için değil, aynı zamanda moleküler tanı ve klinik tedavileri için de yeni yöntemler keşfedilmesinde yeni yollar açabilir [16].

Günümüzde transkriptom analizi için Real-Time PCR, mikrodiziler ve yeni nesil dizileme teknolojisi RNA-seq (RNA dizileme) gibi teknikler kullanılmaktadır; ancak mikrodiziler, RNA moleküllerini ölçmek ve sınıflandırmak için sınırlı bir kapasiteye sahiptir. Çünkü mikrodizi problarının sentezi için bir ön sekans bilgisine ihtiyaç duymaktadır [16]. Yüksek çözünürlüklü RNA-seq teknikleri ise ön sekans bilgisi gerektirmediği için pratik, hızlı ve tekrarlanabilir özelliklere sahiptir.

RNA-seq yönteminde de yeni nesil dizileme (NGS) yönteminin uygulanması ile RNA ve transkriptom miktarı hakkında çok yönlü araştırmalar yapılmaktadır. Dizileme yöntemleri kullanılarak rRNA, miRNA, circRNA, tRNA, lncRNA, miRNA, siRNA ve diğer RNA sınıfları (örn., snRNA ve piRNA) ile ilişkili değişiklikler gen düzeyinde incelenebilmektedir. Yeni nesil dizileme teknolojileri, yüksek verim, yüksek hassasiyet ve yüksek hız avantajları sayesinde dizi tabanlı araştırmalarda devrim yaratacak şekilde gelişmektedir [17]. RNA-seq yönteminde cDNA kullanımı ön plana çıkmaktadır. RNA daha kırılgan bir yapıya sahip olduğu için bu yöntemde ilk adım olarak RNA dizileri reverse transkriptaz enzimleri aracılığıyla cDNA'ya çevrilmektedir. Sonraki adımda ise büyük cDNA kütüphaneleri oluşturulmakta ve NGS yapılmaktadır. Dizileme sonrasında ise, RNA-seq verilerini anlamak ve karşılaştırmalar yapmak için birçok yazılım ve web tabanlı araç kullanılmaktadır [17]. Preeklampsi patofizyolojisini aydınlatmak üzere yapılan bir çalışmada diferansiyel eksprese olan genler belirlendikten sonra ilgili genlerin biyolojik etkilerini açıklamak için GO (Gene Ontology), yolak analizini yapmak üzere de (KEGG) Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes veritabanı kullanılmaktadır [18].

## 2.4 Real-Time PCR

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), ilk kez 1990 yılında Kary Mullis trafından keşfedilmiştir [128]. PCR belirlenen dizilerin ya da tüm genomun çoğaltılması için moleküler biyolojide sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Reaksiyon üç aşamanın bir döngü halinde 25-35 kere tekrarlaması ile gerçekleştirilmektedir. İlk olarak denatürasyon ile zincirler birbirinden ayrılmaktadır. Tavlama (Annealing) aşamasında primerler bu zincirlere bağlanarak uzama aşamasında ikinci zincirin uzamasını sağlamaktadır [129].

*Thermus aquaticus* bakterisinden saflaştırılan, ısıya dayanıklı polimerazın (Taq Polimeraz) kullanımı ile birlikte PCR için otomatize edilen termal cycler cihazlarının geliştirilmesi ve floresan ışıma tekniklerinin de kullanıma girmesiyle birlikte Real-Time PCR'de yapılan araştırmaların sayısı artmıştır [125]. PCR'nin eşzamanlı olarak izlenmesi ilk kez Roche Moleküler Sistemler şirketinden Russell Higuchi ve grubu tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada PCR'nin her döngüsünde

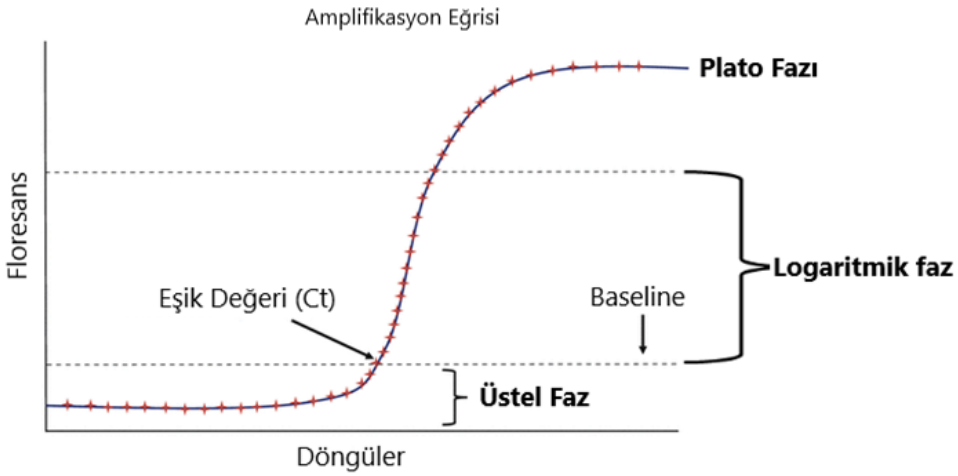
DNA'ya bağlanan etidyum bromürün yaydığı floresandaki artış bir video kamera ile saptanmıştır [130]. Zaman içerisinde oluşan ürün miktarının eşzamanlı olarak ölçülmesine imkân veren aletler tasarlanmaktadır. Real-Time PCR ya da diğer adıyla kantitatif PCR (qPCR) gen ekspresyonunun belirlenmesi ve patojenlerin teşhis edilmesi gibi çeşitli DNA analizlerinde kullanılan duyarlı bir yöntemdir. Real-Time PCR'nin birçok avantajı vardır. Bunlar: hedef bölgenin çoğaltımının ve kantitasyonunun aynı alette yapılmasıyla elektroforez işlemine gerek duyulmaması, çok örnekli çalışmalarda kontaminasyon riskinin azaltılması ve zaman tasarrufu sağlamasıdır. Ancak hiç şüphesiz Real-Time PCR'nin en çok kullanıldığı çalışma alanı ise gen ekspresyon analizinin yapılmasıdır. Canlılığın devamı, bölünme ve farklılaşma gibi birçok hücresel süreç gen anlatımının değişmesiyle gerçekleşmektedir. Bu yüzden de spesifik genlerin o dokudaki ekspresyon seviyesi nicel bir şekilde ortaya konulmaktadır [131].

Real-Time PCR mRNA anlatım çalışmaları haricinde DNA kopya sayısının ölçümünde, alellik ayrımda, mikrodizi verilerinin doğrulanmasında da kullanılmaktadır [132]. Günümüzdeki son uygulamasında tek nokta polimorfizmlerinin duyarlı şekilde saptanmasını sağlamaktadır. Bu özellikleriyle Real-Time PCR moleküler biyoloji alanında gen ekspresyon analizlerinin ve klinik mikrobiyolojide teşhisin verimini artırmaktadır. Bu amaçlarla kullanımının yanı sıra tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, SNP analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanım alanları bulunmaktadır [133].

Real-Time PCR'de tercih edilen beş temel saptama yöntemi bulunmaktadır. Bu yöntemler özgül ve özgül olmayan saptama olarak iki grupta incelenmektedir. Özgül saptama yöntemleri DNA parçasının çoğaltılmak istenilen bölgesine spesifiktir. Bunlar: Hidroliz probu (klasik TaqMan sistemi), hibridizasyon probu, moleküler boncuk ve scorpion primer yöntemleri olarak bilinmektedir. Özgül olmayan saptama yönteminde ise SYBR Green ve etidyum bromid gibi floresan boyalar çift zincirli DNA'ya bağlanmaktadır. Etidyum bromid toksik olduğu için son zamanlarda çok tercih edilmezken günümüzde en sık kullanılan boya SYBR Green'dir. SYBR Green serbest formunda tespit edilemeyen miktarda düşük floresan vermektedir ancak çift zincirli DNA'ya bağlandığında yüksek miktarda

floresan emisyonu göstermektedir. Herhangi bir primer çifti ile çalışılabildiği ve problardaki gibi sentez ve dizayna ihtiyaç duyulmadığı için maliyeti oldukça azdır. Ancak nonspesifik PCR ürünlerinin amplifiye olma riski ve SYBR Green boyasının da bunlara bağlanabilmesi nedeniyle spesifitesi düşüktür. Bu da en önemli dezavantajını oluşturmaktadır [134]. SYBR Green gibi boyalar her çift zincirli DNA'ya ayrım yapmaksızın bağlanabildiği için erime eğrisi (Melting Curve) analizi PCR yönteminin doğru işleyip işlemediğini gösteren en önemli göstergedir [1]. Bu analiz için kullanılan cihaz programlanarak PCR çoğaltımının sonunda ortamdaki sıcaklık 95℃'ye kadar yavaş yavaş artırılır ve kuyulardaki floresan miktarı değişimi belirlenmektedir. Erime eğrisi analizi aynı zamanda ortamda hedef DNA dizisi olmadığında primerlerin birbirleri ile bağlanması sonucunda primer dimerleri olarak adlandırılan ve çift zincirli DNA bölgelerinin oluşumu ile gözlemlenen floresan ışımanın çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölgesine ait olup olmadığını saptamaktadır. Sonuç olarak ekspresyonu incelenen tüm PCR ürünleri bir kontaminasyon ya da yanlış bağlanma olmadıkça aynı erime noktasına sahip olmalı ve tek bir pik vermelidir [133].

Real-Time PCR, üç aşamanın kombinasyonu ile oluşmaktadır. 1. Aşamada mRNA, viral orjinli bir reverse transkriptaz ile komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilir. 2. aşamada elde edilen cDNA'nın amplifikasyonu gerçekleştirilir. 3. Aşamada ise oluşan sinyal sayesinde ürünlerin tespiti ve analizi yapılır [132]. Bununla birlikte, bu reaksiyon süresince 3 ayrı faz görülmaktedir. İlk olarak birkaç döngü süren ve saptanabilir oranda ürünün oluşmadığı arka plan fazıdır. Daha sonra, ürün miktarının üslü artış gösterdiği logaritmik faz (lineer faz) ve son olarak çoğalım olmayan reaksiyon ortamındaki enzim, primer ve nükleotidlerin tükendiği plato fazıdır (Şekil 2.20). Geleneksel PCR'nin aksine ölçüm plato fazından sonra değil, logaritmik faza göre yapılmaktadır. Böylece amplifikasyon etkinliği inhibitör miktarından ve reaksiyon koşullarından daha az etkilenmektedir [135].




**Şekil 2.20** Real-Time PCR fazları

Floresans ölçümü ise Real-Time PCR'de her döngünün sonunda yapılmaktadır. Böylece amplifikasyonun her logaritmik fazı hızlı bir şekilde ölçülebilmektedir.

Real-Time PCR analizlerinde bir diğer önemli değer eşik değeridir. Örneklerde sistemin saptayabileceği floresans sinyali üretecek kadar ürünün çoğaldığı bir eşik noktası vardır. Reaksiyon boyunca diziler çoğalmaktadır ve her çoğalmanın eşit sayıda ürün içerdiği döngü, reaksiyonun eşik değerini göstermektedir. Sonuç olarak ilk başta az sayıda hedef içerenlerin eşik değere ulaşması için daha fazla döngü gerekmektedir. Eşik değer logaritmik fazın başladığı ve doğrusal bir artışın gözlendiği en düşük floresan değeri olarak tanımlanmaktadır. Bu eşik noktasına ulaşmak için gerekli döngü sayısı $C_t$ (Cycle Threshold) değeri olarak adlandırılmaktadır. Bazı bilgisayar yazılımlarında $C_p$ (Crossing Point) olarak geçmektedir [136].

İncelenen genlerin ifadesini ölçmek için mutlak kantifikasyon ve göreceli kantifikasyon (relative quantification) olarak adlandırılan iki yöntem vardır. Mutlak miktar, hedef gen tarafından çoğaltılacak olan standart bir numunenin seri dilüsyonlarının hazırlanması ve her bir dilüsyonun kopya sayısının ölçülmesi ile belirlenmektedir. Bu yöntemde bilgisayar her numune için eşik döngülerini ($C_t$) kaydederek standart bir eğri göstermektedir [137].

Real-Time PCR sonucunda elde edilen veriler kullanılarak eksprese olan genlerin kantifikasyon analizi yapılmaktadır. Bu analizler yapılırken bazı yöntemler uygulanmaktadır. PCR etkinliğinin %100 olduğu kabul edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yönteminde,

reaksiyon sonucunda her döngüde DNA içeriğinin iki katına çıkarıldığı ve bir referans genin tüm numuneler arasında sabit bir seviyede ifade edildiği varsayılmaktadır [1]. Diğer yöntem ise Pfaffl Metodu olarak da bilinmektedir. Bu yönteme göre PCR reaksiyonu her döngü sonunda ürün miktarını iki katına çıkaramamaktadır. Yöntem PCR etkinliğinin belirlenmesi dahilinde ilerlemektedir. Gen ifadesindeki değişim ΔΔCt formülü ile internal kontrole göre normalize edildikten sonra, kontrol grubuna göre kalibre edilerek hesaplanmaktadır [138].

