

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI
BAŞKAN: PROF.DR. NİYAZİ AŞKAR

**PREEKLAMPSİ İLE VE PREEKLAMPSİ VE İNTRAUTERİN
GELİŞME GERİLİĞİ İLE KOMPLİKE OLAN GEBELİKLERE AİT
PLASENTALARDA İNSAN TELOMERAZ REVERZ
TRANSKRİPTAZ (hTERT) GEN EKSPRESYONUNUN
DEĞERLENDİRİLMESİ VE NORMAL GEBELİKLERE AİT
PLASENTALARLA KARŞILAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. GÖKAY ÖZÇELTİK**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. NEDİM KARADADAŞ**

**İZMİR
2015**

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, başta anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Niyazi AŞKAR olmak üzere tüm değerli hocalarıma destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemedikleri için en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez danışmanım olarak bana çalışmalarımda yol gösteren, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, bu zorlu süreçte desteğini esirgemeyen ve her zaman güven aşılayan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nedim KARADADAŞ'a, vermiş olduğu emekten dolayı çok teşekkür ederim.

Tezimin tasarım ve sürdürülme aşamasında, büyük yardımlarını gördüğüm Doç. Dr. Ahmet Mete Ergenoğlu'na ve Doç. Dr. Ahmet Özgür YENİEL'e vermiş oldukları emek ve katkılardan ötürü çok teşekkür ederim.

Tezde araştırılan doku örneklerinin çalışılması ve sonuçların değerlendirilmesi konusunda verdikleri destek ve yardımlardan ötürü Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Nur Selvi GÜNEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Gökay ÖZÇELTİK

İÇİNDEKİLER

TABLolar LİSTESİ.....	IV
KISALTMALAR.....	V
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Gebelikte Hipertansif Hastalıklar	2
2.2 İntrauterin Gelişme Geriliği	12
2.3 Telomer Biyolojisi.....	17
3. MATERYAL METOD	23
4. BULGULAR	30
5. TARTIŞMA.....	35
6. SONUÇ.....	41
7. ÖZET	42
8. KAYNAKLAR	44

TABLÖLAR LİSTESİ

TABLÖLAR

Tablo 1: Gebelikte hipertansif hastalıklar

Tablo 2: Gestasyonel hipertansif bozukluklarda hastalığın şiddet göstergeleri

Tablo 3: Şiddetli Preeklampsi tanısı için “American Congress of Obstetrics and Gynecology” kriterleri

Tablo 4: İntrauterin Büyüme Geriliği İçin Maternal Risk Faktörleri

Tablo 5: İUGR de fetal, plasental ve maternal risk faktörleri

Tablo 6: Çalışma gruplarının demografik özellikleri ve kontrol grubuyla karşılaştırması

Tablo 7: Gruplarda hTERT mRNA ekspresyon değerlerinin ortalamaları ve çalışma gruplarının kontrol grubuyla karşılaştırılması

Tablo 8: Alt gruplarda hTERT gen ekspresyon değeri ortalaması ve çalışma gruplarının kontrol grubuyla karşılaştırılması

Tablo 9: Olgulara ait hTERT ve Aktin ekspresyon değerleri

KISALTMALAR

cDNA	:	Komplementer DNA
G-zengin	:	Guanin zengin
hTERT	:	İnsan telomeraz reverz transkriptaz
IUGR	:	İntrauterin gelişme geriliği
mRNA	:	Messenger RNA
PE	:	Preeklampsi
RT-PCR	:	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
TERT	:	Telomeraz reverz transkriptaz
TR	:	Telomeraz RNA

1. GİRİŞ

Tüm gebeliklerin yaklaşık %5-10'u preeklampsiden etkilemektedir. Antenatal ve neonatal bakımdaki gelişmelere rağmen maternal ve neonatal morbidite ve mortalitenin majör nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir (1, 2, 3).

Plasental yetmezlik ve preeklampsi etyopatogenezi net olarak aydınlatılmamış olmasına karşın, konu ile ilgili en çok vurgu yapılan hipotezlerden birisi iki evre hipotezidir. Buna göre defektif plasentasyon ile başlayan ilk evre ve preeklampsi semptomlarına neden olan mikropartiküllerin maternal dolaşıma geçmesi şeklinde özetlenebilecek ikinci evre söz konusu teoriyi oluşturmaktadır (4). Antioksidan savunma sistemlerindeki zayıflıkla ilişkili olabilecek oksidatif hasarın hastalığın klinik manifestasyonunu oluşturan ikinci evreyi tetiklediği bildirilmektedir (5).

Telomer uzunluğunun oksidatif stres (6, 7) ile ilişkisi olduğu gösterilmiş olup ayrıca telomer uzunluğunun hücrenin maruz kaldığı kümülatif hasara dair bir belirteç olabileceği belirtilmiş ve kardiyovasküler hastalıklar ve ateroskleroz gibi durumlarla ilişkilendirilmiştir (8). Literatüre bakıldığında son yıllarda telomer uzunluğu, telomeraz aktivitesi, hTERT ekspresyonu ile çeşitli gebelik dönemi hastalıkları arasındaki ilişkileri inceleyen çalışmalarda artış olduğu görülmektedir. Preeklampsi ile telomer uzunluğu arasında ilişki olmadığına dair çalışmalar olduğu gibi (8) bunun aksine preeklampsi ile telomer uzunluğunda kısalma arasında ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar da görülmektedir.(9) Intrauterin gelişme geriliğinde de telomer uzunluğunda kısalma olduğu ve telomeraz aktivitesindeki baskılanma ile telomer kısalmasının ilişkili olduğu gösterilmiştir. (10)

Gebelikte nispeten yaygın olarak gözlenen ve önemli maternal ve fetal morbidite ve hatta mortalite yaratabilen bu hastalıkların etyopatogenezinin daha iyi anlaşılabilmesi ve tedavisinde adımlar atılabilmesi için telomer biyolojisinin daha iyi anlaşılması gerektiği ve bu bağlamda bu hastalıklarda telomer dinamiklerini inceleyen çalışmalar gerektiği aşıkardır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Gebelikte Hipertansif Hastalıklar

Hipertansiyon tanısı usulüne uygun olarak ölçülen kan basıncı değeri sistolik için 140'ı ve diastolik için 90'ı aştığında konulur. Diastolik basıncı saptamak için korotkoff faz 5 kullanılır. Hipertansiyon tüm gebeliklerde yüzde 5 ile 8 arasında değişen oranlarda görülür. Maternal ölümlerin üç ana nedenlerinden biri olmanın yanısıra; ölü doğum, neonatal morbidite ve mortalitede önemli etkileri vardır. Gelişmiş ülkelerde maternal ölümlerin %16'sı hipertansif bozukluklardan kaynaklanmaktadır (11). Ülkemizde de anne ölümlerinin en önde gelen nedeni preeklampsidir (12). Gebeliğin hipertansiyonu ne şekilde tetiklediği veya ağırlaştırdığı yıllardır süregelen yoğun araştırmalara rağmen hala çözülememiştir. Hipertansif bozukluklar obstetrinin en önemli ve ilgi çeken çözülmemiş problemleri arasındaki yerini hala korumaktadır. Gebelikte hipertansiyon saptandığında bunun gebelikle ilişkisini doğru şekilde tanımlamak büyük önem taşır. Gebelikte tespit edilen hipertansiyon temel olarak iki gruba ayrılabilir. Birincisi; gebeliğin neden olduğu, gebelikte ortaya çıkıp, doğumu takip eden süreçte geriye dönen "Gebeliğe bağlı hipertansiyon" iken ikincisi ise gebelikten önce de mevcut olan ve gebeliğe eşlik eden "Kronik hipertansiyon" dur. İkinci bahsedilen durumda temel yaklaşım mevcut hipertansiyonun tedavisi iken, gebeliğe bağlı hipertansiyonda ise kan basıncı yüksekliğinin önemi altta yatan patolojilere işaret ediyor olabileceğidir ve bu nedenle dikkatli takibi ve altta yatabilecek patolojilere yönelik araştırma önem taşımaktadır. Gebeliğe bağlı hipertansiyon genellikle gebeliğin 20. haftasından sonra ortaya çıkmakla birlikte, trofoblastik hastalık ve çoğul gebelik gibi durumlarda 20. haftadan önce de ortaya çıkabilir. Gebelikteki hipertansif bozuklukların sınıflaması, hastalığın prognozunun belirlenmesi, yükselmiş kan basıncının ve gebeliğin yönetimi, maternal ve fetal risklerin tespiti açısından son derece önemlidir ve bu amaçlara hizmet etmelidir. Sınıflama konusunda dünyada çok çaba harcanmış ve değişik sınıflamalar öne sürülmüştür. Fakat bugün bile tam bir fikir birliğine varılamamıştır. Günümüzde gebelikteki hipertansif bozuklukları sınıflamada 'Working Group of the NHBPEP—National High Blood Pressure Education

Program (2000)” tarafından hazırlanan sınıflama yaygın olarak kabul görmektedir (tablo 1) (1).

1. Gestasyonel hipertansiyon
2. Preeklampsi ve Eklampsi
3. Kronik hipertansiyon zemininde gelişen süperimpoze preeklampsi
4. Kronik hipertansiyon

Bu sınıflamanın önemli bir özelliği preeklampsi ve eklampsiyi diğer hipertansif bozukluklardan ayırmasıdır çünkü bu ikisi daha kötü seyretme potansiyelindedir. Bu yaklaşım ayrıca gebelikle ilişkili hipertansif hastalıkların etyolojisi, patogenezi, ve klinik yönetimine dikkat çeken çalışmaları yorumlamak ve anlamak için de önemlidir.