Göreceli kantifikasyon belirlenmesinde referans gen olarak da tanımlanan internal kontrol genleri standart olarak kullanılmaktadır. Bu referans genler, deney içi ve deneyler arasındaki değişkenliği düzeltmek için endojen bir kontrol olarak kullanılmaktadır [137]. Referans genler hücrede ekspresyonu değişmeyen ve miktarı bilinen normalizasyon için kullanılan genlerdir. 'Housekeeping gen' olarak da bilinen bu referans genler temel hücre fonksiyonlarının sürekliliğinde gereklidir [139]. Günümüzde çoğu çalışmada *GAPDH* (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz) ve β-aktin genleri rutin olarak kullanılmaktadır. *GAPDH* hücrede glikoliz ve savunma yanıtında görevli bir enzimidir. Bunun dışında Alfa Tubulin, Ubikitin, 18S rRNA, *TBP* (TATA binding protein) ve *HPRT1* (Hipoksantinfosforibozil-transferaz I) referans genleri de kullanılmaktadır [136].

# 3
# MATERYAL VE METOT

## 3.1 Materyal

### 3.1.1 Kullanılan Cihazlar

- Vorteks – Velp Scientifica
- Hassas Terazi – Shimadzu
- Distile Su Cihazı – Sartorius
- Homojenizatör – ISOLAB
- pH Metre – Mettler Toledo
- Nanodrop – Thermo Scientific One/OneC Microvolume UV-Vis
- Santrifüj – Hettich
- Kuru Isı Bloğu – Inovia
- Elektroforez Tankı – BioRad
- +4°C Buzdolabı – Arçelik
- -20°C Soğutucu – Arçelik
- -80°C Soğutucu – Thermo Electron Corporation
- Mikrodalga – Arçelik
- Manyetik Karıştırıcı – Variomag Mono
- Sterizatör Fırın – Termal Laboratuvar
- Real-Time PCR (Gebze Teknik Üni.) – Applied Biosystems, StepOne Plus
- Minisantrifüj 96 kuyulu mikroplak rotorlu – Labogene

### 3.1.2 Kullanılan Ticari Kitler

- Total RNA İzolasyon Kiti – GeneAll Hybrid-R$^{TM}$ (Seoul, South Korea)
- RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN)
- Q-RT PCR Kit – BIO-RAD iTAQ Universal SYBR Green One Step Kit
- Yükleme Boyası – Thermoscientific
- DNA marker – abm 1 kb/1 kb plus Opti DNA Marker

### 3.1.3 Kullanılan Doku Materyali

Tez çalışması için gerekli olan preeklamptik ve normotansif gebe plasenta, kordon ve plasenta yatağı dokuları İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda görev yapmakta olan Prof. Dr. Rıza MADAZLI ve ekibi tarafından temin edildi. 27-40. gebelik haftasında olan 3 preeklamptik ve 3 normotansif gebeye ait plasenta, kordon ve plasenta yatağı dokuları punch biyopsi yöntemi ile alındı. Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 20830 numaralı etik kurul izin kararı ile yapılmıştır.

## 3.2 Metot

### 3.2.1 Genlerin Belirlenmesi

Çalışma grubumuz tarafından yürütülen Preeklampside diferansiyel olarak eksprese olan genleri belirlemek amacıyla 4 preeklamptik ve 4 sağlıklı gebenin plasental doku, plasenta yatağı kordon doku örneklerinden RNA izolasyonunu takiben RNA dizileme yapılmıştır. Kişi başına plasenta, plasental yatak ve kordon dokusu olmak üzere 3'er doku örneği alınmış, sağlıklı ve kontrol grubunun her biri için alınan toplam 12'şer doku için birer RNA havuzu oluşturularak iki farklı RNAseq yapılmıştır. Çalışma sonucunda preeklamptik durumda diferansiyel eksprese olan 70.551 gen belirlenmiştir. Bu genler arasından $p< 0,05$ değerine sahip olan genler seçilerek 502 tane anlamlı olarak diferansiyel eksprese edilen gen tanımlanmıştır. Bu tez çalışmasında RNAseq sonucuna göre anlamlı olarak diferansiyel eksprese edilen genler arasından önemli ölçüde ekspresyon farkı gösteren ve daha önce preeklampside yoğun olarak çalışılmamış 6 gen seçildi. Seçilen genler Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

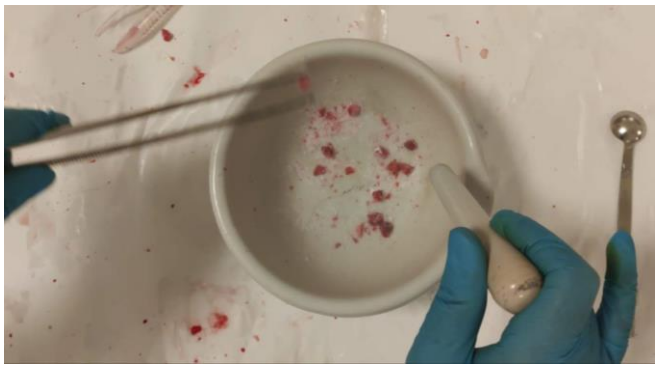
**Tablo 3.1** Gen ekspresyon farklılıkları belirlenecek olan genlerin listesi

1. *FIBCD1*: "Fibrinogen C domain containing 1"
2. *FGA*: Fibrinogen alfa zincir
3. *ABCB4*: "ATP binding cassette subfamily B member 4"
4. *DDX3Y*: "DEAD-box helicase 3 Y-linked"
5. *RPS4Y1*: "Ribosomal protein S4 Y-linked 1"
6. *TXLNGY*: "Taxilin gamma pseudogene, Y-linked"

### 3.2.2 Plasental ve İlişkili Dokuların Hazırlanması

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Anabilimdalın'dan alınan doku örnekleri bu çalışmada kullanılmak üzere soğuk zincirde taşınarak Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarına getirildi ve -80°C'de saklanmaya devam edildi.

Ribonükleaz (RNaz) RNA moleküllerini degrede eden enzimlerdir. RNA izolasyonunda yüksek verimliliğin sağlanabilmesi için ortamdan RNaz'ların uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu nedenle RNA izolasyonunda kullanılacak havan, havaneli, tüm cam ve plastik malzemeler %0,1'lik DEPC (Dietil pirokarbonat) içeren su içerisinde bir gece bekletildi ve 121 °C' de 15 dakika otoklavlandı. Dokular sıvı azot içerisinde havaneli yardımı ile küçük parçalar haline getirildi. 2 ml'lik her bir tüp içerisine alınan doku örnekleri 100-120 mg olacak şekilde tartıldı (Şekil 3.1). Tartılan küçük dokular homojenizasyon işlemine kadar -80 °C'de saklandı.



**Şekil 3.1** Dokuların sıvı azot içerisinde küçük parçalara ayrılması

### 3.2.3 Total RNA İzolasyonu

Preeklamptik ve normotansif gebelerden alınan plasenta, kordon ve plasenta yatağı dokuları 200 $\mu$L 1X PBS (Fosfat tamponu) ile yıkandıktan sonra PBS ortamdan uzaklaştırıldı. Dokulardan RNA izolasyonu, Total RNA izolasyon kiti (GeneAll Hybrid-R, GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea) kullanılarak gerçekleştirildi. İzolasyon aşamaları kit protokolüne göre uygulandı.

• Doku homojenizasyonu için dokuların üzerine 1000 $\mu$L RiboEx lizis tamponu eklenerek tüm dokular homojenizatör (ISOLAB Ultratorrax-Hafif Yük) yardımı ile 30 sn-1 dk boyunca homojenize edildi. Homojenat oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakıldı. İzolasyona devam edilmeyecek olan homojenatlar -80°C'ye kaldırıldı.

• 250 $\mu$L kloroform eklenerek tüp alt üst edilerek iyice karıştırıldı. 12000 rpm 4°C' de 15 dk santrifüj edildi. RNA içeren üst berrak sıvı faz (Şekil 3.2) miktarı hesaplanarak yeni bir tüpe aktarıldı.

• Miktarı belirlenen sıvı fazın üzerine alınan miktar kadar (1 volume) Buffer RBI eklendi ve pipetaj yapıldı. Santrifüj yapılmadı.

• 700 $\mu$l örnek RNeasy mini spin kolonlara aktarıldı ve oda sıcaklığında 12000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi ve toplama tüpündeki akış atıldı.

• Örneğin kalan kısmı tekrardan kolonlara aktarılarak santrifüj edildi ve akış atıldı.

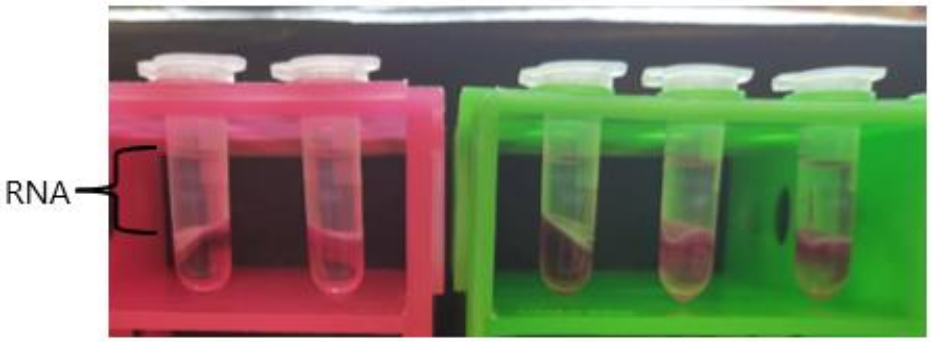
• Kolon üzerine 500 $\mu$L Buffer SWI eklenerek oda sıcaklığında 12000 rpm 30 sn santrifüj edildi ve akış atıldı.

• Kolona 500 $\mu$L Buffer RNW eklenerek oda sıcaklığında 12000 rpm 30 sn santrifüj edildi ve akış atıldı.

• Kolon boş bir şekilde oda sıcaklığında 12000 rpm 1 dk boyunca santrifüj edildi.

• Kolon yeni etiketli 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne alındı ve kolona 50 $\mu$L önceden ısıtılmış (50°C) % 0,1 DEPC'li su eklenerek oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildi. 12000rpm'de 1 dk santrifüj edilerek RNA ependorf tüpe aktarıldı. Kolon ependorf

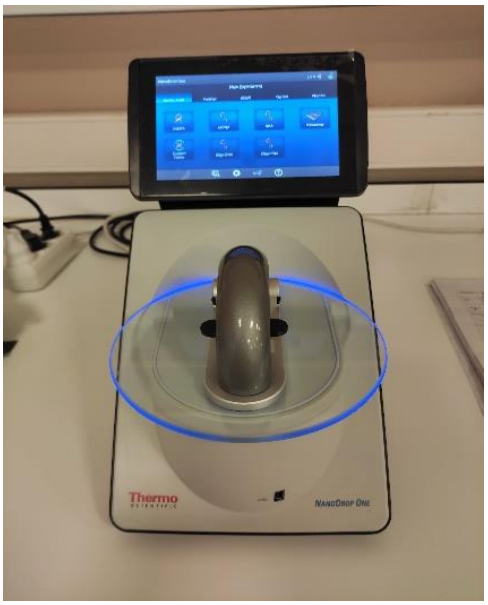
tüpten uzaklaştırıldı ve tüplerin kapakları kapatıldı. RNA örnekleri kullanılacağı zamana kadar bekletilmek üzere -80˚C'de soğutucuya kaldırıldı.




**Şekil 3.2** Fenol kloroform çöktürmesi sonucunda oluşan faz ayrımı

### 3.2.4 RNA Konsantrasyon ve Miktar Tayini

Elde edilen RNA izolatlarına ait konsantrasyon ve miktar tayini NanoDrop spektrofotometre (Thermo Scientific One/OneC Microvolume UV-Vis) ile belirlendi (Şekil 3.3). Öncelikle boş ölçüm almak için elüsyon adımında kullanılan %0,1 DEPC'li sudan 1 $\mu$L aletin kuyusuna damlatılıp boş "blank" ölçüm alındı. Daha sonra RNA izolatları 1 $\mu$L alınıp aletin kuyusuna damlatıldı ve ölçüm yapıldı. Örneklerin saflık derecesi ve RNA miktarı sayısal ve grafik olarak elde edildi.




**Şekil 3.3** Nanodrop cihazı

### 3.2.5 RNA Pürifikasyonu

Nanodrop ölçümü sonucunda kontaminasyon tespit edilen RNA izolatları RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN) ile pürifiye edildi. İzolasyon aşamaları aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

• İzolasyona başlamadan önce 1:4 oranında olacak şekilde Buffer RPE + %100 etanol çözeltisi hazırlandı.

• Fenol kontaminasyonu olduğu düşünülen RNA eksraktları 100 $\mu$l'ye kadar DEPC'li su ile tamamlandı.

• 350 $\mu$L Buffer RLT eklendi ve pipetaj yapıldı.

• RNA'nın dilüe olması için 250 $\mu$L %100 etanol eklendi ve pipetle karıştırıldı.

• 700 $\mu$L örnek 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirilen RNeasy MinElute spin kolonlarına aktarıldı ve 12000 rpm 15 sn santrifüj edildi. Akış atıldı.

• RNeasy MinElute spin kolonlar tekrardan toplama tüplerine yerleştirildi. 500 $\mu$L Buffer RPE (4 hacim %100 Etanol eklendi) eklendi ve spin kolon membranını yıkamak için 15 sn 12000 rpm'de santrifüj edildi.

• RNeasy MinElute spin kolonları yeni 2 mL'lik toplama tüplerine yerleştirildi. Spin kolon membranının kuruması için 1 dk max hızda santrifüj edildi. Akış atıldı.

• RNeasy MinElute spin kolonlar yeni 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpe yerleştirildi.