Tablo 1: Gebelikte hipertansif hastalıklar

Gestasyonel hipertansiyon

- Kan basıncının ilk kez gebelikte sistolik kan basıncı için 140 ve üzeri veya diastolik kan basıncı için 90 ve üzeri olması
- Proteinüri saptanmamış olması
- Postpartum 12 haftadan önce kan basıncının normale dönmüş olması
- Kesin tanı sadece postpartum konulabilir
- Preeklampsinin diğer belirtileri ve semptomları olabilir (trombositopeni veya epigastrik ağrı gibi)

Preeklampsia

Minimum kriterler:

- 20. gebelik haftasından sonra $\geq 140/90$ mm Hg ölçülen kan basıncı
- 24 saatlik idrarda ≥ 300 mg ya da dipstick ile $\geq 1+$ proteinüri saptanması

Şiddetli preeklampsia kriterleri:

- Kan basıncının $\geq 160/110$ mmHg olması
- 24 saatlik idrarda ≥ 2 gr ya da dipstick ile $\geq 2+$ proteinüri saptanması
- Serum kreatinin > 1.2 mg/dL eğer daha önceden yüksek olduğu bilinmiyorsa
- Trombositopeni (<100.000)
- Mikroanjiopatik hemoliz - artmış LDH
- ALT veya AST yüksekliği
- Persistan baş ağrısı veya diğer serebral veya görsel bozukluklar
- Persistan epigastrik ağrı

Eklampsia

- Preeklampsia olan bir gebede diğer nedenlerle açıklanamayan konvülsiyon gelişmesi

Kronik hipertansiyon üzerine süperimpoze preeklampsia

- Gebeliğin 20. haftasından önce proteinüri olmayan hipertansif gebede yeni başlayan proteinüri (24 saatlik idrarda ≥ 300 mg)
- Gebeliğin 20. haftasından önce hipertansiyon ve proteinüri bulunan gebede proteinüride veya kan basıncında ani artış veya trombositlerde ani düşüş (< 100.000)

Kronik hipertansiyon

- Kan basıncının gebelikten önce ya da gebeliğin 20. haftasından önce $\geq 140/90$ mmHg saptanması ya da,
- Hipertansiyonun ilk kez gebeliğin 20. haftasından sonra saptanması ve postpartum 12. haftadan sonra da devam etmesi

Preeklampsi, basitçe gebeliğin 20. haftasından sonra artmış kan basıncına proteinürinin eşlik etmesi şeklinde tanımlanmakla birlikte gebeliğe özgü hemen hemen tüm organ sistemlerini etkileyebilen bir hastalık olarak tanımlamak daha doğru olacaktır. Tüm gebeliklerin yaklaşık %5-10'u preeklampsiden etkilenmektedir. Antenatal ve neonatal bakımdaki gelişmelere rağmen maternal ve neonatal morbidite ve mortalitenin majör nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir (1, 2). Daha önce de değinildiği üzere ülkemizde anne ölümlerinin en önde gelen nedeni preeklampsidir (12). Günümüze kadar süregelen çalışmalar ve edinilmiş klinik tecrübeler neticesinde hastalığın semptom ve bulguları çok iyi öğrenilmiş olmasına rağmen, etyoloji henüz net olarak aydınlatılamamıştır. Hastalığın klinik prezentasyonu genellikle geç ikinci trimestir ve üçüncü trimestir dönemlerinde görülmekle birlikte çok erken gebelik dönemlerinde de özellikle renal ve plasental alanlarda patofizyolojik değişiklikler bildirilmiştir (4). Geçmişte gestasyonel hipertansif bozukluklarda tanı koymak için kan basıncı artışı hastanın önceki sistolik kan basıncında 30 mm Hg ve üzerinde veya diastolik kan basıncında 15 mm Hg ve üzerinde artış saptanması, mutlak değerler 140/90 mm Hg'nin altında olsa dahi, tanısal bir kriter olarak kullanılmaktaydı. Bu kriter günümüzde daha fazla kabul görmemektedir çünkü elde edilen veriler kan basıncındaki bu tip bir artışla artmış kötü gebelik sonuçlarının ortaya çıkışının pek muhtemel olmadığını ortaya koymuştur (13, 14). Ödem de normal gebeliklerde de çok yaygın olarak görülmesi ve bu nedenle ayırt edici bir özellik olmaması nedeniyle artık terk edilmiştir (15). "National High Blood Pressure Education Program Working Group" tarafından belirlenen kriterlere göre, ilk kez 20. gebelik haftasından sonra 6 saat arayla en az iki ölçümde 140/90 mm Hg veya daha yüksek kan basıncı saptanması hipertansiyon olarak tanımlanmıştır (1,2). Preeklampsi basitçe gestasyonel hipertansiyondan ve beraberinde proteinüriden fazlası olmakla beraber proteinüri olması objektif bir tanı kriteri olarak kalmaktadır. Proteinüri tanımı 24 saatlik idrarda 300 mg'ı aşan protein atımı, spot idrarda 0.3 ve üzeri olan protein:kreatinin oranı, veya persistan 30 mg/dL (1+ dipstick) protein saptanması ile konulur (16). Gün içinde idrar konsantrasyonu büyük değişkenlik gösterebilir ve bu dipstick ile yapılacak analizi etkileyebilir. Bu yüzden idrarda günde 300 mg'dan daha az protein atılımı olan kadınlarda bile 1+, 2+ gibi değerler saptanabilir. Spot idrar ürin:kreatinin oranı bakılması spot

idrarda protein bakılmasına göre 24 saatte idrar bakılmasına daha uygun bir alternatif olabileceği bildirilmiştir. Ancak bugün itibarı ile 24 saatte proteinüri tayini altın standart olarak kabul edilmektedir (4). Hipertansiyon ve proteinürinin şiddeti arttıkça preeklamps tanısı da o derece kesinlik kazanır. Aynı zamanda bunlara eşlik eden bir dizi faktör de değerlendirilerek hastalığın şiddeti hakkında değerlendirme yapılabilir (17). Preeklampside hastalığın şiddetinin belirlenmesinde kullanılan kriterler tablo 2 de gösterilmiştir (17).

Tablo 2: Gestasyonel hipertansif bozukluklarda hastalığın şiddet göstergeleri		
	Hafif	Şiddetli
Diastolik kan basıncı	< 110 mm Hg	≥ 110 mm Hg
Sistolik kan basıncı	< 160 mm Hg	≥ 160 mm Hg
Proteinüri	≤ 2+	≥ 3+
Baş ağrısı	Yok	Var
Görme bozukluğu	Yok	Var
Üst abdominal ağrı	Yok	Var
Oligüri	Yok	Var
Konvulziyon (Eklampsi)	Yok	Var
Serum kreatinin	Normal	Artmış
Trombositopeni	Yok	Var
Serum transaminazlarında artış	Minimal	Belirgin
Fetal büyüme geriliği	Yok	Aşık
Pulmoner ödem	Yok	Var

Preeklamps sıklıkla genç ve nullipar kadınları etkilemekle birlikte yaşlı kadınlar da kronik hipertansiyon üzerine süperempoze preeklamps için artmış risk altındadırlar. İnsidans ayrıca ırk ve etnik köken, dolayısıyla genetik yatkınlıktan da belirgin etkilenir. Çevresel, sosyoekonomik ve mevsimsel etkiler de diğer faktörler olarak göze çarpmaktadır (18, 19). Preeklamps insidansının arttığı belli başlı durumlar aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- Nulliparite
- oğul gebelik
- Obezite
- Etnik köken, ırk (siyah ırk)
- Düşük sosyoekonomik düzey
- 20 yaşı altı veya 35 yaşı üzeri gebelik
- Önceki preeklampitik-eklampitik gebelik öyküsü
- Ailede preeklampsi-eklampsi öyküsü
- Kalıtım
- Polihidramnion
- Molar gebelik
- Diabetes mellitus
- Kronik hipertansiyon
- Renal hastalık
- Bağ dokusu hastalıkları
- Beslenme yetersizliği ve malnutrisyon

Dünya çapında bir dizi çalışmanın Sibai ve Cunningham tarafından yapılan değerlendirmesinde preeklampsi insidansının nullipar popülasyonlarda yüzde 3 ile 10 arasında değişen oranlarda olduğu, multiparlarda da benzer şekilde değişen oranlarda olmakla birlikte bu oranın nulliparlardan daha düşük olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte ölü doğum için riskin hipertansif multiparlarda nulliparlara göre daha fazla olduğu bildirilmiştir (20). Preeklampsi ile ilişkilendirilen diğer risk faktörleri arasında obezite, çoğul gebelik, 35 üzeri maternal yaşı da yer almaktadır (21, 22, 23). Maternal ağırlık ile preeklampsi riski arasında progresif bir ilişki vardır. Vücut kitle indeksi (BMI) 20 kg /m²'nin altında iken yüzde 4.3 olan risk BMI 35 kg / m²'yi aştığında risk yüzde 13.3'e çıkmaktadır İki gebelikler tek gebeliklerle kıyaslandığında gestasyonel hipertansiyon insidansı yüzde 13'e yüzde 6 ve preeklampsi insidansı yüzde 13'e yüzde 5 olarak saptanmış olup ikisinde anlamlı artmış görölmüşür (24). İlk gebeliğinde normotansif olan kadınlarda bunu takip eden bir gebelikte preeklampsi insidansı daha azdır. Getahun ve arkadaşları tarafından yapılan yaklaşık 137,000 kadının incelendiği toplum tabanlı bir

retrospektif kohort analizinde, vücut kitle indeksi her iki gebelikte de normal sınırlarda olduğunda ikinci gebelikte preeklampsisi insidansının %2 olduğu saptanmıştır (25). Gebelik sırasında sigara içimi bir dizi olumsuz gebelik sonucuna sebep olmakla beraber, gebelik boyunca hipertansiyon için azalmış risk ile ilişkilendirilmiştir (26, 27). Plasenta previanın da gebelikte hipertansif bozuklukları azalttığı bildirilmiştir (28).