• 40 $\mu$l önceden ısıtılmış (50°C) %0,1 DEPC'li su direkt olarak spin kolonlara uygulandı ve RNA'nın elüe olması için 12000 rpm'de 1 dk boyunca santrifüj edildi.
• Kontaminasyonun giderilip giderilmediğinin anlaşılması için nanodrop yardımı ile spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

### 3.2.6 Agaroz Jel Elektroforezi

• Agaroz jel elektroforezi için önce %1'lik agaroz jel hazırlandı. Belirtilen miktarlarda tartılan agarozun üzerine TAE tamponu eklendi ve agaroz mikrodalgada iyice çözünene kadar ısıtıldı.

• Çözeltinin soğuması beklendi, tarak yerleştirildikten sonra çözelti jel tabağına döküldü, jel polimerleşmesi gerçekleştikten sonra tarak yavaşça çıkarıldı, jel

tabağı elektroforez tankına yerleştirildi ve üzerini örtecek kadar 1X TAE tamponu koyuldu.

• 0,2 ml'lik PCR tüplerine 3 $\mu$l RNA ekstraktı ve 2 $\mu$l yükleme boyası (Thermo Scientific) eklenerek karıştırıldı. Karışım direkt olarak jel kuyucuğuna yüklendi.

• 5 $\mu$l DNA belirteci (1kb DNA Ladder, abm) ilk ve son kuyucuğa yüklendi.

• Elektroforez işlemi 70 voltta 50 dakika boyunca gerçekleştirildi.

• Jel görüntüsü UV ışığı altında incelendi.

### 3.2.7 Primer Tasarımı ve Dilüsyonu

Bu çalışmada Real-Time PCR'de kullanılacak olan 6 gen için ileri ve geri yönlü primer sentezi Primer3 programı ile belirlendi. Primerlerin spesifitesi BLASTN ile kontrol edildi. Son olarak primerlerin istenilen yere bağlandığının anlaşılması için in silico PCR analizi yapıldı. Belirlenen primerler Triogen Biyoteknoloji (İstanbul) şirketinden temin edildi. İlgilenilen genlere ait primer dizileri Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.2** Genlere ait ileri ve geri primer dizileri

| | GEN ADI | FORWARD PRIMER (5'–3') | REVERSE PRIMER (5'–3') |
|---|---|---|---|
| 1 | **FIBCD1** | GCAAACTTGACGACCCCAAC | TTCCCCACGATCTGCTAGGA |
| 2 | **FGA** | CCTCTGGTAGCACAACCACC | GGATACCTCTGACAGGGCGA |
| 3 | **ABCB4** | CCAAGTGCTTAACTGTGCATGT | TCTTGCTCAGTATAGCATTCACTG |
| 4 | **DDX3Y** | GTGGAGGATTTGGTGCCAGA | AGATTCAGTTGCCCCACCAG |
| 5 | **TXLNGY** | ATTACAGCCACTCCCCGTTG | GGGGACAGATCATCAGGCAT |
| 6 | **RPS4Y1** | GGGCATTCGACTTACTGTTGC | CCCTACTATTATCCACAAGGGGG |
| 7 | **GAPDH** | GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAT | AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA |

Liyofilize olarak gelen primerler Real-Time PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere sulandırıldı. Üreticinin bilgisine göre primer konsantrasyonları 100 $\mu$M olacak şekilde her birinin üzerine nükleaz içermeyen su eklendi. Böylece tüm primerlere

ait ana stoklar oluşturuldu. Daha sonra her bir primer için 10 $\mu$M'lık çalışma solüsyonu hazırlamak için etiketlenen eppendorf tüplere 90 $\mu$L nükleaz içermeyen su eklendi. Her bir tüp üzerine ilgili primerin ana stok çözeltisinden 10 $\mu$L alınarak çalışma solüsyonu hazırlandı. Primerler -20°C'de saklandı.

### 3.2.8 Real-Time PCR

Real-Time PCR işlemi için BIOBASIC Green-2 Go 1 Step qRT-PCR Mastermix Kit kullanıldı. Deney sırasında tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Kullanılacak RNA örneklerinin her biri 50 ng/$\mu$l konsantrasyonda olacak şekilde nükleaz içermeyen su kullanılarak seyreltildi. Real-Time PCR reaksiyonları için gerekli bileşenler Tablo 3.3'de belirtilen hacimlerde ve toplam hacim 10 $\mu$L olacak şekilde ayarlandı.

**Tablo 3.3** PCR reaksiyonu için kullanılan bileşenler ve gerekli hacimler

| **Bileşenler** | **Hacim** |
|---|---|
| Nükleaz içermeyen su | 2.2 $\mu$l |
| Grren-2Go qPCR MasterMix (1X) | 5$\mu$l |
| İleri primer (10 $\mu$M) | 0,3 $\mu$l |
| Geri primer (10 $\mu$M) | 0,3 $\mu$l |
| qRT-PCR Enzim Karışımı | 0,2 $\mu$l |
| RNA (50 ng/$\mu$l) | 2 $\mu$l |
| | **Toplam Hacim=10 $\mu$l** |

Analizler için Applied Biosystems StepOne Plus Real-Time PCR cihazı (Şekil 3.4) kullanılarak RT-PCR işlemi gerçekleştirildi. Reaksiyon protokolüne göre ilk olarak RNA'dan cDNA çevrimi yapıldı ve ardından kantitatif reaksiyonlar takip edildi. Ayrıca GAPDH, bir referans gen olarak kullanıldı. PCR adımları Tablo 3.4'te gösterilmiştir.




**Şekil 3.4** Applied Biosystems StepOne Plus Real-Time PCR cihazı

**Tablo 3.4** PCR için Termal Döngü Protokolü

| | Reaksiyon | Sıcaklık-Süre | Döngü Sayısı |
|---|---|---|---|
| 1. Adım | Reverse Transkripsiyon | 42°C 15 dk | 1 |
| 2. Adım | İlk Denatürasyon | 95°C 10 dk | 1 |
| 3. Adım | Denatürasyon | 95°C 15 sn | 40 |
| 4. Adım | Bağlanma ve Uzama | 60°C 1 dk | |
| 5. Adım | Erime Eğrisi Analizi | 65°C - 95°C | 1 dk aralıklı |

Real-Time PCR reaksiyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirildikten sonra Ct değerleri incelenen 6 gen referans gen olarak kullanılan GAPDH'e göre normalize edildikten sonra kat değişimi değeri (fold change) hesaplandı. Her bir dokuya özgü çalışma grubu kontrol grubuna göre kalibre edildi. Genlerin ekspresyon düzeyini anlamak için kat değişim değerlerinin log2 değerleri hesaplandı (3.1).

$\Delta C_t$ (Kontrol) = $C_t$ (Kontrol grubu hedef geni) – $C_t$ (Kontrol grubu referans geni)

$\Delta C_t$ (Deneysel) = $C_t$ (Deney grubu hedef geni) – $C_t$ (Deney grubu referans geni)

$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ (Deneysel) – $\Delta C_t$ (Kontrol)

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ = Kat değişim değeri

Anlamlılık (Mean) = $\text{Log2}(2^{-\Delta\Delta Ct})$ (3.1)

# 4

# SONUÇ VE ÖNERİLER

## 4.1 Total RNA İzolasyonu

Tez çalışması kapsamında 3 preeklamptik ve 3 kontrol gebeye ait plasenta, kordon ve plasenta yatağı dokularından total RNA izolasyonu yapıldı. İzolasyondan önce dokular sıvı nitrojen içerisinde küçük parçalara ayrıldı. Plasenta dokusunun parçalanması kordon ve yatak dokularına göre daha kolay bir şekilde gerçekleştirildi. Plasenta dokusu daha yumuşak bir yapıya sahip iken kordon dokusu damarlı yapısından kaynaklı sert bir yapıya sahip olduğu için sıvı azot içerisinde yeteri kadar küçük parçalara ayrılamadı. Parçalama işleminden sonra dokular 2 ml'lik eppendorf tüplere alındı, 100-120 mg olacak şekilde her bir doku ayrı ayrı tartıldı ve veriler kaydedildi.

Dokular biyopsi ile alındıktan sonra PBS içerisinde yıkanmadıkları için dokular kan ile kaplıydı. Dokularda bulunan kan total RNA izolasyonunu olumsuz yönde etkileyeceği için kanın dokulardan uzaklaştırılması gerekiyordu. Bu yüzden dokular parçalandıktan sonra 1X PBS ile yıkandı. Daha sonra PBS mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı. Kandan arındırılan dokuların üzerine 1 mL RiboEx Buffer eklendi. RiboEx içerisinde fenol ve guanidin tuzu içeren bir lizis solüsyonudur. İçerisindeki guanidin tiyosiyanat DNaz ve RNaz inhibitörü olarak görev yaptığı için nükleik asitleri degredasyondan korurken aynı zamanda hücreleri ve proteinleri parçalamaktadır [140]. Dokular 2 mL'lik tüp içerisinde homojenizatör yardımı ile lizis tamponu içerisinde 1 dk boyunca homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra tüp içerisine kloroform eklendi, hafifçe çalkalandı ve 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu adımda fenol kloroform sayesinde faz ayrımı gerçekleşmektedir. Santrifüj işleminden sonra tüp içerisinde 3 ayrı faz gözlemlendi. En alttaki fazda fenol ve kloroform ile birlikte çöken lipidler, en üstteki fazda RNA ve ortadaki fazda ise proteinler bulunmaktadır. RNA içeren sıvı berrak faz spin kolon üzerine

aktarıldıktan sonra yıkama işlemlerine devam edildi. Yıkama, sıvı faz içerisinde var olan fenol kloroform kalıntılarını uzaklaştırmak için önemli bir adımdır. Elüsyon aşamasından önce boş kolon santrifüjü de kolondan alkol kalıntılarını uzaklaştırmak için gerçekleştirildi. Elüsyon işlemi için hem kit içerisindeki nükleaz içermeyen su hem de 50°C'de ısıtılan DEPC'li su kullanıldı. İzole edilen RNA'ların konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla spektrofotometrik ölçüm aşamasına geçildi.

### 4.1.1 RNA Miktar Tayini Sonuçları

Plasenta, kordon ve plasental yatak dokularından izole edilen total RNA'ların kalite ve miktar tayini için NanoDrop spektrofotometre cihazı kullanıldı. Ölçüm öncesinde elüsyon adımında kullanılan nükleaz içermeyen su/DEPC'li su mikropipet ile 1 $\mu$L alınarak cihazın ölçüm kaidesine koyuldu. Bu adım RNA izolatının içerisindeki elüsyon solüsyonunu tanımak için yapılmaktadır. Cihaz tarafından elüsyonun tanınması işlemine blank adı verilmektedir [141]. Elde edilen her bir RNA izolatı için spektrofotometrik ölçüm alındı. Değerler kaydedildi. Her ölçümden sonra üst ve alt ölçüm kaideleri temizlendi. Dokulardan elde edilen RNA'ların konsantrasyon değerleri (ng/$\mu$L) ve A260/280 oranları Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1** İzole edilen total RNA'ların kalite ve konsantrasyon ölçüm değerleri[1]

[1]PE: Preeklampsi hasta grubu, K: Kontrol grubu

| | PLASENTA | | KORDON | | PLASENTAL YATAK | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Çalışma Grubu** | ng/$\mu$L | $A_{260/280}$ | ng/$\mu$L | $A_{260/280}$ | ng/$\mu$L | $A_{260/280}$ |
| **PE1** | 741 | 2,14 | 70,4 | 1,9 | *111,1 | 1,6 |
| **PE2** | 854,2 | 2,15 | 1218,9 | 2,15 | 503,9 | 2,14 |
| **PE3** | 773.8 | 2,14 | *19,3 | 1,39 | 298,7 | 2,07 |
| **K1** | 598,3 | 2,12 | *4,3 | 1,49 | 300,5 | 2,02 |
| **K2** | 741 | 2,11 | *25,7 | 1,85 | *32,5 | 1,98 |
| **K3** | *34 | 2,04 | *33,8 | 1,28 | 46 | 2,07 |

*Kontaminasyon tespit edildi.

### 4.1.2 RNA Pürifikasyon Sonuçları

Spektrofotometrik ölçüm sonucunda bazı dokularda kontaminasyon olduğu tespit edildi. Cihaz tarafından bu bir fenol kontaminasyonu olarak saptandı. (Şekil 4.1) Tablo 4.1'de yapılan Nanodrop ölçüm sonucuna göre kontaminasyon saptanan örnekler üzerinde pürifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Pürifikasyon işlemi RNA izolatından fenol kalıntılarını uzaklaştırmak için tercih edildi. Bu işlem RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN) ile gerçekleştirildi. Pürifiye edilen RNA örneklerinin pürifikasyon işleminden önceki ve sonraki saflık ve konsantrasyon değişimleri Tablo 4.2'de gösterilmiştir.




**Şekil 4.1** Cihaz tarafından tespit edilen fenol kontaminasyon analizi

**Tablo 4.2** Pürifikasyon işlemi sonrasında gözlemlenen ölçüm sonuçları[1]

| | | İlk ölçüm | | Son Ölçüm | |
|---|---|---|---|---|---|
| Çalışma Grubu | Doku Tipi | (ng/ul) | A $_{260/280}$ | (ng/ul) | A260$_{/280}$ |
| PE1 | YATAK | *111,1 | 1,6 | 12,9 | 2,08 |
| PE3 | KORDON | *19,3 | 1,39 | 1,1 | 1,51 |
| K1 | KORDON | *4,3 | 1,49 | 2,7 | 1,56 |
| K2 | KORDON | *25,7 | 1,85 | 11,7 | 2,06 |
| | YATAK | *32,5 | 1,98 | 8,8 | 2,27 |
| K3 | PLASENTA | *34 | 2,04 | 13,7 | 2,26 |
| | KORDON | *33,8 | 1,28 | 0,3 | 2,04 |

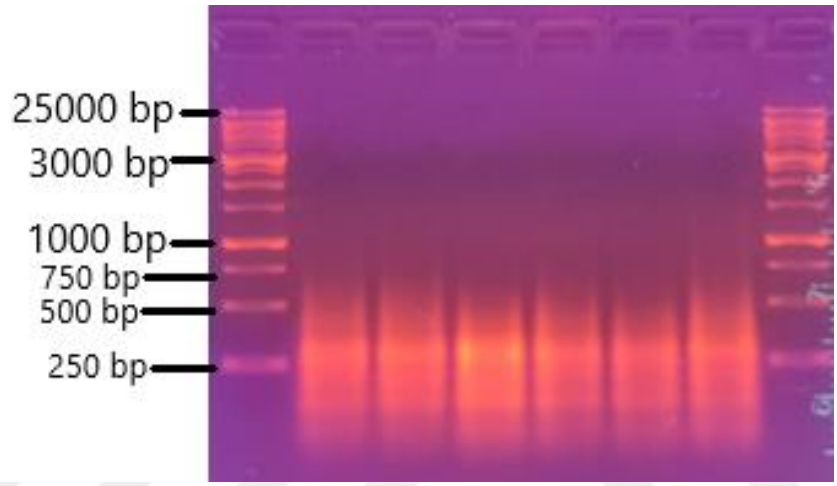
[1]PE: Preeklampsi hasta grubu, K: Kontrol grubu

*Kontaminasyon tespit edildi.

RNA pürifikasyon sonrasındaki nanodrop ölçüm sonrasında fenol kontaminasyonunun giderildiği gözlendi. Kontaminasyon ortadan kaldırılsa da pürifikasyon ile birlikte RNA konsantrasyonunun azaldığı tespit edildi.

### 4.1.3 Agaroz Jel Elektroforezi

Total RNA izolasyon sonucu elde edilen bazı RNA örneklerinin bütünlük analizi agaroz jel elektroforez yöntemi ile saptanmıştır. 1 kb DNA marker kullanılarak jele yüklenen RNA örnekleri Şekil 4.2'de gösterilmiştir.




**Şekil 4.2** İzole edilen RNA örneklerinin[1] agaroz jel elektroforezi görüntüsü

[1]Jel kuyucuklarına yüklenen RNA örnekleri ikinci kuyudan başlamaktadır. Sırasıyla PE1 plasenta, PE2 plasenta, PE2 kordon, PE3 plasenta, K1 plasenta ve K2 plasentadır. İlk ve son kuyucuk 1 kb DNA Ladder içermektedir.

Agaroz jel elektroforez sonucuna göre izole edilen RNA'lara ait 28S ve 18S olmak üzere iki ayrı bant gözlemlendi. Örneklere ait bir smear görüntüsü gözlemlenmediği için RNA izolasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği sonucuna varıldı.

## 4.2 Real-Time PCR Analizi

Real-Time PCR reaksiyon mix hazırlandıktan sonra her bir örnek duplike şekilde çalışıldı. GAPDH ve diğer 6 gen primerleri de reaksiyona eklenerek analiz gerçekleştirildi. Real-Time PCR işlemi sonucunda ilgilenilen genler için plasenta, kordon ve yatak dokularına ait ortalama Ct değerleri Tablo 4.3, Tablo 4.4 ve Tablo 4.5'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.3** Genlerin plasenta dokusunda ortalama Ct değerleri

| | PREEKLAMPSİ | | | KONTROL |
|---|---|---|---|---|
| **GENLER** | **PE 1** | **PE 2** | **PE 3** | **K1** |
| **FIBCD1** | 31,938 | 29,424 | 32,482 | 33,009 |
| **FGA** | 26,062 | 29,449 | 31,113 | 30,970 |
| **ABCB4** | 28,929 | 33,276 | 33,779 | 32,666 |
| **DDX3Y** | 29,431 | 27,817 | 27,907 | 29,935 |
| **RPS4Y1** | 30,990 | 29,543 | 33,974 | 34,490 |
| **TXLNGY** | 28,705 | 25,082 | 29,146 | 28,245 |
| **GAPDH** | 31,695 | 30,454 | 32,517 | 30,302 |

**Tablo 4.4** Genlerin kordon dokusunda ortalama Ct değerleri

| | PREEKLAMPSİ | | | KONTROL |
|---|---|---|---|---|
| **GENLER** | **PE 1** | **PE 2** | **PE 3** | **K1** |
| **FIBCD1** | 26,172 | 31,747 | 27,040 | 29,968 |
| **FGA** | 23,352 | 26,261 | 24,893 | 28,283 |
| **ABCB4** | 24,015 | 30,232 | 25,705 | 28,946 |
| **DDX3Y** | 24,972 | 24,930 | 21,279 | 20,371 |
| **RPS4Y1** | 26,079 | 28,521 | 24,829 | 23,932 |
| **TXLNGY** | 16,477 | 24,878 | 18,175 | 23,219 |
| **GAPDH** | 23,607 | 27,442 | 25,909 | 30,514 |

**Tablo 4.5** Genlerin plasental yatak dokusunda ortalama Ct değerleri

| | PREEKLAMPSİ | | | KONTROL |
|---|---|---|---|---|
| **GENLER** | **PE 1** | **PE 2** | **PE 3** | **K1** |
| **FIBCD1** | 26,59 | 25,66 | 31,01 | 27,40 |
| **FGA** | 27,87 | 26,84 | 26,17 | 29,46 |
| **ABCB4** | 26,01 | 25,27 | 30,55 | 28,24 |
| **DDX3Y** | 20,30 | 23,33 | 23,24 | 20,03 |
| **RPS4Y1** | 23,85 | 28,14 | 27,48 | 23,00 |
| **TXLNGY** | 18,60 | 19,38 | 19,63 | 20,58 |
| **GAPDH** | 25,65 | 22,49 | 23,13 | 27,93 |

Cihazın vermiş olduğu ortalama Ct değerleri kullanılarak 3 preeklamptik gruba ve 1 kontrol grubuna ait plasenta, kordon ve plasenta yatağı dokularında ifade edilen 6 gen için ekspresyon miktarlarındaki kat değişimi ve log2 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) değerleri (3.1) kullanılarak hesaplandı.

Belirlenen genlerin kontrol grubu doku örneklerine göre $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri Tablo 4.6'da ve log2 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) değerleri Tablo 4.7'de gösterilmiştir. Ayrıca her bir dokuya ait kontrol grubu için ΔΔCt değeri hesaplandı. Her doku için tek bir kontrol grubu kullanıldığı için ΔΔCt değeri 0 olarak elde edildi. Kontrol grupları için kat değişim değeri 1 olarak alındı.

**Tablo 4.6** Hedef genlerin kontrol grubuna göre $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri

| | PLASENTA | | | KORDON | | | PLASENTAL YATAK | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GENLER | PE 1 | PE 2 | PE 3 | PE 1 | PE 2 | PE 3 | PE 1 | PE 2 | PE 3 |
| FIBCD1 | -1,667 | -2,171 | 3,008 | 3,111 | 4,851 | 1,677 | 0,364 | 0,077 | 0,003 |
| FGA | -1,021 | -3,849 | -3,832 | 1,976 | 1,050 | 1,215 | 0,620 | 0,141 | 0,351 |
| ABCB4 | -3,068 | 0,082 | 1,179 | 1,975 | 4,357 | 1,364 | 0,967 | 0,181 | 0,007 |
| DDX3Y | -0,612 | -3,131 | -2,542 | 11,508 | 7,631 | 5,513 | 0,171 | 0,002 | 0,004 |
| RPS4Y1 | -0,167 | -0,173 | -0,119 | 9,054 | 7,661 | 5,502 | 0,115 | 0,001 | 0,002 |
| TXLNGY | -3,063 | -4,063 | -0,616 | 0,165 | 4,731 | -0,439 | 0,812 | 0,053 | 0,069 |

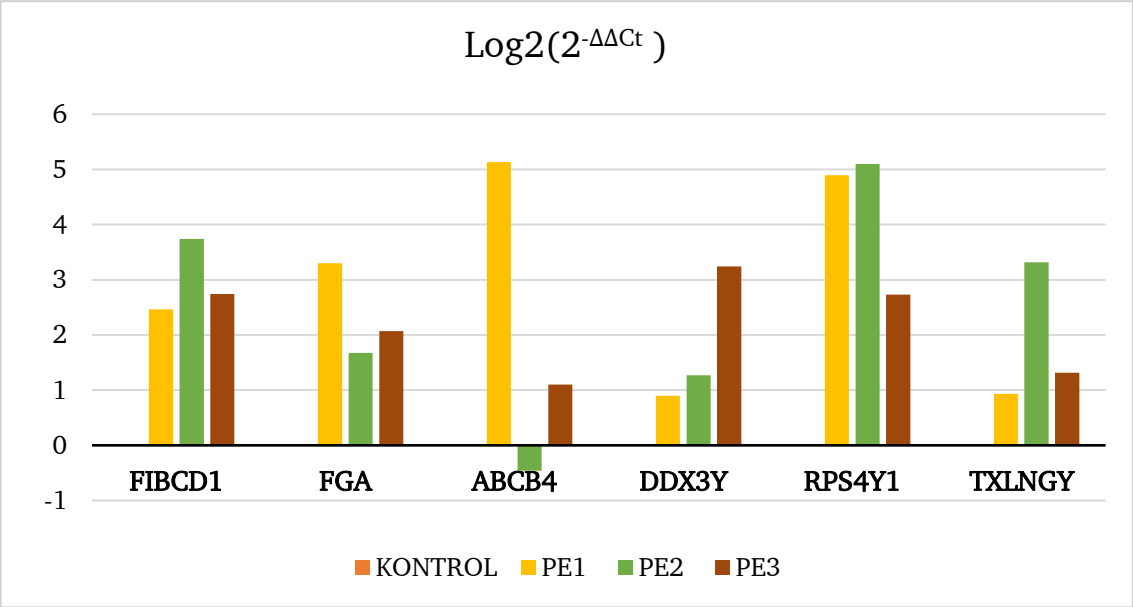
**Tablo 4.7** Hedef genlerin kontrol grubuna göre log2 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) değerleri

| GENLER | PLASENTA | | | KORDON | | | PLASENTAL YATAK | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | PE 1 | PE 2 | PE 3 | PE 1 | PE 2 | PE 3 | PE 1 | PE 2 | PE 3 |
| FIBCD1 | 2,46 | 3,74 | 2,74 | -3,11 | -4,85 | -1,68 | -1,46 | -3,70 | -8,40 |
| FGA | 3,30 | 1,67 | 2,07 | -1,98 | -1,05 | -1,21 | -0,69 | -2,82 | -1,51 |
| ABCB4 | 5,13 | -0,46 | 1,10 | -1,98 | -4,36 | -1,36 | -0,05 | -2,47 | -7,11 |
| DDX3Y | 0,90 | 1,27 | 3,24 | -11,51 | -7,63 | -5,51 | -2,55 | -8,73 | -8,01 |
| RPS4Y1 | 4,89 | 5,10 | 2,73 | -9,05 | -7,66 | -5,50 | -3,12 | -10,57 | -9,28 |
| TXLNGY | 0,93 | 3,32 | 1,31 | -0,16 | -4,73 | 0,44 | -0,30 | -4,24 | -3,85 |

Plasenta dokusunda kontrol grubuna göre preeklampsi hastalarındaki ekspresyon değişimi Şekil 4.3'te gösterilmiştir.