Daha önce tablo 2 de bahsi geçen kriterler preeklampsinin şiddetini değerlendirmek için de kullanılır. Ayrıca “American Congress of Obstetrics and Gynecology” (ACOG) tarafından da şiddetli preeklampsiyi ön görmede kullanılan bir dizi kriter tanımlanmıştır (Tablo-3) (29).

Tablo 3: Şiddetli Preeklampsisi tanısı için “American Congress of Obstetrics and Gynecology” kriterleri

Aşağıdakilerden bir veya daha fazlası mevcutsa preeklampsisi şiddetli olarak değerlendirilir

- Hasta yatak istirahatinde iken en az 6 saat ara ile yapılan iki ölçümde sistolik kan basıncının 160 mm Hg ve üzeri, veya diyastolik kan basıncının 110 mm Hg ve üzeri ölçülmesi
- 24 saatlik idrarda 5 gram ve üzeri, veya en az 4 saat arayla alınan iki rastgele idrar örneğinde 3+ veya üzerinde proteinüri
- 24 saatten 500 ml’den az idrar çıkışı olacak şekilde oligüri
- Serebral veya görsel bozukluklar
- Pulmoner ödem veya siyanoz
- Epigastrik veya sağ üst kadranda ağrısı
- Bozulmuş karaciğer fonksiyonları
- Trombositopeni
- Fetal büyüme geriliği

Baş ağrıları veya skotom gibi görme bozuklukları eklampsinin uyarıcı semptomları olabilir Epigastrik veya sağ üst kadranda ağrısı sıklıkla hepatoselüler nekroz, iskemi ve glisson kapsülünü geren ödeme eşlik eder. Bu karakteristik ağrı sıklıkla artmış serum transaminaz düzeyleri ile birlikte.

Muhtemelen trombosit aktivasyonu ve aggregasyonu ve şiddetli vazospazm tarafından tetiklenen mikroanjiyopatik hemolizden kaynaklanan trombositopeni de kötüleşen preeklampsinin karakteristik bulgusudur. Şiddetli preeklampsinin diğer bulguları arasında renal veya kardiyak tutulum ve fetal gelişme geriliği de vardır. Bu bulgu ve semptomlar ne kadar derinse, izlem veya takip o kadar uygunsuz olacak ve doğum endikasyonu daha muhtemel olacaktır. Hafif ve şiddetli gestasyonel hipertansiyon veya preeklampsi arasında ayırım yanıltıcı olabilir nitekim ılımlı olarak değerlendirilen hastalık hızlıca şiddetli hastalığa ilerleyebilir. Preeklampsi basitçe “tek bir hastalık” olmaktan ziyade muhtemelen bir dizi maternal, plasental ve fetal faktörü içeren faktörlerin sonucu olarak gözükmemektedir (4, 17). Bunlar arasında aşağıdakiler sayılabilir:

- Uterin damarların anormal trofoblastik invazyonu
- Maternal, plasental ve fetal dokular arasındaki uyumsuz immunolojik tolerans
- Normal gebeliğin kardiyovasküler veya inflamatuvar değişikliklerine uyumsuz maternal uyum
- Kalıtsal predispozan genler ve yanı sıra epigenetik etkileri içeren genetik faktörler

Maternal, paternal ve fetal dokular arasındaki anormal arayüzlerin preeklampsiye sebep olabileceği gözlemi hastalığın iki-aşamalı bir bozukluk olduğu hipotezini doğurmuştur. Birinci aşama endovasküler trofoblastik yeniden düzenlenmedeki bozukluktan kaynaklanmaktadır ve sonrasında ikinci aşamadaki klinik sendroma sebep olmaktadır (30). Bazı preeklampsi vakalarının bu teoriye uyduğuna dair bulgular vardır. Önemlisi ikinci aşama kardiyak veya renal hastalık, diyabet, obezite, kalıtsal etkileri de içeren önceden mevcut olan maternal durumların modifikasyonuna duyarlıdır (1). Preeklampsi hem maternal hem de fetal belirtileri olan bir sendromdur. Maternal hastalık vazospazm, koagülasyon sisteminin aktivasyonu, ve volüm ve kan basıncı kontrolüne yönelik birçok humoral ve otokoid sistemde bozukluklarla karakterizedir. Oksidatif stres ve inflamatuvar benzeri yanıtlar da preeklampsinin patofizyolojisinde önemli olabilir. Bu bozukluktaki patolojik değişiklikler primer olarak iskemik tabiattadır ve plasenta, böbrek, karaciğer,

ve beyini etkiler. Preeklampsiyi kronik hipertansiyon veya gestasyonel hipertansiyondan ayırt etmek önemlidir, bunun altında preeklampsinin sadece hipertansiyon olmaması; sistemik bir sendrom olması ve hipertansiyon dışı çeşitli komplikasyonlarının kan basıncı artışları ılımlı olduğu zamanlarda dahi hayati risk yaratabilmesi yatmaktadır. Preeklampsinin nedeni bilinmemektedir. Çoğu kişi preeklampsinin tüm klinik tablosu için plasentayı patolojik odak olarak görür ve bu görüşlerinin temelini hastalığın tek kesin tedavisinin doğum olmasıdır. Bu nedenle araştırmalar plasentaya kan akımı sağlayan maternal kan damarlarındaki değişikliklere odaklanmıştır. Erken gestasyonda uterin arterin terminal dalları olan spiral arterler kalın duvarlı, musküler damarlardan uterin kan akımında 10 kat artışa uyum sağlayabilecek kese gibi gevşek damarlara dönüşürler. Bu transformasyon spiral arterlerin, plasentanın endovasküler trofoblast hücreleri tarafından invazyonunu içerir (31, 32, 33, 34). Preeklampsi gelişen kadınlarda uterin spiral arterlerin invazyonunun tamamlanmamış olduğu, damarların kalın duvarlı ve musküler kaldığına dair bulgular mevcuttur (31, 34, 35). Bunun sebebi sitotrofoblastlardan maternal spiral arterlerin yeniden yapılanması için gerekli olan adhezyon moleküllerinin ekspresyonundaki aksaklık olabilir (33, 34). Spiral arterlerin yeniden yapılanmasındaki başarısızlık sonuçta erken plasental hipoksiye yol açabilecek azalmış plasental perfüzyon için kabul edilen morfolojik kuraldır. Maternal arayüzde immün yanıtındaki değişikliklerin preeklampsiye ne şekilde yol açabileceği üzerine olan araştırmalar plasental ve maternal hastalık arasındaki bağlantıya işaret etmektedir. Klasik olmayan bir insan lökosit antijeni olan insan lökosit antijen-G normal plasental dokularda eksprese edilir ve immünolojik olarak yabancı olan plasentaya karşı maternal immün yanıtı düzenlemede rol sahibi olabilir (36). Preeklampsi ile komplike olmuş gebeliklerde plasental dokular eksik veya farklı insan lökosit antijen-G proteinleri eksprese edebilir ki bu plasentaya maternal toleransın kırılması ile sonuçlanır (4). Sonuç olarak preeklampside plasentada ve maternal dolaşımda artmış düzeylerde inflamatuvar sitokinler mevcuttur, bunun yanı sıra artmış naturel killer hücreler ve nötrofil aktivasyonu da vardır (37). Preeklampsi hafif, orta şiddetli gibi alt gruplara ayrıldığı gibi erken ve geç başlangıçlı olarak da sınıflandırılabilir (4). Erken başlangıçlı preeklampsi (34 hafta öncesi) ve geç başlangıçlı preeklampsi (34 hafta sonrası) için farklı etyolojiler olduğu ve bu

nedenle farklı klinik yansımaların olduğu öne sürülmüş olup, bu hala önemli bir araştırma konusudur. Bununla birlikte bu iki grup arasında temel bir takım farklılıklar mevcuttur (38)

a. Preeklampsinin geç başlangıçlı tipi dünya genelindeki preeklampsi vakalarının %80'inden fazlasını oluşturur. Geç başlangıçlı bu vakaların çoğu şunlarla ilişkilidir:

- Herhangi bir büyüme geriliği bulgusu olmadan normal gelişme gösteren bir bebek;
- Uterin spiral arterlerde normal veya çok az değişikliğe uğramış davranış (Doppler dalga formlarında değişiklik yok veya pulsatilite indeksinde [PI] çok az artış var);
- Umblikal arterlerin kan akımında değişiklik olmaması;
- Genişlemiş plasental kitle veya yüzey gösteren kadınlar için artmış risk (diyabet, çoğul gebelik, anemi, yüksek irtifa).

b. Preeklampsinin erken başlangıçlı tipi tüm preeklampsi vakalarının küçük bir alt kümesini kapsar (istatistiklere göre değişmekle birlikte yüzde 5 ile 20 arasında), fakat klinik ilişki bakımından en şiddetli vakaları kapsar. Preeklampsinin bu tipinin tipik özellikleri aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- Maternal spinal arterlerin yetersiz veya tamamlanmamış invazyonu;
- Plasental yatak spiral arterlerde ve bu yüzden uterin arterlerde kan akımında değişiklikler (çentikler ve doppler dalga formlarında diğer değişiklikler [artmış PI]);
- Plasental damarlardaki artmış periferik rezistans umblikal arterlerdeki anormal kan akımının bir sebebi olabilir (korunmuş akımda artmış sistol/diyastol (S/D) oranı veya end diastolik akımda kayıp ve hatta ters akım);

- Aşıkak büyüme geriliğı bulguları.