Elde edilen sonuca göre;

• Preeklampsi hastalarının plasenta dokularında ilgilenilen tüm genler için ekspresyon artışı gözlenmiştir. (2 numaralı preeklampsi hastasına ait ABCB4 geni hariç)

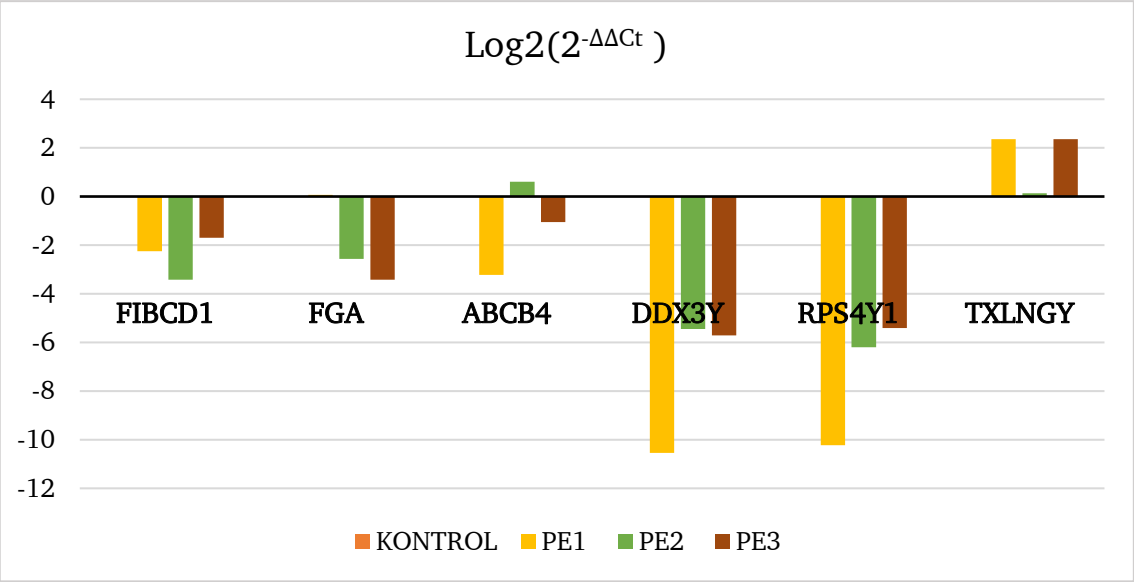



**Şekil 4.3** Preeklamptik plasenta dokusularında genlerin ekspresyon seviyeleri

Preeklampsi gruplarına ve kontrol grubuna ait kordon dokusundaki gen ekspresyon seviyeleri Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

Elde edilen sonuç grafiğine göre;

- Preeklampsi hastalarının kordon dokularında ilgilenilen tüm genler için ekspresyon artışı gözlenmiştir. (3 numaralı preeklampsi hastasına ait TXLNGY geni hariç)

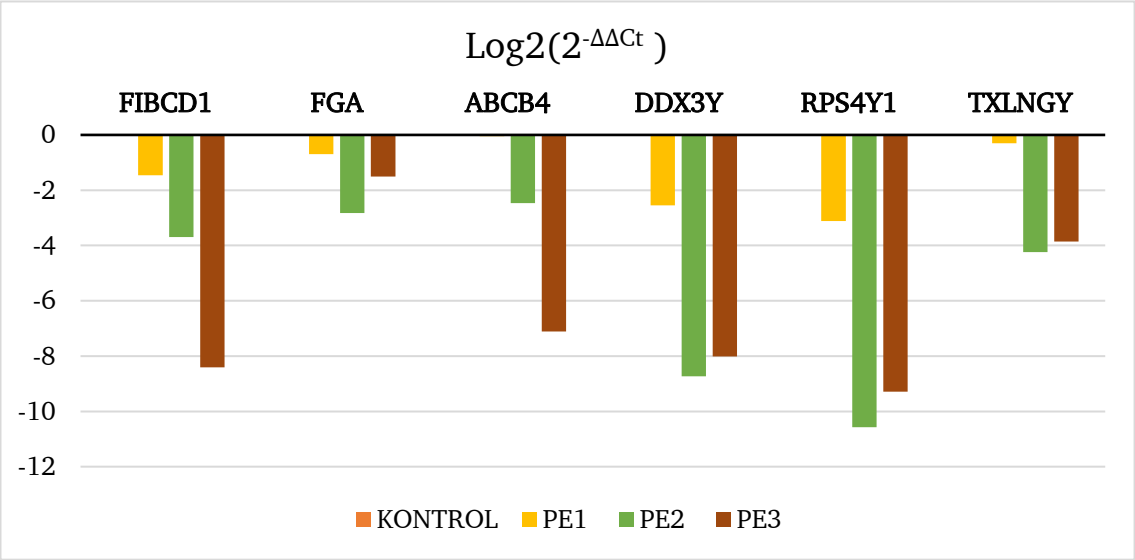



**Şekil 4.4** İlgilenilen genlerin kordon dokusuna ait ekspresyon seviyeleri

Plasental yatak dokularındaki ekspresyon seviyelerinin değişimi kontrol ve hasta gruplarında Şekil 4.5'teki gibi elde edilmiştir.

Plasental yatak dokuları için elde edilen sonuca göre;

- Preeklampsi hastalarının plasental yatak dokularında tüm genlerin ekspresyon seviyesinde kontrol grubuna kıyasla bir azalma gözlemlenmiştir.




**Şekil 4.5** Plasental yatak dokusu ekspresyon seviyeleri

## 4.3 Tartışma ve Öneriler

Preeklampsi gebeliğin ikinci yarısında ortaya çıkan ülkemizde ve tüm dünyada maternal-fetal morbidite ve mortalitenin önde gelen sebeplerinden biri olan hipertansif bir bozukluktur [142]. Preeklampsi hipertansiyon ve proteinüri ile klinik belirti göstermektedir. Proteinüri yokluğunda ise hipertansiyona ek olarak çoklu organ fonksiyon bozuklukları görülmektedir [2]. Preeklampsi gelişimine zemin hazırlayan genetik, çevresel, immünolojik olmak üzere birçok faktör bulunmaktadır. Bunlara nulliparite, çoğul gebelikler, önceki preeklampsi öyküsü, kronik hipertansiyon, ilk gebelikte >35 yaş, obezite, diyabet ve sigara kullanımı örnek gösterilmektedir [2]. Ayrıca böbrek hastalıkları, otoimmün bozukluklar, bağ dokusu hastalıkları gibi maternal bazı hastalıklar preeklampsinin ortaya çıkmasında oldukça önemlidir [10].

Teknolojinin ilerlemesi ile birlikte artan bilimsel çalışmalara rağmen hastalığın patogenezi halen net bir şekilde açıklanamamaktadır [43]. Preeklampsi patofizyolojisi üzerindeki bilinmezlik, preeklampsi için 'teoriler hastalığı' kavramınının sıkça kullanılmasına yol açmaktadır. Mevcut koşullarda preeklampsinin halen kesin bir tedavisi yoktur, hastalığın tek çözümü erken doğum ve plasentanın uzaklaştırılmasıdır [143]. Plasentanın uzaklaştırılması ile hastalığın klinik belirtilerinin son bulması preeklampsi ile ilgili çalışmaları plasenta üzerine yoğunlaştırmaktadır [144]. Son on yılda yapılan çalışmalar preeklampsinin anormal plasenta oluşumuna bağlı olarak geliştiğini göstermektedir [43]. Yetersiz trofoblastik invazyon sonucunda plasentada meydana gelen plasental hipoksi çeşitli biyoaktif faktörlerin plasentadan salınımını uyarmaktadır. Anormal plasentadan salınan sFLT-1 ve sEng gibi antianjiyogenik faktörler maternal dolaşımdaki VEGF ve PlGF gibi anjiyogenik faktörlere bağlanarak bir dengesizlik durumu geliştirmektedir [145]. Buna ek olarak bozulmuş plasenta yapısından proinflamatuar sitokinler, hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF), reaktif oksijen türleri (ROS) ve anjiyotensin tip 1 reseptör agonistik otoantikorlar (AT1-AA) da salınmaktadır. Bu faktörler endotel tabakasını hedef alarak hepatik renal ve serebral sistemde fonksiyon kaybına yol açmaktadır [45].

Preeklampsi gelişiminin bazı immünolojik faktörlerden kaynaklandığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. PE'de anormal plasenta yapısı ile birlikte NK ve dendritik hücrelerde artış gözlenmektedir. Artan immün yanıt sonucunda maternal dolaşımda bulunan IL-2, TNF- α ve İnterferon-γ gibi proinflamatuar sitokinlerin seviyesi önemli ölçüde yükselmektedir [73]. Ayrıca Th-1/Th-2 değişikliğinin de PE gelişmesine neden olduğu saptanmıştır. Preeklamptik gebelerde Th-1 aktivasyon artışı sonucunda da proenflamatuar sitokinlerin salınması ile hücresel immün yanıt oluşmaktadır. Bunun sonucunda sitotoksik T hücreleri ve NK hücreleri aktive olmaktadır [77].

Multifaktöriyel bir hastalık olan preeklampsi, altta yatan çeşitli faktörlerden etkilenerek maternal genlerin sorumluluğunda ortaya çıkmaktadır [146]. Preeklampsi ile ilişkili genlerin saptanmasına dayanan çalışmalarda gen anlatım profilleri araştırılmaktadır. Yapılan bir çalışma sonucunda PE gelişiminde ana rol oynayan genler FLT1, VEGFA ve FGA olarak belirlenmiştir [108].

Ayrıca plasentanın preeklampsi patofizyolojisinde merkezi olarak yer aldığının gösterilmesi için gen ekspresyon analiz yöntemleri de kapsamlı bir şekilde kullanılmaktadır [147], [148]. 2015'te yapılan bir çalışmada preeklamptik plasenta dokularından elde edilen transkriptomlar kullanılarak RNA-seq yardımıyla ekspresyonu değişen 53 gen belirlenmiştir. Çalışma kapsamında anlamlı derecede ifadeye sahip olan genler qPCR ile valide edilmiştir [25]. Yapılan bir başka çalışmada plasental gelişimde önemli rolü olan PlGF'nin preeklamptik plasenta örneklerindeki ekspresyon düzeyi qPCR ile belirlenmiştir. Çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin qPCR ile doğrulanması preeklampsinin patofizyolojik mekanizmalarının daha iyi anlaşılması için oldukça önemlidir [26].

Leavey ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalarda ise preeklampsinin heterojenitesi üzerine yoğunlaşılmaktadır. Çalışma kapsamında preeklamptik ve kontrol plasental dokularına ait DNA'lar izole edildikten sonra DNA'lar üzerinde metilasyon işlemi uygulanmıştır. Elde edilen metillenmiş DNA örnekleri üzerinden array çalışması yapılarak ifadesi değişen genler saptanmıştır. Çalışma sonucunda preeklampsi patofizyolojisinde epigenetik mekanizmaların rolü olduğu öne sürülmektedir [149].

Çalışma grubumuz tarafından önceden yapılan preeklampsi ile ilişkili plasenta, kordon ve plasental yatak dokularından oluşturulan RNA havuzlarının kullanıldığı RNA-seq analizi sonucunda 502 tane "farklı oranda eksprese olan genler" (DEGs) belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında, preeklampsi durumunda anlamlı olarak diferansiyel ekspresyona sahip genler arasından *FIBCD1*, *FGA*, *ABCB4*, *DDX3Y*, *RPS4Y1* ve *TXLNGY* genleri seçilerek Real-Time PCR analizi ile validasyon çalışmaları yapılması amaçlanmıştır.

Çalışma için öncelikle plasenta, kordon ve plasental yatak dokuları sıvı nitrojen içerisinde küçük parçalara ayrılarak homojenizasyon işlemi için ilk aşama tamamlanmıştır. Her bir dokudan total RNA izolasyonu yapıldıktan sonra RNA'ların kalite ve miktar tayini yapılmıştır. Spektrofotometrik ölçüm sonucunda A260/280 değeri 1,8-2,2 arasında olan RNA'ların qPCR işlemi için yeterli konsantrasyonda olduğu belirlenmiştir. Plasenta dokularının konsantrasyonu kordon ve plasental yatak dokularına göre daha fazla gözlenmiştir.

Real-Time PCR reaksiyonundan önce RNA örnekleri 50 ng/$\mu$L konsantrasyonda olacak şekilde hesaplandı. Sentezlenen primerler 10 $\mu$M konsantrasyon kullanılacak şekilde hazırlandı. 3 preeklampsi ve 1 kontrol grubu için tüm dokularda Real-Time PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

FIBCD1 hücre-hücre etkileşiminde görevli bir transmembran proteinidir. Plasenta dokusunda ekspresyon artışı gözlemlenmektedir. Preeklampsi ile ilişkisi bilinmemektedir [104]. Gerçekleştirilen Real-Time PCR sonuçlarında, FIBCD1 gen ekspresyonunun plasenta dokularında artarken kordon ve plasental yatak dokularında azaldığı tespit edildi.

FGA pıhtılaşmada görevlidir. Preeklamptik plasentada FGA ekspresyon artışı söz konusudur. Bu ekspresyon artışı trombofili durumunun oluşmasına yol açmaktadır. Plasental yatak dokusunda ise FGA gen ekspresyonunun azaldığı gösterilmektedir [107]. Sonuçlarımıza göre FGA geni plasentada yukarı eksprese olurken plasental yatak dokusunda aşağı eksprese olmuştur.

ABCB4 antijen sunumunda görevli bir protein ailesini kodlamaktadır. Preeklamptik plasentada ekspresyon artışı gözlenmektedir [150]. Sonuçlarımıza

göre ABCB4 geninin plasentada ekspresyon artışı saptanırken kordon ve plasental yatak dokusunda azalma gözlemlenmiştir.

DDX3Y, RPS4Y1 ve TXLNGY genleri Y kromozomu üzerinde lokalizedir.

DDX3Y geni ribozom biyogenezinde görevlidir ve preeklamptik erkek plasental dokularında yukarı ekspresyonu gösterilmektedir [151]. Çalışmamızın sonuçlarına göre tüm plasenta dokularında ekspresyon artışı gözlenirken kordon ve plasental yatak dokularında ekspresyonu azalmıştır.

RPS4Y1 geni bir ribozomal proteindir ve trofoblast istilasında görev almaktadır [120]. Preeklamptik plasenta dokusunda aşırı ekspresyonu trofoblast invazyon yetersizliğine yol açmaktadır. Bizim de Real-Time PCR sonuçlarımıza göre plasenta dokusunda ekspresyon artışı gözlemlenirken kordon ve plasental yatak dokularında ekspresyon sevisinde azalma gözlemlenmiştir.

TXLNGY geni de erkek fetal plasentalar üzerinde ekspresyon artışı göstermektedir. Çalışmamızın sonuçlarına göre plasenta dokularında ekspresyon artışı gözlenmiştir. Kordon dokusunda ise üç hasta grubu için ekspresyon artışı gözlenmiştir. Plasental yatak dokularında ekspresyonları beklendiği şekilde azalmıştır.

Elde edilen bulgulara göre preeklampsi ile ilişkili dokularda ekspresyonu saptanan *FIBCD1*, *FGA*, *ABCB4*, *DDX3Y*, *RPS4Y1* ve *TXLNGY* genleri sayesinde preeklampsi moleküler mekanizmasının ortaya çıkarılabileceği, bu genlerin preeklampsi öngörüsünde biyobelirteç olarak kullanılabilirliğinin gelecekteki çalışmalar için bir referans kaynağı olarak gösterilebileceği düşünülmektedir.