Erken başlangıçlı preeklampsinin yukarıda bahsi geçen özelliklerinin (38) bu gebelik patolojisine spesifik olmadığı bilinmelidir. Erken başlangıçlı preeklampsisi olan çoğu vakada diğer major bir gebelik patolojisi olan intrauterin gelişme geriliğı (IUGR) eşlik etmektedir. Erken başlangıçlı IUGR vakalarının tipik özellikleri yetersiz trofoblast invazyonu, spiral arterlerde yetersiz transformasyon, bunları takip eden uterin arterlerin kan akımında ilgili değişiklikler, umbilikal kan akımında değişiklikler, ve fetal gelişimin kısıtlanmasıdır. Erken başlangıçlı preeklampsisi ile birlikte olan alt grup rölâtif olarak şiddetli komplikasyonlarla ilişkili olduğu için temel ve klinik araştırmaların odağı olmuştur. Bu vakalarda iki sendromun kombinasyonu (preeklampsisi ve IUGR) erken başlangıçlı preeklampsinin IUGR için neden gösterilen değişikliklerden kaynaklandığının kabul edilmesine sebep olmuş olabilir. Fakat “pür” erken başlangıçlı IUGR vakaları yukarıda listelenen özellikleri aynen gösterir (38).

2.2 İntrauterin Gelişme Geriliğı

IUGR kavram olarak fetusun genetik olarak belirlenmiş ideal boyutlarına ulaşamaması anlamına gelir. Yani tahmini fetal ağırlık ya da abdomen çevresi ölçümünün mevcut gebelik haftası için 10 persantil veya 2,5 standart deviasyonun altında olmasıdır (39, 40). IUGR sıklığı %5-7 olarak bildirilmektedir (39, 40). İUGR fetusun potansiyel gelişimini yapamadığı devamlı bir süreçtir. Fetus yenidoğanda olduğu gibi strese gelişimini azaltarak yanıt verir. Gelişme geriliğı saptandığında altta yatan olay araştırılmalıdır. Alta yatan etiyoloji fetal prognoz ve gebelik takibi yönünden önemlidir. Campbell ve Thoms gelişme geriliğı olan fetusları ayırt etmek için sonografik olarak hesaplanan baş-abdomen çevresi oranının (HC/AC) kullanımını tanımlamıştır (41). Simetrik olanlarda her iki ölçüm de orantılı olarak küçük saptanmış iken asimetrik olanlarda orantısız olarak gecikmiş abdominal büyüme saptanmış. Başlangıç veya etyoloji büyüme geriliğinin tipine kuramsal olarak bağlantılıdır. Simetrik büyüme geriliğı durumu da erken bir sorun hücre sayısı ve boyutunda

azalma ile sonuçlanabilir. Bu şekilde erken dönemde fetal hücrel hiperplaziyi etkileyen sorunun sonucunda bütün fetal organların büyümesinde azalma görülür. Buna örnek olarak baş ve vücut boyutunun orantılı olarak etkileneceği şekilde büyüme geriliğine sebep olabilecek kimyasal maruziyeti, viral enfeksiyon, veya anöploidiyle birlikte hücrel gelişme kusuru gibi geniş etkili bozukluklar verilebilir. Asimetrik gelişme geriliği hipertansiyon nedenli plasental yetmezlik gibi bir geç gebelik sorununu izleyebilir (42, 43). Sonuç olarak ortaya çıkan azalmış glukoz transferi ve hepatik depolanma primer olarak hücre boyutunu etkileyip sayıyı etkilemeyecektir, ve fetal abdomen çevresi ki bu karaciğer boyutunu yansıtır, küçülecektir. Bu şekildeki somatik büyüme kısıtlılığı “brain sparing” olarak adlandırılan oksijen ve besinlerin normal beyin ve baş gelişimine izin verecek şekilde beyne akışını sağlayan seçici şant oluşumundan kaynaklanmaktadır (44). Fetal beyin rölatif olarak büyük ve karaciğer rölatif olarak küçüktür. Bu bağlamda son 12 haftada genellikle 3'e 1 olan beyin ağırlığı karaciğer ağırlığı oranı şiddetli gelişme geriliği olan infantlarda 5'e 1'e veya daha fazlasına kadar artabilir. İUGR'lerin %70'i asimetrik şekildedir (45). Bu bebekler perinatal hipoksi, neonatal hipoglisemi yönünden daha fazla risk altında olmalarına rağmen uygun takiple uzun süreli prognoz iyidir. Simetrik gelişme geriliği olanlarda perinatal hipoksi görülmezken uzun sürede beyin hücrelerinin toplam sayısında azalmaya bağlı sinirsel gelişmede bozukluk saptanabilir. IUGR tanısı öncelikle risk altındaki hastaların saptanması ile başlar. IUGR için belli başlı maternal risk faktörleri aşağıdaki tablo 4 de görülmektedir (46).

Tablo 4: İntrauterin Büyüme Geriliği İçin Maternal Risk Faktörleri

Sosyal Öykü	Gebelikte az kilo alınması Sigara Kötü sosyoekonomik öykü
Obstetrik Öykü	Önceki gebelikte büyüme kısıtlanması Ölü doğum ya da neonatal ölüm öyküsü Tekrarlayan abortus öyküsü
Tıbbi Öykü	Hipertansiyon Gebeliğin indüklediği hipertansiyon Renal hastalık Tekrarlayan üriner trakt enfeksiyonu Kronik karaciğer hastalığı Kardiak hastalık Hemoglobinopati

Öyküde en önemli risk faktörleri annenin sigara içmesi ve bir önceki gebelikte IUGR olan fetus olmasıdır. İUGR ile ilişkili en sık görülen maternal medikal komplikasyon hipertansiyondur. Hem preterm doğumun hem de İUGR'nin kronik plasental inflamasyonla ilişkili olduğuna dair çeşitli kanıtlar vardır. Maternal kardiyak ve hematolojik hastalıklar daha az görülen İUGR nedenleridir. İUGR 'li fetusların yaklaşık % 20'si kromozomal bozukluklara ve multifaktöriyel konjenital malformasyonlara bağlıdır. Kromozomal bozuklukların çoğunluğunu trizomi 18 ve daha sonra trizomi 13 ve 21 oluşturur (47). Maternal vasküler hastalık ve uteroplazental bozukluk, IUGR'nın %25-30'undan sorumludur. Erken başlayan şiddetli preeklampsisi bu grupta önemli rol oynar. Bu hastalıklarda plazma volümünün yeterince genişleyemediği ve belirgin plasental patolojinin olduğu öne sürülmektedir (47). Trombofililerin IUGR'ne katkısı son yıllarda araştırma konusu olmuştur. Çeşitli çalışmalarda protrombin gen mutasyonunun IUGR'na sebep olabileceği gösterilmiştir (48,

49). Ancak patofizyolojinin plasental trombuslar mı yoksa maternal hipertansiyon mu olduğu çok açık değildir. Aynı şekilde edinilmiş bir trombofili olan antifosfolipid sendromunun da IUGR, abortus, geç fetal kayıplar ve tromboembolik olaylara yol açtığı bilinmektedir (50). Maternal şiddetli malnütrisyonun IUGR'na yol açtığı bilinmektedir. Bu durum özellikle 2. Dünya Savaşı sırasında Nazi işgali altındaki Hollanda'da görülmüştür. İnflamatuvar barsak hastalıklarında da maternal malnütrisyonu bağlı olarak fetal büyümenin kötü olduğu görülmüştür (47). Fetal enfeksiyonlar da IUGR'na yol açabilir. Özellikle CMV, rubella ya da parvovirus enfeksiyonları 20. haftadan önce fetusa geçerse büyüme kısıtlanmasına yol açabilir. Annenin sigara içmesi, kokain, eroin, alkol kullanması, antikonvülzan ilaç ve warfarin kullanımı da IUGR'na sebep olabilir (46). Çoğul gebeliklerde büyüme tekizlere göre farklıdır. Özellikle 32. haftadan sonra ikizlerin büyüme eğrisi tekizlerden belirgin sapma gösterir. İkizlerde yaklaşık %15-30 oranında büyüme kısıtlanması görülür. Bu durum özellikle monokoryonik ikizlerde görülen ikizden ikize transfüzyon sendromu için geçerlidir. Ancak diskordant büyüme dikoryonik ikizlerde de görülebilir (46). IUGR olan fetusların plasentalarının hem büyüklük, hem de fonksiyonun anormal olduğu gösterilmiştir. IUGR olan fetusların plasentalarının normale göre %24 daha küçük olduğu gösterilmiştir (51). Plasental morfolojiyi incelemek için yapılan elektron mikroskopi çalışmalarında, umbilikal arterde diyastol sonu akım kaybı olan IUGR olgularında, terminal villöz kompartmanda belirgin anormallikler olduğu gösterilmiştir (52). Tablo 5 de IUGR de fetal plasental ve maternal risk faktörleri gösterilmiştir (46).

Tablo 5: İUGR de fetal, plasental ve maternal risk faktörleri

Fetal: • Kromozomal anomaliler • Multifaktöriyel konjenital malformasyonlar • Çoğul gebelikler • Enfeksiyonlar
Plasental: • Küçük plasenta • Plasenta sirkumvallate • Koryoanjiomata
Maternal: • Malnutrisyon • Vasküler/renal hastalık • Konjenital ya da akkiz trombofililer • Yüksek yerde yaşama, hipoksik hastalıklar • İlaçlar/hayat tarzı

IUGR klinik olarak ortaya çıkış zamanına göre 34. gebelik haftası öncesi ya da sonrası, erken veya geç IUGR olarak sınıflandırılır (53). IUGR yukarıdaki tabloda da listelendiği üzere maternal, fetal ya da plasental nedenlere bağlı olarak ortaya çıkabilir. Preeklampsi ile ortak etyopatogeneze sahip olan IUGR tipi daha çok plasental nedenlerle ilişkilendirilmektedir. Buna göre plasentada spiral arterlerde yetersiz trofoblastik invazyon ortak etyopatogeneze olarak ileri sürülmektedir (54). Etyopatogeneze öne sürülen diğer mekanizmalar arasında anormal plasental implantasyon, anjiogenik faktörler, kardiyovasküler maladaptasyon, feto-maternal immunolojik intolerans ve

vasküler endotel disfonksiyonu bildirilmektedir. Plasentada trofoblast aracılı maternal revaskülarizasyonda başarısızlık, preeklampsi ve IUGR gelişimine yatkınlık oluşturduğu bilinen bir diğer mekanizmadır (54). Preeklampsi gelişimi için öne sürülen iki evre teorisine göre sıg plasentasyona bağlı gelişen plasental yetmezliğin oluşturduğu ilk evreden hastalığın klinik olarak ortaya çıktığı ikinci evreye geçiş söz konusu mikropartiküllerin maternal dolaşıma geçmesi ile ilişkilidir (5). Erken ve geç preeklampsi olarak yapılan sınıflandırmanın fizyopatolojik temelinde erken preeklampsi olgularının plasental yetmezlik ile komplike olan olgular arasından gelişirken geç preeklampsi olgularında plasental yetmezlik olmadan klinik manifestasyonun ortaya çıkışı yer almaktadır (4, 38). Sıg plasentasyonu takip eden preeklampsi tablosu mikropartiküllerin eliminasyonunu sağlayan oksidatif savunma mekanizmalarının noksanlığı ile ilgili olabilir. Hemokoryonik tipteki insan plasentası yani maternal kanın fetal villöz ağaca ve sinsityotrofoblastlarla sürekli etkileşimde olması bu sonuçla ilişkilendirilmektedir. Çalışmalarda klinik manifestasyondan maternal kanda sirküle eden, sinsityotrofoblastlara ait mikropartiküller sorumlu tutulmakta ve bunların eliminasyonunda plasentanın antioksidan savunmasının kilit rolüne dikkat çekilmektedir (4, 38).

2.3 Telomer Biyolojisi

Telomerler lineer kromozomların uçlarında bulunan özelleşmiş tekrarlayan DNA dizileridir.(55) Telomerler arka arkaya tekrarlayan, guanozinden zengin sekansları içerir.(56) İlk keşfedilen telomerik dizi (TTGGGG)_n Tetrahymena thermophila'ya aittir.(57)

Telomer uzunluğu türden türe, aynı hücrenin farklı kromozomları arasında ve farklı hücre türlerindeki aynı kromozomlar arasında farklılık gösterir.(58, 59) Memeli sistemlerinde telomer uzunluğu yaklaşık 10 kilobaz uzunluğundadır.(60)

Tekrarlayan DNA dizileri türler arasında epey farklılık gösterir, bununla birlikte çoğu organizmada benzer telomerik diziler mevcuttur. Telomer dizilerindeki bu benzerlik bunların korunmuş diziler olduklarını ve organizmalar arasında korunan fonksiyonları olduğunu gösterir.(56)

2.3.1 Telomerin yapısı

Telomerik DNA çift zincirli tekrarlayıcı dizi ve tek zincirli G-zengin (Guanin zengin) tek iplikli sarkan ve özelleşmiş proteinlerden oluşur.(61) Tek zincirli G-zengin sarkanın kendi içinde geriye katlanma ve T-ilmek (telomer ilmek) oluşturabilme yeteneği ve çift-zincirli telomerik DNA içine girerek D-ilmek oluşturabilme yeteneği vardır.(62)

Telomerler “shelterin” olarak adlandırılan kompleksi oluşturan altı ana protein ile korunur ve şekillendirilir. Bu proteinler spesifik olarak çift zincirli telomerik DNA'ya bağlananlar ve spesifik olarak tek zincirli G-sarkana bağlananlar olmak üzere iki gruba ayrılabilir. POT1 (insanlarda), cdc 13 (tomurcuklanan mayalarda), TEBP (telomer uç bağlayıcı protein, silyalılarda) spesifik olarak telomerin tek zincirli G-sarkanına bağlanır. TRF1, TRF2, TIN2, RAP1 proteinleri ise çift zincirli telomerik DNA'ya bağlanır. TRF1 ve TRF2 çift-zincirli telomerik DNA'ya bağımsız olarak bağlanır. Hem TRF1 hem de TRF2 farklı domainler aracılığıyla TIN2 ile bağlıdır. Protein kompleksine TPP 1 temini TIN 2 ile sağlanır. POT 1 (insanlarda) tek zincirli G-sarkanına bağlanan özgün bir protein olup TPP1 tarafından rekrüte edilir. TPP1 bu altı fonksiyonel proteinlerin tümünü telomerlere toplayan bir köprü gibi hizmet etmektedir. TRF2 in vitro olarak diğer telomer substratları sağlandığında telomer ilmeği oluşturabilme kapasitesine sahiptir, bu TRF2'nin in vivo olarak shelterin kompleksinin DNA bağlanma bölgesi aracılığıyla T-ilmek formasyonuna aracılık eden önemli bir komponent olduğunu gösterir.

T-ilmek ve D-ilmek yapılarını stabilize etmek için PTOP, PIP1, Tankyrase1 gibi POT1 ve TIN2 arasındaki etkileşime aracılık eden ilave proteinlere ihtiyaç vardır. Shelterin kompleksinin bileşenleri ve diğer telomer bağlayıcı proteinlerin farklı fonksiyonları vardır. Kromozomal uçların düzenlenmesi ve stabilizasyonu için telomerik proteinler ile telomerik DNA arasında spesifik etkileşimler gereklidir. T-ilmek ve D-ilmekler spesifik telomer bağlayıcı proteinler ile birlikte kromozomlara stabilite sağlarlar ve telomerlere degradasyon, uç uca füzyon ve aberant rekombinasyonlara karşı koruyucu bir

başlık oluştururlar.

Kromozomal uçlar shelterin proteinlere dahil olmayan telomerik bağlayıcı ilişkili proteinler olarak da adlandırılan proteinler ile bağlıdır. Shelterin proteinlerin farkı, shelterin proteinlerin telomerlerde hücre siklusu boyunca mevcut olması ve telomer spesifik olmalarıdır. Ek olarak telomer bağlayıcı proteinlerin fonksiyonları telomerlerle kısıtlanmıştır.

Mayalar ve silyalılarla yapılan genetik ve biyokimyasal çalışmalara göre telomer uç bağlayıcı protein eksikliği olan hücrelerin telomerik kayıp gösterdiği ve bunu kromozom uç füzyonları ve ayrışma defektlerinin izlediği gösterilmiştir. Bu sonuçlar kromozom uçlarının korunmasından ve genomik stabiliteden spesifik olarak G-zengin sarkana bağlanan proteinlerin sorumlu olduğu anlamına gelmiştir.

2.3.2 Telomeraz

Telomeraz kromozomal uçlardaki telomerik tekrarları sentezleyen bir hücresel reverz transkriptazdır. Telomerazın iki temel alt ünitesi vardır: TERT (telomeraz reverz transkriptaz) ve TR (telomeraz RNA).(63) hTERT geni insan 5p kromozomu üzerindedir ve çeşitli splicing varyantları vardır. hTR ise insan 3q kromozomu üzerindedir.(64) Telomerik DNA'nın bir zincirinden sentezlenen ribonükleoprotein yapıda bir reverz transkriptaz ve büyük bir enzim kompleksi olan telomerazın katalitik aktivitesini TERT ve TR alt ünitelerinin özel ilişkisi sağlar.(65)

Telomeraz enzim aktivitesinin hücre proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Embriyonik hücreler ve erişkin kök hücrelerinde aktif olan bu enzim normal somatik hücrelerde bulunmamaktadır. Kanseri tiplerinin ise yaklaşık %85'inde telomeraz aktivitesi gösterilmiştir.(66)

2.3.2.1 Telomerazın Mekanizması

DNA polimeraz replikasyon sırasında DNA sentezine direkt olarak başlayamaz. DNA replikasyonu 5' – 3' yönünde olur ve 8 - 12 bazlık bir ön RNA parçasına ihtiyaç duyar. Bu RNA parçasına, "RNA primer"i adı verilir.(67, 68) RNA primerinin taşıdığı 3'-OH grubu sayesinde DNA polimeraz primere

bağlanır. Böylece DNA polimeraz hem kesikli sentezlenen iplikle hem de kesintisiz iplikte okunmasını sürdürür. Yeni DNA 3' yönünde yapılabildiği için RNA primerinin uzaklaştırılmasından sonra çift iplikli yeni DNA molekülünün 5' ucunda doldurulmamış bir boşluk olacaktır. Bu boşluk DNA polimeraz tarafından tamir edilemez ve bu nedenle her sentez sonrasında kromozom teorik olarak RNA primerinin boyu kadar kısalmaya maruz kalır. Bu noktada telomeraz devreye girer ve reverz transkriptaz işlevi gören bu enzim tarafından her replikasyon sonrası kromozom uçlarına tekrarlayan diziler eklenerek kromozom kısalması engellenir. Telomeraz kendi RNA şablonu olması ile diğer reverz transkriptazlardan ayrılır. Telomer uzatılma işlemi üç basamaktan oluşur: telomerik uçların tanınması, elongasyon ve translokasyon.(69) G-zengin hegzamerik tekrarlar TR subünitinin şablon bölgesinin sonuna kadar telomeraz kompleksi ile ilave edilir. Yeni sentezlenen zincir boyunca telomeraz kompleksinin translokasyonu ve telomerik DNA'nın 3' ucunun uzatılması 5' – 3' yönünde devam ettirilir.(70)