# KAYNAKÇA


[1] G. Temizkan and N. Arda, “Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri Genomik ve Proteomik Analizler.” Nobel Tıp Kitabevleri, 2021, [Online]. Available: https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ir01942a&AN=hmn.istanbuluniv..a74b523871c96833f77832df44353395&lang=tr&site=eds-live.

[2] J. M. Roberts, P. A. August, and G. et. a. Bakris, “Hypertension in Pregnancy,” *Obstet. Gynecol.*, vol. 122, no. 5, pp. 1122–1131, 2013.

[3] Z. Armaly, J. E. Jadaon, A. Jabbour, and Z. A. Abassi, “Preeclampsia: Novel mechanisms and potential therapeutic approaches,” *Frontiers in Physiology*, vol. 9, no. JUL. Frontiers Media S.A., Jul. 25, 2018, doi: 10.3389/fphys.2018.00973.

[4] M. Jiang, G. E. Lash, X. Zhao, Y. Long, C. Guo, and H. Yang, “CircRNA-0004904, CircRNA-0001855, and PAPP-A: Potential Novel Biomarkers for the Prediction of Preeclampsia,” *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 46, no. 6, pp. 2576–2586, May 2018, doi: 10.1159/000489685.

[5] K. J. Gray *et al.*, “Gene-centric analysis of preeclampsia identifies maternal association at PLEKHG1,” *Hypertension*, vol. 72, no. 2, pp. 408–416, 2018, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10688.

[6] F. R. Helmo *et al.*, “Angiogenic and antiangiogenic factors in preeclampsia,” *Pathol. Res. Pract.*, vol. 214, no. 1, pp. 7–14, 2018, doi: 10.1016/j.prp.2017.10.021.

[7] E. Eiland, C. Nzerue, and M. Faulkner, “Preeclampsia 2012,” *J. Pregnancy*, vol. 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/586578.

[8] Al-Jameil, “A Brief Overview of Preeclampsia,” *J. Clin. Med. Res.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–7, 2013, doi: 10.4021/jocmr1682w.

[9] N. C. Serrano, “Immunology and genetic of preeclampsia,” *Clin. Dev.*

*Immunol.*, vol. 13, no. 2–4, pp. 197–201, 2006, doi: 10.1080/17402520600876903.

[10] R. Nirupama, S. Divyashree, P. Janhavi, S. P. Muthukumar, and P. V. Ravindra, "Preeclampsia: Pathophysiology and management," *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.*, vol. 50, no. 2, p. 101975, 2021, doi: 10.1016/j.jogoh.2020.101975.

[11] G. J. Burton and E. Jauniaux, "What is the placenta?," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 213, no. 4, p. S6.e1-S6.e4, 2015, doi: 10.1016/j.ajog.2015.07.050.

[12] C. Lam, K. H. Lim, and S. A. Karumanchi, "Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia," *Hypertension*, vol. 46, no. 5, pp. 1077–1085, 2005, doi: 10.1161/01.HYP.0000187899.34379.b0.

[13] R. Nirupama, S. Divyashree, P. Janhavi, S. P. Muthukumar, and P. V. Ravindra, "Preeclampsia: Pathophysiology and management," *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, vol. 50, no. 2. Elsevier Masson s.r.l., Feb. 01, 2021, doi: 10.1016/j.jogoh.2020.101975.

[14] E. Shibata *et al.*, "Soluble fms-like tyrosine kinase 1 is increased in preeclampsia but not in normotensive pregnancies with small-for-gestational-age neonates: Relationship to circulating placental growth factor," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 90, no. 8, pp. 4895–4903, 2005, doi: 10.1210/jc.2004-1955.

[15] D. A. Shah and R. A. Khalil, "Bioactive factors in uteroplacental and systemic circulation link placental ischemia to generalized vascular dysfunction in hypertensive pregnancy and preeclampsia," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 95, no. 4, pp. 211–226, 2015, doi: 10.1016/j.bcp.2015.04.012.

[16] A. Casamassimi, A. Federico, M. Rienzo, S. Esposito, and A. Ciccodicola, "Transcriptome profiling in human diseases: New advances and perspectives," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 8, 2017, doi: 10.3390/ijms18081652.

[17] Y. Han, S. Gao, K. Muegge, W. Zhang, and B. Zhou, "Advanced applications

of RNA sequencing and challenges," *Bioinform. Biol. Insights*, vol. 9, pp. 29–46, 2015, doi: 10.4137/BBI.S28991.

[18] J. Tong, W. Zhao, H. Lv, W. P. Li, Z. J. Chen, and C. Zhang, "Transcriptomic Profiling in Human Decidua of Severe Preeclampsia Detected by RNA Sequencing," *J. Cell. Biochem.*, vol. 119, no. 1, pp. 607–615, Jan. 2018, doi: 10.1002/jcb.26221.

[19] K. Daniel A. Enquobahrie, MD, PhD, Margaret Meller, PhD, "Differential placental gene expression in preeclampsia," vol. 199, no. 5, 2009, doi: 10.1016/j.ajog.2008.04.020.Differential.

[20] N. Sun, S. Qin, L. Zhang, and S. Liu, "Roles of noncoding RNAs in preeclampsia," *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 19, no. 1. BioMed Central Ltd, Dec. 01, 2021, doi: 10.1186/s12958-021-00783-4.

[21] S. Sõber *et al.*, "Extensive shift in placental transcriptome profile in preeclampsia and placental origin of adverse pregnancy outcomes," *Sci. Rep.*, vol. 5, Aug. 2015, doi: 10.1038/srep13336.

[22] K. Leavey, S. L. Wilson, S. A. Bainbridge, W. P. Robinson, and B. J. Cox, "Epigenetic regulation of placental gene expression in transcriptional subtypes of preeclampsia," *Clin. Epigenetics*, vol. 10, no. 1, pp. 1–13, 2018, doi: 10.1186/s13148-018-0463-6.

[23] G. P. Brennan *et al.*, "RNA-sequencing analysis of umbilical cord plasma microRNAs from healthy newborns," *PLoS One*, vol. 13, no. 12, Dec. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0207952.

[24] M. Jiang, G. E. Lash, X. Zhao, Y. Long, C. Guo, and H. Yang, "CircRNA-0004904, CircRNA-0001855, and PAPP-A: Potential Novel Biomarkers for the Prediction of Preeclampsia," *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 46, no. 6, pp. 2576–2586, 2018, doi: 10.1159/000489685.

[25] T. Kaartokallio, A. Cervera, A. Kyllönen, K. Laivuori, J. Kere, and H. Laivuori, "Gene expression profiling of pre-eclamptic placentae by RNA sequencing," *Sci. Rep.*, vol. 5, Sep. 2015, doi: 10.1038/srep14107.

[26] P. Nikuei *et al.*, "Expression of placental growth factor mRNA in

preeclampsia," 2017.

[27] N. Deng, D. Lei, J. Huang, Z. Yang, C. Fan, and S. Wang, "Circular RNA expression profiling identifies hsa_circ_0011460 as a novel molecule in severe preeclampsia," *Pregnancy Hypertens.*, vol. 17, pp. 216–225, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.preghy.2019.06.009.

[28] P. de la Torre, M. Jesús Pérez-Lorenzo, and A. I. Flores, "Human Placenta-Derived Mesenchymal Stromal Cells: A Review from Basic Research to Clinical Applications," *Stromal Cells - Struct. Funct. Ther. Implic.*, 2019, doi: 10.5772/intechopen.76718.

[29] T. W. (Thomas W. . Sadler, *Langman's medical embryology*, no. July. 2012.

[30] "Embriyonik Gelişim Basamakları." .

[31] "Journey to Genes – a journey to your genes." https://journeytogenes.wordpress.com/.

[32] K. L. Moore, T. V. N. Persaud, and M. G. Torchia, *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. Saunders/Elsevier, 2013.

[33] B. W. J. Mol, C. T. Roberts, S. Thangaratinam, L. A. Magee, C. J. M. De Groot, and G. J. Hofmeyr, "Pre-eclampsia," *Lancet*, vol. 387, no. 10022, pp. 999–1011, 2016, doi: 10.1016/S0140-6736(15)00070-7.

[34] A. P. Mackay, C. J. Berg, and H. K. Atrash, "Pregnancy-related mortality from preeclampsia and eclampsia," *Obstet. Gynecol.*, vol. 97, no. 4, pp. 533–538, 2001, doi: 10.1016/S0029-7844(00)01223-0.

[35] B. Keskinkılıç *et al.*, "Maternal mortality due to hypertensive disorders in pregnancy, childbirth, and the puerperium between 2012 and 2015 in Turkey: A nation-based study," *J. Turkish Ger. Gynecol. Assoc.*, vol. 18, no. 1, pp. 20–25, Mar. 2017, doi: 10.4274/jtgga.2016.0244.

[36] D. V. Kanagal *et al.*, "Levels of serum calcium and magnesium in pre-eclamptic and normal pregnancy: A study from coastal India," *J. Clin. Diagnostic Res.*, vol. 8, no. 7, pp. 1–4, 2014, doi: 10.7860/JCDR/2014/8872.4537.

[37] Z. B. Tuzcu, E. Asicioglu, M. Sunbul, B. Ozben, H. Arikan, and M. Koc, “Circulating endothelial cell number and markers of endothelial dysfunction in previously preeclamptic women,” *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 213, no. 4, pp. 533.e1-533.e7, 2015, doi: 10.1016/j.ajog.2015.06.043.

[38] E. Nilsson, H. S. Ros, S. Cnattingius, and P. Lichtenstein, “The importance of genetic and environmental effects for pre-eclampsia and gestational hypertension: A family study,” *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.*, vol. 111, no. 3, pp. 200–206, 2004, doi: 10.1111/j.1471-0528.2004.00042x.x.

[39] J. M. FAUPEL-BADGER and T. F. MCELRATH, “Maternal Circulating Angiogenic Factors in Twin and Singleton Pregnancies,” *Am J Obs. Gynecol*, vol. 212, no. 5, pp. 636.e1–636.e8., 2016, doi: 10.1016/j.ajog.2014.11.035.

[40] J. M. Roberts and D. W. Cooper, “Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia,” 2001.

[41] M. Zhang *et al.*, “Preeclampsia among African American Pregnant Women: An Update on Prevalence, Complications, Etiology, and Biomarkers,” *Obstet. Gynecol. Surv.*, vol. 75, no. 2, pp. 111–120, 2020, doi: 10.1097/OGX.0000000000000747.

[42] A. RAJKOVIC, K. MAHOMED, M. R. MALINOW, T. K. SORENSON, G. B. WOELK, and M. A. WILLIAMS, “Plasma Homocyst(e)ine Concentrations in Eclamptic and Preeclamptic African Women Postpartum,” *Obstet. Gynecol.*, vol. 94, no. 3, pp. 355–360, 1999, doi: 10.1097/00006250-199909000-00007.

[43] K. R. Palmer *et al.*, “Placental-Specific sFLT-1 e15a Protein Is Increased in Preeclampsia, Antagonizes Vascular Endothelial Growth Factor Signaling, and Has Antiangiogenic Activity,” *Hypertension*, vol. 66, no. 6, pp. 1251–1259, 2015, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05883.

[44] E. Irge, Z. Halici, M. Yilmaz, E. Cadirci, and E. Karakus, “Evaluation of 5-HT7 receptor expression in the placentae of normal and pre-eclamptic women,” *Clin. Exp. Hypertens.*, vol. 38, no. 2, pp. 189–193, 2016, doi: 10.3109/10641963.2015.1081215.

[45] H. Qu and R. A. Khalil, “Vascular mechanisms and molecular targets in hypertensive pregnancy and preeclampsia,” 2020, doi: 10.1152/ajpheart.00202.2020.

[46] R. J. Levine and S. E. Maynard, “Circulating Angiogenic Factors and the Risk of Preeclampsia,” *Survey of Anesthesiology*, vol. 49, no. 1. pp. 14–15, 2005, doi: 10.1097/01.sa.0000151206.53344.39.

[47] C. M. Salafia, J. C. Pezzullo, J. A. López-Zeno, S. Simmens, V. K. Minior, and A. M. Vintzileos, “Placental pathologic features of preterm preeclampsia,” *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 173, no. 4, pp. 1097–1105, 1995, doi: 10.1016/0002-9378(95)91333-5.

[48] S. N. Selçuk and M. Yurdakök, “Preeklamptik anne bebekleri,” 2015.

[49] J. W. Meekins, R. Pijnenborg, M. Hanssens, I. R. MCFadyen, and A. van Asshe, “A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies,” *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.*, vol. 101, no. 8, pp. 669–674, 1994, doi: 10.1111/j.1471-0528.1994.tb13182.x.

[50] E. Bell, “A bad combination,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 4, no. 2, p. 927, 2004, doi: 10.1074/jbc.M405204200.

[51] J. S. Gilbert, S. A. B. Gilbert, M. Arany, and J. P. Granger, “Hypertension produced by placental ischemia in pregnant rats is associated with increased soluble endoglin expression.,” *Hypertension*, vol. 53, no. 2, pp. 399–403, 2009, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.123513.

[52] Y. Bdolah, V. P. Sukhatme, and S. A. Karumanchi, “Angiogenic imbalance in the pathophysiology of preeclampsia: Newer insights,” *Semin. Nephrol.*, vol. 24, no. 6 SPEC.ISS., pp. 548–556, 2004, doi: 10.1016/j.semnephrol.2004.07.003.