2.3.2.2 Telomerazın düzenlenmesi

Telomeraz enziminin düzenlenmesi çeşitli mekanizmalar tarafından control edilen kompleks bir olaydır. Telomeraz holoenziminin regülasyonu üzerinde etkili iki fonksiyonel komponentten oluşan kompleks bir yapısı vardır. TERT ve TR'nin ekspresyon özellikleri vertebralılarda gelişim sırasında farklılık göstermektedir. Vertebralılarda telomeraz aktivitesinden bağımsız olarak çeşitli dokularda telomeraz RNA ekspresyonu gösterilmiştir.(71) TR'nin aksine telomeraz protein alt ünitesinin normal somatik hücrelerde ekspresyonunun transkripsiyonel olarak represe olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle telomerazın katalitik subüniti olan TERT telomeraz aktivitesi için kısıtlayıcı bir faktör olarak değerlendirilebilir.(72)

hTERT'in senesans öncesi fibroblast, lenfosit, epitelyal hücreler ve diğer hücre tiplerindeki konstitütif ekspresyonu replikatif yaşam döngülerini uzatabilir.(73) Alternatif mRNA splicing ile hTERT'in inaktif bir formunun ekspresyonu da dahil olmak üzere telomeraz inaktivasyonunun diğer mekanizmaları erken gelişimde gösterilmiştir.(74)

Telomerazın bazı germ hücre serileri, epitelyal ve hematopoetik hücrelerde aktif olduğu bilinmektedir. Bu hücre serilerinin telomeraz-pozitif evrelerinde telomeraz aktivasyonu hTERT gen transkripsiyonun indüksiyonu ile korelasyon gösterir.

Telomeraz aktivitesi TERT'in transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel regülasyonu, TERT proteininin fosforilasyonu, telomerik bağlayıcı proteinler, hücresel transport ve holoenzim toplanması için gereken komponentlerin ilişkisi gibi bir dizi düzey aracılığıyla düzenlenir.(75) Bazı durumlarda ribonükleoprotein miktarında artış, hTERT'in posttranslasyonel modifikasyonu, veya katalitik olarak aktif ribonükleer proteinlerin subnükleer taşınması ile ilave stimülasyon sağlanır. (76, 77)

2.3.3 Senesans ve ölümsüzlük

Hayflick tarafından yürütülen çalışmaya göre kültürdeki normal fibroblastlar bölünmeyi yaklaşık 50 hücre siklusundan sonra bırakmıştır. Hayflick somatik hücreleri hücresel senesansa girmeye zorlayan intrinsik bir sayaç olduğunu öne sürmüştür.

Normal somatik hücrelerin kısıtlı replikatif kapasiteye sahip oldukları ve bu noktada normal somatik hücrelerin kısıtlı proliferasyonunun kısalmış telomerlerle ilişkili olabileceğini gösterir. Telomer kısalması kritik bir düzeyin altına ulaştığında telomer terminal uçları daha fazla kapatıp koruyamaz ve böylece bu bir DNA hasarı yanıtı oluşturur ve bunu büyüme arresti izler.

Normal hücreleri kanser hücrelerine dönüşmekten alıkoyan iki bariyer olduğu öne sürülmüştür: M1 (mortalite evresi 1) ve M2 (mortalite evresi 2). M1 evresi akabinde kalıcı senesansa yol açabilecek büyüme arresti ile karakterizedir. Normal hücrelerin çoğu M1'de kalır ve senesansa girer ve böylece daha fazla bölünmez. Bazı hücreler ise kısalmış telomerleri olmasına rağmen inhibe olmuş p53 ve RB yolları aracılığı ile M1'den kaçabilir ve M2 evresine geçebilir, buna aynı zamanda "crisis" adı da verilir. İkinci bariyer bazı hücreler için senesansa giriş öncesi son duraktır fakat yine de az sayıda hücre telomerleri stabilize etmek için spesifik mekanizmalarını aktive etmek suretiyle ölümsüz olmak için M2'yi es geçebilir.

Kök hücreler, germline hücreler, hematopoetik hücreler, ölümsüz hücreler ve kanser hücreleri telomer uzunluklarını stabilize etme becerilerinden ötürü sınırsız proliferasyon kapasitesine sahiptir. Çoğu kanser hücresi telomer yıpranmasını telomeraz aktivasyonu ile önleyebilirken az sayıda kanser hücresi ise telomer sürekliliğini alternatif bir yolak yardımıyla yapar.

Telomerler pro- ve antitümörojenik etkilerini farklı yollarla gösterebilir. Fonksiyonel sinyal ve kontrol noktası yolları olan hücrelerde kromozomların kısa terminal uçları senesans ve apoptozise yol açar. Bu, sonuç olarak hücre bölünmesini kısıtlar çünkü genomik instabilite disfonksiyonel kontrol noktası ve sinyal yolları olan hücrelerde artmış uç uca füzyonlar ve aberant rekombinasyonlar aracılığıyla tetiklenir.

3. MATERYAL METOD

3.1 Çalışma grubunun oluşturulması:

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'nde takip edilip, doğumu gerçekleştirilen intrauterin gelişme geriliği (IUGR) ile komplike olan ve olmayan preeklampsi olgularına ait doğum sonrası elde edilen taze plasenta materyallerinde, Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nca, kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) kullanılarak hTERT gen ekspresyonu araştırıldı. Çalışma Ege Üniversitesi Etik Kurulu'ndan onay alınarak başlatıldı ve tüm olguların yazılı onamları alındı.

Çalışmaya dâhil edilme kriterleri:

1. Tekiz gebelikler
2. Fetal anomalisi bulunmayan olgular
3. Preeklampsik olgular
4. İntrauterin gelişme geriliği (IUGR) ile komplike olan preeklampsik olgular
5. Kontrol grubu için sağlıklı gebeler.

Çalışmadan dışlanma kriterleri:

1. Maternal diabetes mellitus,
2. Çalışmada yer almak istemeyen olgular.

Çalışmaya 55 olgu dahil edildi.

1. 19 preeklampsi ve IUGR (9'u erken, 10'u geç başlangıçlı)
2. 16 preeklampsi (8'i erken, 8'i geç başlangıçlı)
3. 20 kontrol grubu

Doğum sırasında 24-34 gebelik haftası arasında yer alan olgular erken ve 34 haftadan daha büyük gebelik haftasındaki olgular geç olarak alt gruplara ayrıldı. Kontrol grubu olgular çalışma grubu ile gebelik haftası ve maternal yaş bakımından eşleştirilerek dahil edildi. Tüm olgular obstetrik endikasyonlar dahilinde sezaryen ile doğurtulan gebeler arasından seçildi.

3.2 Örneklerin toplanması ve saklanması:

Çalışmaya dahil edilen olgulardan doğumdan sonra ilk 30 dakikada steril koşullar altında, plasentanın santral kısmının 1 cm³ boyutunda biyopsi alınarak donduruldu ve -80 C° derecede muhafaza edildi ve geri kalan kısmı da histopatolojik inceleme için %10 formolde fixe edilecek takiben parafine gömüldükten sonra alkol ve ksilol ile rehidrate ve deparafinize edildi.

3.2 hTERT gen ekspresyonunun gerçek zamanlı kantitatif çalışılması:

Plasenta doku örneklerinde hedef genimiz hTERT'nin mRNA düzeyindeki değişiklikleri belirlemek amacıyla gen ekspresyonlarına bakıldı. Bu amaçla dokulardan total RNA izolasyonunu takiben, cDNA sentezi gerçekleştirildi ve belirlenen PCR protokolleri ile mRNA seviyesindeki gen ekspresyonları belirlendi. Uygulanan yöntemlere ait protokoller aşağıda sırasıyla verilmiştir:

3.2.1 Plasenta örneklerinden RNA izolasyonu:

Plasenta örneklerinden mRNA seviyesinde gen analizi için total RNA izole edildi. İzolasyon kiti manueli aşağıda verilmektedir:

- Kit protokolünde doku örneğinin RNA izolasyonu için 20 – 50 mg arasında doku örneği ile çalışılması önerilmektedir.. İlk denemelerde alınan 50 mg plasenta doku örneği ile izolasyon yapıldı ve RNA konsantrasyonları oldukça yüksek bulundu ve gerçek zamanlı kantitatif Real-Time PCR işlemi başarısız oldu. Bu nedenle 20 mg doku örneği alınarak izolasyonlara devam edildi.
- Doku örneğinin üzerine 800 ul Qizol Lysis Reagent eklendi.
- 25 sn, 19 cycle, %100 power ile sonikasyon yapıldı (dokunun parçalanma durumuna göre süre uzatıldı).
- 5 dk 15 – 25 oC' de inkübasyon yapıldı.
- 200 ul kloroform eklenip 15 sn çalkalandı.
- Oda sıcaklığında 2 – 3 dk inkübasyon yapıldı.
- +4oC' de 15 dk /12.000 g santrifüj yapıldı.
- Üst faz yeni bir ependorf tüpe alındı (bu aşamada üst faz alınırken orta faza dokunmamaya dikkat edildi).
- Aynı hacimde %70 etanol eklenip vortekslendi.

- Kolon üzerine 700 ul örnek aktarılıp 8000 g / 15 sn santrifüj yapıldı.
- Alt kısım atılarak bir önceki adım tekrarlandı.
- Kolon üzerine 700 ul RW1 eklenip 8000 g / 15 sn santrifüj yapıldı ve alt kısım atıldı.
- Kolon üzerine 500 ul RPE buffer eklenip 8000 g / 15 sn santrifüj yapıldı ve alt kısım atıldı.
- Kolon üzerine 500 ul RPE buffer eklenip 8000 g / 2 dk santrifüj yapıldı ve alt kısım atıldı. Kolon yeni bir ependorf tüpe aktarılıp 30 – 50 ul RNaz içermeyen su ilave edilip 1 dk santrifüj yapıldı.
- Örnek -80oC' de saklandı.

3.2.2 cDNA Reaksiyonu:

İzole edilen total RNA' ların RT-PCR (revers transkriptaz - Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile komplementer DNA' ya (cDNA) çevrilmeleri için, kit protokolüne göre thermal cyclers' da PCR' ları gerçekleştirildi.

cDNA aşamasında RNA örnekleri 1/2, 1/5, 1/10 ve 1/20 dilue edilerek çalışıldı. 1/20 sulandırılarak yapılan cDNA işleminde bir sorunla karşılaşılmadı. cDNA sentezi için 12 µl total RNA' ya 1 µl Anchored-oligo (dT)18 primer (50 pmol/µl) ilave edilerek 65°C' de 10 dakika denatüre edildi. Daha sonra, cDNA reaksiyonu için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı. Örnekler aşağıdaki protokole göre hazırlanmış reaksiyon karışımına eklendi.

Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

Total RNA + Primer Karışımı: 13,0 µl

Transcriptor RT Reaksiyon Tamponu (5x): 4,0 µl

Protector RNase İnhibitörü (40U/µl): 0,5 µl

dNTP Karışımı (her biri 10 mM):2,0 µl

Transcriptor Revers Transkriptaz: 0,5 µl

Toplam hacim: 20 µl

Denatüre edilmiş total RNA' lar üzerine hazırlanan reaksiyon karışımı eklendikten sonra örnekler 55°C' de 30 dakika, 85°C' de 5 dakika ve 4°C' de 5 dakika olacak şekilde programlanan thermal cyclers PCR cihazına

yerleştirildi. Amplifikasyon süresinin sonunda cDNA elde edildi. cDNA reaksiyonu sonrasında hedef gen ekspresyonlarının LightCyler cihazıyla belirlenme aşamasına geçildi.

3.2.3 hTERT gen ekspresyonunun belirlenmesi:

Plasenta örneklerinden elde edilen cDNA'larda hedef genimiz hTERT'nin mRNA düzeyindeki gen ekspresyon miktarları belirlenmiştir. Gen ekspresyonlarının karşılaştırılması ise; sağlıklı gebelerden alınan plasenta örneklerinden elde edilen sonuçların preklampsi gelişen olgu grubundan elde edilen verilerle kıyaslanması sonrasında belirlenmiştir.

Çalışmamızda hedef hTERT geniyle, β -Aktin [(house keeping gen – referans gen)] hedef genine özgül olarak dizayn edilip sentez ettirilecek primer set oluşturulmuştur. (Search LC, Germany), "LightCycler® Fast Start Reaction Mix SYBR Green I" (Roche Applied Science, Germany) kit manüeli doğrultusunda geliştirdiğimiz PCR reaksiyon protokolü, gerçek-zamanlı bir PCR cihazı olan LightCycler ver: 2.0' a (Roche Applied Science, Germany) uyarlandı.

β -Aktin kullanılarak, çalışma sonrasında mRNA kopya sayısı bilinen standartlar ile bir standart eğrinin çizilmesi ve bu eğriye göre mRNA kopya sayılarını bilmediğimiz örneklerin hedef gen konsantrasyonları belirlendi. Rölatif kantitasyon değeri, hedef gen kopya sayısının "house keeping gen" kopya sayısına oranlanarak elde edildi.

3.2.4 Gerçek zamanlı PCR için hazırlanacak reaksiyon karışımı:

Hedef gen (hTERT)	Referans Gen (β Aktin)
PCR seviyesindeki su: 6.0 μ l	PCR seviyesindeki su: 6.0 μ l
LightCycler® Primer Set: 2.0 μ l	LightCycler® Primer Set: 2.0 μ l
SYBR Green I: 2 μ l	SYBR Green I: 2 μ l
<u>cDNA: 10.0 μl</u>	<u>cDNA: 10.0 μl</u>
Toplam hacim: 20 μ l	Toplam hacim: 20 μ l

LightCycler' da hedef genlerin ekspresyon tayini için oluşturulan PCR termal profil:

1-DENATÜRASYON

PARAMETRE	DEĞER
Döngü Sayısı	1
Analiz Modu	Yok
	1.Segment
Hedef Isı (°C)	95
İnkübasyon Zamanı [sn]	120
Isı Geçiş Oranı (C/sn)	20.0
İkinci Hedef Isı (°C)	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0.0
Basamak Geciktirmesi (Döngü)	0
Okuma Modu	Yok

2-AMPLİFİKASYON

PARAMETRE	DEĞER		
Döngü Sayısı	35		
Analiz Modu	Kantitasyon		
	Segment1	Segment2	Segment3
Hedef Isı (°C)	95	68	7
İnkübasyon Zamanı [sn]	10	10	16
Isı Geçiş Oranı (°C/sn)	20.0	20.0	20.0
İkinci Hedef Isı (°C)	0	0	0
BasamakBüyükülüğü (°C)	00	0.0	0.0
Basamak Geciktrmesi (Döngü)	0	0	0
Okuma Modu	Yok	Yok	Tek

3- ERİME EĞRİSİ ANALİZİ

PARAMETRE	DEĞER		
Döngü Sayısı	3		
Analiz Modu	Erime Eğrisi		
	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Hedef Isı (°C)	95	58	95
İnkübasyon Zamanı [sn]	0	10	0
Isı Geçiş Oranı (C/sn)	2.0	20.0	.1
İkinci Hedef Isı (°C)	0	0	0
BasamakBüyükülüğü (°C)	0.0	0.0	0.0
Basamak Geciktirmesi (Döngü)	0	0	
Okuma Modu	Yok	Yok	Sürekli

4-SOĞUTMA

PARAMETE	DEĞER
Döngü Sayısı	1
Analiz Modu	Yok
	1.Segment
Hedef Isı (°C)	40
İnkübasyon Zamanı [sn]	30
Isı Geçiş Oranı (°C/sn)	20.0
İkinci Hedef Isı (°C)	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0.0
Basamak Geciktirmesi Döngü)	0
Okuma Modu	Yok

3.2.5 LightCycler ver: 2.0 Sistemi:

LightCycler gerçek-zamanlı (real-time) bir PCR cihazıdır. Bu cihazla gerçekleştirilen PCR esnasında oluşan amplifikasyon ürünlerinin artışı eş zamanlı olarak takip edilebilir. Amplifikasyon, kapiller tüplerde gerçekleştirilmektedir. Çok hızlı ısıtma ve soğutma kapasitesi sayesinde 40 döngülük bir PCR reaksiyonu, yaklaşık 45 dakikada tamamlanır. Bu cihazla ekspresyon analizinin yanı sıra, erime eğrisi analizi ile tek nükleotid polimorfizmleri ve mutasyonlar da özgül primer ve prob dizileri kullanılarak tayin edilebilir. Hem ekspresyon hem de mutasyon analizleri için yapılan PCR sonrasında herhangi ek bir manuel işleme ihtiyaç yoktur (agaroz jel elektroforezi gibi) ve dolayısıyla kontaminasyon riski en aza indirgenmiştir.

3.3 Elde edilen verilerin istatistiksel analizi

İstatistiksel analizler SPSS 15.0 versiyonu kullanılarak yapıldı. Veriler normal dağılım gösterip göstermediği açısından Shapiro-Wilk testi ile sınılandıktan sonra, nonparametrik dağılım gösterdiğinden Mann–Whitney U testi ve gerektiğinde ki-kare testi kullanılarak analiz edildi. P değeri 0,05 den küçük olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamıza toplamda 55 hasta dahil edilmiş olup bunların 19'u (%34,55) PE ve IUGR, 16'sı (%29,09) yalnızca PE ve 20'si (%36,36) kontrol grubundan oluşmaktadır.

Katılımcıların demografik bilgileri ve klinik verileri Tablo 6'da özetlenmiştir. Katılımcıların yaş, gebelik haftası, gravida ve parite gibi demografik özellikler açısından çalışma gruplarıyla kontrol grubu arasında fark olup olmadığı değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlı farklılık olmadığı gösterilmiştir. (Tablo 6)

Tablo 6: Çalışma gruplarının demografik özellikleri ve kontrol grubuyla karşılaştırması

	Kontrol	PE ve IUGR	p	PE	p
Sayı	20	19		16	
Yaş	27,40 (±6,48)	28,95 (±7,43)	p= 0,667	27,56 (±5,16)	p= 0,789
Gebelik Haftası	34,65 (±3,99)	33,26 (±3,66)	p= 0,247	33,75 (±3,47)	p= 0,440
Gravida	2 (±1,17)	1,84 (±1,07)	p= 0,647	1,75 (±0,93)	p= 0,640
Parite	0,5 (±0,607)	0,53 (±0,77)	p= 0,879	0,44 (±0,63)	p= 0,741

Çalışma gruplarının ve kontrol grubunun plasental hTERT mRNA ekspresyon değerleri Tablo 7'de gösterilmiştir ayrıca Tablo 9'da tüm olgulara ait ekspresyon değerleri görülmektedir. Tablo 7 incelendiğinde hTERT mRNA ekspresyon değerinin kontrol grubunda en yüksek olduğu ($0,002516 \pm$

0,002090), bunu yalnızca PE grubunun takip ettiğini ($0,001453 \pm 0,001118$) ve hTERT mRNA ekspresyon değerinin PE ve IUGR grubunda en düşük düzeyde olduğu ($0,001129 \pm 0,000822$) görülmektedir. hTERT mRNA ekspresyon değeri kontrol grubuyla kıyaslandığında yalnızca PE ve PE ve IUGR gruplarının her ikisi için de azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmış olup p değerleri sırasıyla $p=0,015$, $p=0,001$ olarak bulunmuştur.