[53] I. Agarwal and S. A. Karumanchi, “Preeclampsia and the anti-angiogenic state,” *Pregnancy Hypertens.*, vol. 1, no. 1, pp. 17–21, 2011, doi: 10.1016/j.preghy.2010.10.007.

[54] N. Pooneh, M. Kianoosh, R. Minoo, N. Azim, and G. Nasrin, “Review article:

The imbalance in expression of angiogenic and antiangiogenic factors could be as candidate predictive biomarker in preeclampsia," *Prenat. Diagn.*, vol. 35, no. 5, pp. 74–75, 2015, [Online]. Available: http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L72072335%0Ahttp://dx.doi.org/10.1002/pd.4617.

[55] H. He, V. J. Venema, X. Gu, R. C. Venema, M. B. Marrero, and R. B. Caldwell, "Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through Flk-1/KDR activation of c-Src," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 35, pp. 25130–25135, 1999, doi: 10.1074/jbc.274.35.25130.

[56] S. E. Maynard *et al.*, "Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia," *J. Clin. Invest.*, vol. 111, no. 5, pp. 649–658, 2003, doi: 10.1172/jci200317189.

[57] J. M. Foidart, J. P. Schaaps, F. Chantraine, C. Munaut, and S. Lorquet, "Dysregulation of anti-angiogenic agents (sFlt-1, PLGF, and sEndoglin) in preeclampsia-a step forward but not the definitive answer," *Journal of Reproductive Immunology*, vol. 82, no. 2. Elsevier Ireland Ltd, pp. 106–111, 2009, doi: 10.1016/j.jri.2009.09.001.

[58] M. Olaya-c, M. Garrido, J. Hernandez-losa, and M. Sesé, "The umbilical cord , preeclampsia and the VEGF family," pp. 783–795, 2018.

[59] V. Eremina *et al.*, "CIHR Author Manuscript VEGF Inhibition and Renal Thrombotic Microangiopathy," vol. 358, no. 11, pp. 1129–1136, 2008, doi: 10.1056/NEJMoa0707330.VEGF.

[60] Y. G. Kim *et al.*, "Vascular endothelial growth factor accelerates renal recovery in experimental thrombotic microangiopathy," *Kidney Int.*, vol. 58, no. 6, pp. 2390–2399, 2000, doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.00422.x.

[61] T. Krauss, H. U. Pauer, and H. G. Augustin, "Prospective Analysis of Placenta Growth Factor (PlGF) Concentrations in the Plasma of Women with Normal Pregnancy and Pregnancies Complicated by Preeclampsia," *Hypertens.*

*Pregnancy*, vol. 23, no. 1, pp. 101–111, 2004, doi: 10.1081/PRG-120028286.

[62] Z. Liu, G. B. Afink, and P. Ten Dijke, "Soluble fms-like tyrosine kinase 1 and soluble endoglin are elevated circulating anti-angiogenic factors in pre-eclampsia," *Pregnancy Hypertens.*, vol. 2, no. 4, pp. 358–367, 2012, doi: 10.1016/j.preghy.2012.06.003.

[63] S. Ahmad and A. Ahmed, "Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia," *Circ. Res.*, vol. 95, no. 9, pp. 884–891, 2004, doi: 10.1161/01.RES.0000147365.86159.f5.

[64] Y. Bdolah *et al.*, "Circulating angiogenic proteins in trisomy 13," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 194, no. 1, pp. 239–245, 2006, doi: 10.1016/j.ajog.2005.06.031.

[65] M. I. March *et al.*, "Circulating angiogenic factors and the risk of adverse outcomes among Haitian women with preeclampsia," *PLoS One*, vol. 10, no. 5, pp. 1–12, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0126815.

[66] R. Thadhani *et al.*, "Removal of soluble fms-like tyrosine kinase-1 by dextran sulfate apheresis in preeclampsia," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 27, no. 3, pp. 903–913, 2016, doi: 10.1681/ASN.2015020157.

[67] Y. Gu *et al.*, "Fasudil attenuates soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1)-induced hypertension in pregnant mice through RhoA/ROCK pathway," *Oncotarget*, vol. 8, no. 61, pp. 104104–104112, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.22017.

[68] R. Hastie *et al.*, "EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) signaling and the mitochondria regulate sFlt-1 (Soluble FMS-Like Tyrosine Kinase-1) secretion," *Hypertension*, vol. 73, no. 3, pp. 659–670, 2019, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12300.

[69] K. Gaber, E. Hamdy, and A. Hanafy, "Soluble Endoglin as a new marker for prediction of pre-eclampsia in early pregnancy," *Middle East Fertil. Soc. J.*, vol. 15, no. 1, pp. 42–46, 2010, doi: 10.1016/j.mefs.2010.03.009.

[70] S. Venkatesha *et al.*, “Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia,” *Nat. Med.*, vol. 12, no. 6, pp. 642–649, 2006, doi: 10.1038/nm1429.

[71] S. Djurisic and T. V. F. Hviid, “HLA class Ib molecules and immune cells in pregnancy and preeclampsia,” *Front. Immunol.*, vol. 5, no. DEC, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00652.

[72] A. Moffett-King, “Natural killer cells and pregnancy,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 2, no. 9, pp. 656–663, 2002, doi: 10.1038/nri886.

[73] D. Barrera, L. Díaz, N. Noyola-Martínez, and A. Halhali, “Vitamin D and inflammatory cytokines in healthy and preeclamptic pregnancies,” *Nutrients*, vol. 7, no. 8, pp. 6465–6490, 2015, doi: 10.3390/nu7085293.

[74] D. Goswamia *et al.*, “Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset pre-eclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction,” *Placenta*, vol. 27, no. 1, pp. 56–61, 2006, doi: 10.1016/j.placenta.2004.11.007.

[75] M. H. Larsen *et al.*, “Human leukocyte antigen-G in the male reproductive system and in seminal plasma,” *Mol. Hum. Reprod.*, vol. 17, no. 12, pp. 727–738, 2011, doi: 10.1093/molehr/gar052.

[76] E. B. Başkan, “T hücre immunitesi,” *Turkderm Deri Hast. ve Frengi Ars.*, vol. 47, no. SUPPL.1, pp. 18–23, 2013, doi: 10.4274/turkderm.47.s3.

[77] S. Saito and M. Sakai, “Th1/Th2 balance in preeclampsia,” *J. Reprod. Immunol.*, vol. 59, no. 2, pp. 161–173, 2003, doi: 10.1016/S0165-0378(03)00045-7.

[78] F. Xie, P. von Dadelszen, and J. Nadeau, “CMV Infection, TLR-2 and -4 Expression, and Cytokine Profiles in Early-Onset Preeclampsia with HELLP Syndrome,” *Am. J. Reprod. Immunol.*, vol. 71, no. 4, pp. 379–386, 2014, doi: 10.1111/aji.12199.

[79] R. James M., T. Robert N, and G. Alan, “Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia,” *Am. J. Hypertens.*, vol. 4, no. 8, pp. 700–708, 1991, doi:

10.1093/ajh/4.8.700.

[80] C. A. Hubel, M. K. McLaughlin, R. W. Evans, B. A. Hauth, C. J. Sims, and J. M. Roberts, “Fasting serum triglycerides, free fatty acids, and malondialdehyde are increased in preeclampsia, are positively correlated, and decrease within 48 hours post partum,” *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 174, no. 3, pp. 975–982, 1996, doi: 10.1016/S0002-9378(96)70336-8.

[81] G. Loverro, P. Greco, F. Capuano, D. Carone, G. Cormio, and L. Selvaggi, “Lipoperoxidation and antioxidant enzymes activity in pregnancy complicated with hypertension,” *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, vol. 70, no. 2, pp. 123–127, 1996, doi: 10.1016/S0301-2115(95)02561-8.

[82] T. Kaartokallio, A. Cervera, A. Kyllönen, K. Laivuori, J. Kere, and H. Laivuori, “Gene expression profiling of pre-eclamptic placentae by RNA sequencing,” *Sci. Rep.*, vol. 5, 2015, doi: 10.1038/srep14107.

[83] M. Loset and S. B. Mundal, “A transcriptional profile of the decidua in preeclampsia,” *NIH Public Access*, vol. 204, no. 1, pp. 1–27, 2011, doi: 10.1016/j.ajog.2010.08.043.A.

[84] M. A. Mohamad, N. F. M. Manzor, N. F. Zulkifli, N. Zainal, A. R. Hayati, and A. W. A. Asnawi, “A review of candidate genes and pathways in preeclampsia–An integrated bioinformatical analysis,” *Biology (Basel).*, vol. 9, no. 4, 2020, doi: 10.3390/biology9040062.

[85] M. Løset *et al.*, “A transcriptional profile of the decidua in preeclampsia,” *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 204, no. 1, pp. 84.e1-84.e27, 2011, doi: 10.1016/j.ajog.2010.08.043.

[86] Y. Lv *et al.*, “Roles of microRNAs in preeclampsia,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 234, no. 2, pp. 1052–1061, 2019, doi: 10.1002/jcp.27291.

[87] C. T. Lee, T. Risom, and W. M. Strauss, “Evolutionary conservation of microRNA regulatory circuits: An examination of microRNA gene complexity and conserved microRNA-target interactions through metazoan phylogeny,” *DNA Cell Biol.*, vol. 26, no. 4, pp. 209–218, 2007, doi: 10.1089/dna.2006.0545.

[88] M. P. Gantier *et al.*, “Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. 13, pp. 5692–5703, 2011, doi: 10.1093/nar/gkr148.

[89] M. Tsamou *et al.*, “Genome-wide microRNA expression analysis in human placenta reveals sex-specific patterns: an ENVIRONAGE birth cohort study,” *Epigenetics*, vol. 16, no. 4, pp. 373–388, 2021, doi: 10.1080/15592294.2020.1803467.

[90] X. Li, C. Li, X. Dong, and W. Gou, “MicroRNA-155 inhibits migration of trophoblast cells and contributes to the pathogenesis of severe preeclampsia by regulating endothelial nitric oxide synthase,” *Mol. Med. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 550–554, 2014, doi: 10.3892/MMR.2014.2214.

[91] Y. N. Fang *et al.*, “Highly expressed miR-182-5p can promote preeclampsia progression by degrading RND3 and inhibiting HTR-8/SVneo cell invasion,” *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, vol. 22, no. 20, pp. 6583–6590, 2018, doi: 10.26355/EURREV_201810_16132.

[92] X. Zhou *et al.*, “The aberrantly expressed miR-193b-3p contributes to preeclampsia through regulating transforming growth factor-β signaling,” *Sci. Reports 2016 61*, vol. 6, no. 1, pp. 1–13, Jan. 2016, doi: 10.1038/srep19910.

[93] F. Hong, Y. Li, and Y. Xu, “Decreased placental miR-126 expression and vascular endothelial growth factor levels in patients with pre-eclampsia,” *J. Int. Med. Res.*, vol. 42, no. 6, pp. 1243–1251, Dec. 2014, doi: 10.1177/0300060514540627.

[94] L. Han, Q. qing Luo, M. gang Peng, Y. Zhang, and X. hui Zhu, “miR-483 is downregulated in pre-eclampsia via targeting insulin-like growth factor 1 (IGF1) and regulates the PI3K/Akt/mTOR pathway of endothelial progenitor cells,” *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, vol. 47, no. 1, pp. 63–72, 2021, doi: 10.1111/jog.14412.

[95] C. Akehurst *et al.*, “Differential expression of microRNA-206 and its target genes in preeclampsia,” *J. Hypertens.*, vol. 33, no. 10, p. 2068, 2015, doi:

10.1097/HJH.0000000000000656.

[96] P. Li *et al.*, “microRNA-29b contributes to pre-eclampsia through its effects on apoptosis, invasion and angiogenesis of trophoblast cells,” *Clin. Sci.*, vol. 124, pp. 27–40, 2013, doi: 10.1042/CS20120121.

[97] S. Ismail and M. Essawi, “Genetic polymorphism studies in humans,” *Middle East J. Med. Genet.*, vol. 1, no. 2, pp. 57–63, 2012, doi: 10.1097/01.mxe.0000415225.85003.47.

[98] S. E. Ayoub *et al.*, “Association of MicroRNA-155rs767649 Polymorphism with Susceptibility to Preeclampsia,” *Int. J. Mol. Cell. Med.*, vol. 8, no. 4, pp. 247–257, 2019, doi: 10.22088/IJMCM.BUMS.8.4.247.

[99] M. Asadi-Tarani, M. Saravani, B. Teimoori, M. Ghasemi, and S. Salimi, “The relationships between maternal and placental polymorphisms of miR-196a2 and miRNA-499 genes and preeclampsia,” *Br. J. Biomed. Sci.*, vol. 77, no. 4, pp. 191–195, 2020, doi: 10.1080/09674845.2020.1769331.

[100] N. Franceschini *et al.*, “Genome-wide association analysis of blood-pressure traits in african-ancestry individuals reveals common associated genes in African and Non-African populations,” *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 93, no. 3, pp. 545–554, 2013, doi: 10.1016/j.ajhg.2013.07.010.

[101] M. Traylor *et al.*, “Genetic variation in PLEKHG1 is associated with white matter hyperintensities (n = 11,226),” *Neurology*, vol. 92, no. 8, pp. E749–E757, 2019, doi: 10.1212/WNL.0000000000006952.

[102] S. P. Barrett and J. Salzman, “Circular RNAs: Analysis, expression and potential functions,” *Dev.*, vol. 143, no. 11, pp. 1838–1847, 2016, doi: 10.1242/dev.128074.

[103] Y. Ou *et al.*, “The expression profile of circRNA and its potential regulatory targets in the placentas of severe pre-eclampsia,” *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 58, no. 6, pp. 769–777, 2019, doi: 10.1016/j.tjog.2019.09.007.

[104] S. von Huth *et al.*, “Immunohistochemical Localization of Fibrinogen C Domain Containing 1 on Epithelial and Mucosal Surfaces in Human

Tissues," *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 66, no. 2, pp. 85–97, 2018, doi: 10.1369/0022155417743694.

[105] Ensembl, "Ensembl Genome Browser homepage." 2021.

[106] "GeneCards - Human Genes | Gene Database | Gene Search," *Genecards.org*, 2017. https://www.genecards.org/.

[107] A. V. Timofeeva *et al.*, "Mirnas and their gene targets—a clue to differentiate pregnancies with small for gestational age newborns, intrauterine growth restriction, and preeclampsia," *Diagnostics*, vol. 11, no. 4, 2021, doi: 10.3390/DIAGNOSTICS11040729.

[108] F. A. Amezquita *et al.*, "Placental transcriptomic profile by RNA sequencing in Preeclampsia with Severe Features," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 226, no. 1, pp. S287–S288, 2022, doi: 10.1016/j.ajog.2021.11.487.

[109] "ABCB4 Gene - GeneCards _ MDR3 Protein _ MDR3 Antibody." https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ABCB4.

[110] Y. Bacq *et al.*, "ABCB4 gene mutations and single-nucleotide polymorphisms in women with intrahepatic cholestasis of pregnancy," *J. Med. Genet.*, vol. 46, no. 10, pp. 711–715, 2009, doi: 10.1136/jmg.2009.067397.

[111] S. S. Batool, M. Dauer, S. N. Weber, R. Liebe, F. Lammert, and M. C. Reichert, "Intrahepatic cholestasis of pregnancy in conjunction with a frameshift deletion in FGFR4," *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.*, vol. 46, no. 3, p. 101800, 2022, doi: 10.1016/j.clinre.2021.101800.

[112] E. Ahishali, "Liver diseases associated with pregnancy," *Marmara Med. J.*, vol. 25, no. 2, pp. 58–63, 2012, doi: 10.5472/MMJ.2012.02383.1.

[113] C. S. Yule, D. S. Holcomb, A. C. Kraus, C. E. L. Brown, D. D. McIntire, and D. B. Nelson, "Cholestasis: A Prospective Study of Perinatal Outcomes and Time to Symptom Improvement," *Am. J. Perinatol.*, vol. 38, no. 5, pp. 414–420, 2021, doi: 10.1055/s-0040-1717076.

[114] J. Strutz *et al.*, "Gestational diabetes alters microRNA signatures in human feto-placental endothelial cells depending on fetal sex," *Clin. Sci.*, vol. 132,

no. 22, pp. 2437–2449, 2018, doi: 10.1042/CS20180825.

[115] B. D. Taylor *et al.*, “The impact of female fetal sex on preeclampsia and the maternal immune milieu,” *Pregnancy Hypertens.*, vol. 12, no. August 2017, pp. 53–57, 2018, doi: 10.1016/j.preghy.2018.02.009.

[116] T. L. Gonzalez *et al.*, “Sex differences in the late first trimester human placenta transcriptome,” *Biol. Sex Differ.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–23, 2018, doi: 10.1186/s13293-018-0165-y.

[117] “DDX3Y protein ifadesi özeti - İnsan Protein Atlası.” https://www.proteinatlas.org/ENSG00000067048-DDX3Y.

[118] W. S. Liu, A. Wang, Y. Yang, T. C. Chang, E. Landrito, and H. Yasue, “Molecular characterization of the DDX3Y gene and its homologs in cattle,” *Cytogenet. Genome Res.*, vol. 126, no. 4, pp. 318–328, 2010, doi: 10.1159/000266168.

[119] W. E. Ackerman, I. A. Buhimschi, T. L. Summerfield, G. Zhao, M. B. Landon, and C. S. Buhimschi, “264: In preeclampsia (PE), placental tissues display specific expression of sexually dimorphic genes,” *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 218, no. 1, p. S169, 2018, doi: 10.1016/j.ajog.2017.10.192.

[120] X. Chen *et al.*, “Dysregulated Expression of RPS4Y1 (Ribosomal Protein S4, Y-Linked 1) Impairs STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) Signaling to Suppress Trophoblast Cell Migration and Invasion in Preeclampsia,” *Hypertension*, vol. 71, no. 3, pp. 481–490, 2018, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10250.

[121] E. M. Sedlmeier *et al.*, “Human placental transcriptome shows sexually dimorphic gene expression and responsiveness to maternal dietary n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid intervention during pregnancy,” *BMC Genomics*, vol. 15, no. 1, 2014, doi: 10.1186/1471-2164-15-941.

[122] H. Pearson, “What is a gene?,” *Nature*, vol. 441, pp. 399–401, 2006.

[123] B. Kuska, “Beer, Bethesda, and biology: how ‘genomics’ came into being.,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 90, no. 2, p. 93, 1998, doi: 10.1093/jnci/90.2.93.

[124] "What is genomics? | Functional genomics I." [Online]. Available: https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/functional-genomics-i-introduction-and-design/what-is-genomics/.

[125] N. Kurt, "KÖPEKLERDE TELOMERAZ mRNA (dogTERT) EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ," 2014.

[126] M. Sar *et al.*, "Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi ile Transkriptom Analizi Transcriptome Analysis Using Next Generation Sequencing," *Deney. Tıp Araştırma Enstitüsü Derg.*, vol. 5, no. 10, pp. 51–59, 2016.

[127] A. Jacquier, "The complex eukaryotic transcriptome: Unexpected pervasive transcription and novel small RNAs," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 10, no. 12, pp. 833–844, 2009, doi: 10.1038/nrg2683.

[128] K. B. Mullis, "The unusual origin of the polymerase chain reaction," *Sci. Am.*, vol. 262, no. 4, pp. 56–65, 1990, doi: 10.1038/scientificamerican0490-56.

[129] J. A. Carriço, A. J. Sabat, A. W. Friedrich, and M. Ramirez, "Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR)," *J Invest Dermatol.*, vol. 3, no. 18, 2013, doi: 10.1038/jid.2013.1.

[130] R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger, and R. Watson, "Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions," *Bio/Technology*, vol. 11, no. 9, pp. 1026–1030, 1993, doi: 10.1038/nbt0993-1026.

[131] P. Kralik and M. Ricchi, "A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything," *Front. Microbiol.*, vol. 8, no. FEB, pp. 1–9, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.00108.

[132] E. K. Bayrak, N. E. Ünaltuna, G. Ad, D. Tıp, A. Enstitüsü, and İ. Üniversitesi, "Gen Anlatımı Analiz Yöntemlerine Genel Bakış An Overview of Gene Expression Analysis Methods," no. Tablo 1, pp. 28–35.

[133] S. Letter, "Gen Anlatımının Kantitatif Analizi 'Real-Time PCR,'" pp. 763–767, 2007.

[134] D. A. C. Simpson, S. Feeney, C. Boyle, and A. W. Stitt, "Retinal VEGF mRNA measured by SYBR Green I fluorescence: A versatile approach to

quantitative PCR," *Mol. Vis.*, vol. 6, no. 24, pp. 178–183, 2000.

[135] D. W. Kim, "Real time quantitative PCR," *Exp. Mol. Med.*, vol. 33, no. 1 Suppl, pp. 101–109, 2001, doi: 10.1016/b978-012372185-3/50024-9.

[136] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.

[137] and A. G.-S. Ignacio San Segundo-Val , Virginia García-Solaesa, *Molecular Genetics of Asthma Chapter 4 ""Real-Time PCR for Gene Expression Quantifi cation in Asthma.""* 2016.

[138] M. W. Pfaffl, "Quantification strategies in real-time PCR," in *A-Z of quantitative PCR*, vol. Chapter 3, 2004, pp. 87–112.

[139] K. Dheda, J. F. Huggett, S. A. Bustin, M. A. Johnson, G. Rook, and A. Zumla, "Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR," *Biotechniques*, vol. 37, no. 1, 2004.

[140] B. GeneAll, *Hyrib-R Total RNA Isolation From Tissues and Cultured Cells*. 2017.

[141] *Spektrofotometre'nin çalışma prensibi*. .

[142] Z. Armaly, J. E. Jadaon, A. Jabbour, and Z. A. Abassi, "Preeclampsia: Novel mechanisms and potential therapeutic approaches," *Front. Physiol.*, vol. 9, no. JUL, pp. 1–15, 2018, doi: 10.3389/fphys.2018.00973.

[143] J. P. Granger, B. T. Alexander, M. T. Llinas, W. A. Bennett, and R. A. Khalil, "Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction.," *Hypertension*, vol. 38, no. 3 Pt 2, pp. 718–722, 2001, doi: 10.1161/01.hyp.38.3.718.

[144] B. Sibai, G. Dekker, M. Kupferminc, and A. S. Way, "Pre-eclampsia," 2005.

[145] E. Shibata *et al.*, "Soluble fms-like tyrosine kinase 1 is increased in preeclampsia but not in normotensive pregnancies with small-for-gestational-age neonates: Relationship to circulating placental growth factor," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 90, no. 8, pp. 4895–4903, Aug.

2005, doi: 10.1210/jc.2004-1955.

[146] S. T. Chelbi and D. Vaiman, “Genetic and epigenetic factors contribute to the onset of preeclampsia,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 282, no. 1–2, pp. 120–129, 2008, doi: 10.1016/j.mce.2007.11.022.

[147] Z. Awamleh, G. B. Gloor, and V. K. M. Han, “Placental microRNAs in pregnancies with early onset intrauterine growth restriction and preeclampsia: Potential impact on gene expression and pathophysiology,” *BMC Med. Genomics*, vol. 12, no. 1, Jun. 2019, doi: 10.1186/s12920-019-0548-x.

[148] N. Sun, S. Qin, L. Zhang, and S. Liu, “Roles of noncoding RNAs in preeclampsia,” *Reprod. Biol. Endocrinol.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–20, 2021, doi: 10.1186/s12958-021-00783-4.

[149] K. Leavey, S. L. Wilson, S. A. Bainbridge, W. P. Robinson, and B. J. Cox, “Epigenetic regulation of placental gene expression in transcriptional subtypes of preeclampsia,” *Clin. Epigenetics*, vol. 10, no. 1, Mar. 2018, doi: 10.1186/s13148-018-0463-6.

[150] Y. Bacq, “Liver diseases unique to pregnancy: A 2010 update,” *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.*, vol. 35, no. 3, pp. 182–193, 2011, doi: 10.1016/j.clinre.2010.11.011.

[151] D. Hoch, B. Novakovic, S. Cvitic, R. Saffery, G. Desoye, and A. Majali-Martinez, “Sex matters: XIST and DDX3Y gene expression as a tool to determine fetal sex in human first trimester placenta,” *Placenta*, vol. 97, pp. 68–70, 2020, doi: 10.1016/j.placenta.2020.06.016.

# A

# ETIK KURUL RAPORU

İÜC Tarih ve Sayı: 04/04/2019-53653

*BE84EDYVA*

T.C.
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı :83045809-604.01.02-
Konu :Uzm.Öğr.Dr.Kübra HAMZAOĞLU'nun etik kurul kararı A-42

**KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA**

İlgi :06.02.2019 tarih, 52825153-604.01.01-20830 sayılı yazı

Anabilim Dalınız öğretim üyesi **Prof.Dr.Rıza MADAZLI'nın** danışmanlığında **Uzm.Öğr.Dr.Kübra HAMZAOĞLU'nun** yürütücülüğünde **Doç.Dr.Nehir Özdemir ÖZGENTÜRK ve Uzm.Öğr.Dr.Melike MAKUL'un** yardımcılığında **"Preeklampsili Hastaların Plasenta ve İlişkili Dokularında Gen Ekspresyon Profilinin RNA seq ile Belirlenmesi"** başlıklı çalışma hakkında ilgi yazınız ve ekleri **02 Nisan 2019** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Başkan

e-İmzalı
Prof. Dr. Gökhan İPEK
Bölüm Başkanı

NOT: Yönetmelik gereği Sonuç Raporunun Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna iletilmesi gerekmektedir.

mail gönderildi 5.4.2019'da

EK :
1 dosya elden teslim edilecektir.

Doğrulamak İçin:http://dogrulama.istanbulc.edu.tr/enVision.sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BE84EDYVA

Ayrıntılı bilgi için irtibat : Güler SOYDANER Dahili : 22300

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL
Tel : 0 (212) 414 30 00 Faks : 0 (212) 632 00 33
e-posta : ctfpersonel@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbulc.edu.tr

# TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

## Konferans Bildirileri

1. Z. Şimşek, R. Madazlı, K. Hamzaoğlu, Z. Ömeroğlu Ulu, N. Özdemir Özgentürk, "Preeklampsili Hastalarda VEGF-A Geninin Plasental ve İlişkili Dokular Arasındaki Ekspresyon Seviyelerinin Analiz Edilmesi," 10. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi Bildiri Özet Kitabı, s. 46, 18 Aralık 2021.

## Projeler

1. Z. Şimşek, N. Özdemir Özgentürk, "Preeklampsi Hastaların Plasenta, Plasenta Yatağı ve Kordon Dokusunda Gen Ekspresyon Analizi," YTÜ BAP Y. Lisans, FYL-2020-3844.