Tablo 7: Gruplarda hTERT mRNA ekspresyon değerlerinin ortalamaları ve çalışma gruplarının kontrol grubuyla karşılaştırılması

	Kontrol	PE ve IUGR	p	PE	p
N	20	19		16	
hTERT gen ekspresyonu	0,002516 ($\pm 0,002090$)	0,001129 ($\pm 0,000822$)	$p=0,001$	0,001453 ($\pm 0,001118$)	$p=0,015$

Çalışma gruplarında yer alan olgular etyopatogeneze göre erken ve geç başlangıçlı olarak sınıflandırıldıktan sonra (34 hafta sınır olarak alınarak) kontrol grubu da benzer şekilde alt gruplara ayrılarak hTERT mRNA ekspresyon değerleri karşılaştırılması Tablo 8'de görülmektedir.

Tablo 8: Alt gruplarda hTERT gen ekspresyon değeri ortalaması ve çalışma gruplarının kontrol grubuyla karşılaştırılması

<i>Erken başlangıçlı olgular</i>					
	Kontrol	PE ve IUGR	p	PE	p
N	9	9		8	
hTERT gen ekspresyonu	0,002057 (±0,000509)	0,000769 (±0,000625)	p=0,000	0,001693 (±0,001265)	p=0,059
<i>Geç başlangıçlı olgular</i>					
	Kontrol	PE ve IUGR	p	PE	p
N	11	10		8	
hTERT gen ekspresyonu	0,002891 (±0,002783)	0,001453 (±0,000870)	p=0,152	0,001212 (±0,000973)	p=0,062

Tablo 8'i incelendiğimizde erken başlangıçlı olgular değerlendirildiğinde PE ve IUGR grubunda hTERT mRNA ekspresyonu değerlerinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalmış olduğu görülmektedir ($p=0,000$). Yalnızca PE olan grupta ise elde edilen değerler daha düşük olmakla birlikte istatistiksel anlamlılık sağlanmamıştır ($p=0,059$). Geç başlangıçlı olgularda ise hem PE ve IUGR grubunda hem de yalnızca PE grubunda elde edilen hTERT mRNA ekspresyon değerleri kontrol grubuna göre daha düşük olmakla birlikte her iki grup için de istatistiksel anlamlılık yoktur (p değerleri sırasıyla $p=0,152$ ve $p=0,062$)



Tablo 9: Olgulara ait hTERT ve Aktin ekspresyon değerleri

Grup	Alt-Grup	hTERT	Aktin
Kontrol	Erken	0,00000565	24,57
Kontrol	Erken	0,00000495	22,29
Kontrol	Erken	0,00000575	25,82
Kontrol	Erken	0,00000265	25,65
Kontrol	Erken	0,00000461	24,11
Kontrol	Erken	0,00000483	24,46
Kontrol	Erken	0,00000385	23,13
Kontrol	Erken	0,00000645	22,46
Kontrol	Erken	0,00000575	24,94
Kontrol	Geç	0,00000655	26,31
Kontrol	Geç	0,0000265	24,8
Kontrol	Geç	0,00000625	21,72
Kontrol	Geç	0,00000685	18,07
Kontrol	Geç	0,000000679	19,51
Kontrol	Geç	0,00000382	21,27
Kontrol	Geç	0,00000631	22,09
Kontrol	Geç	0,00000194	21,02
Kontrol	Geç	0,00000222	21,22
Kontrol	Geç	0,00000655	21,9
Kontrol	Geç	0,00000433	21,64
Yalnız preeklampsi	Erken	0,00000263	24,68
Yalnız preeklampsi	Erken	0,00000383	23,07
Yalnız preeklampsi	Erken	0,00000323	18,93
Yalnız preeklampsi	Erken	0,000000612	19,36
Yalnız preeklampsi	Erken	0,00000323	22,35
Yalnız preeklampsi	Erken	0,00000323	21,76
Yalnız preeklampsi	Erken	0,00000293	23,54
Yalnız preeklampsi	Erken	0,0000111	24
Yalnız preeklampsi	Geç	0,00000221	20,14
Yalnız preeklampsi	Geç	0,000000609	19,35
Yalnız preeklampsi	Geç	0,000000597	19,33
Yalnız preeklampsi	Geç	0,000000393	18,72
Yalnız preeklampsi	Geç	0,00000321	23,15
Yalnız preeklampsi	Geç	0,00000521	22,45
Yalnız preeklampsi	Geç	0,00000652	22,77
Yalnız preeklampsi	Geç	0,0000025	20,99
Preeklampsi ve IUGR	Erken	0,000000345	18,53
Preeklampsi ve IUGR	Erken	0,000000563	19,24
Preeklampsi ve IUGR	Erken	0,000000371	18,64
Preeklampsi ve IUGR	Erken	0,00000162	20,27
Preeklampsi ve IUGR	Erken	0,00000152	20,68
Preeklampsi ve IUGR	Erken	0,00000154	20,7
Preeklampsi ve IUGR	Erken	0,00000414	22,12
Preeklampsi ve IUGR	Erken	0,00000374	21,97
Preeklampsi ve IUGR	Erken	0,000000763	19,68
Preeklampsi ve IUGR	Geç	0,00000703	22,88
Preeklampsi ve IUGR	Geç	0,00000398	23,04
Preeklampsi ve IUGR	Geç	0,00000208	22,18
Preeklampsi ve IUGR	Geç	0,000000462	18,95
Preeklampsi ve IUGR	Geç	0,000000743	19,64
Preeklampsi ve IUGR	Geç	0,00000408	19,29
Preeklampsi ve IUGR	Geç	0,00000298	20,65
Preeklampsi ve IUGR	Geç	0,00000498	22,06
Preeklampsi ve IUGR	Geç	0,00000228	19,11
Preeklampsi ve IUGR	Geç	0,00000248	21,27

5. TARTIŞMA

Plasental hipoksi gebelikte karşılaşılabilecek en kritik durumlardan birisidir. Uzun süreli hipoksi maruziyeti ölü doğumlar için ve preeklamps ve IUGR gibi gebelikte ilişkili hastalıklar için artmış riski beraberinde getirir.(78, 79) Maternal hipertansiyon ve proteinüri ile karakterize gebeliğe özgü bir sendrom olan preeklampsinin etyopatogenezinde plasantasyon defektlerinin ve rölatif hipoksinin rol oynadığı düşünülmektedir. IUGR etyopatogenezinde de plasental yetmezlik önemli bir nedendir ve plasental yetmezliğin oksidatif stres ve intrauterin hipoksi ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir.

Kronik oksidatif stresin kültür ortamındaki hücrelerde artmış telomer kısalmasına yol açtığı gösterilmiştir ve bu nedenle oksidatif stres altında telomer uzunluğunun daha hızlı bir şekilde kısaldığı hipotezi ortaya atılmıştır.(80, 81) Oksidatif stresin hTERT gen transkripsiyonunun baskılanması ve hTERT'in sitoplazmik translokasyonu gibi mekanizmalarla telomeraz fonksiyon bozukluğuna ve bunu takiben telomer kısalmasına yol açtığı gösterilmiştir.(82)

Normal plasental gelişimin oksijen konsantrasyonlarına büyük ölçüde bağımlılık gösterdiği düşünülmektedir.(83) Trofoblastların hipoksik koşullarda proliferasyon oldukları ve oksijene maruz kaldıklarında diferansiasyon gösterdikleri düşünülmektedir.(84) Erken gebelikte trofoblastların proliferasyonu oldukça aktiftir, endometrium ve maternal stromal damarları invaze ettikleri de göz önünde bulunursa bu özellikleri itibariyle bir nevi malign hücrelere benzetilebilirler. Bu özellikleri plasentaya tümör benzeri bir karakter verir. Bu fenomen özellikle gebeliğin başında gerçekleşir, gebelik ilerledikçe plasental evrimleşme gerçekleşir ve sonrasında plasenta durağan döneme girer. Fakat tümör invazyonunun aksine endometriuma trofoblastik invazyon sıkı denetim altındadır.(85) Bu denetim invazyonu sınırlandırır böylece invazyon primer olarak myometriumun endometrial kısmına sınırlı kalır ve yalnızca gebeliğin ortalarına kadar devam eder.(86)

Trofoblastlar erken gestasyonel dönemde geç gestasyonel dönemde olduğundan daha hızlı büyürler, bu özellikle plasentanın rölatif olarak hipoksik

bir ortamda bulunduğu plasental gelişimin ilk 10 haftası için geçerlidir.(87) Serbest radikaller ve düşük oksijen basıncı tetikli trofoblast proliferasyonu erken başlangıçlı preeklampsiye neden olabilir ve maternal morbidite ve mortalitenin major sebeplerindendir.(88) Bu süreçlerin detayları henüz net olarak ortaya konamamış olmakla beraber çeşitli proliferatif sinyallerin etkinliği olduğu düşünülmektedir.(88, 89)

Telomer uzunluğunun ve telomeraz aktivitesinin bu özel plasental karakteristikler için rol oynadığı öne sürülmektedir. Gebelik ilerledikçe telomeraz down regüle edilir ve normal gebeliklerdeki telomeraz aktivitesinin regülasyonu plasental yaşlanma ve plasental apoptozis ile ilişkilendirilebilir. Trofoblastik hastalıklardan ve erken gebelikteki normal koryonik villuslardan kaynaklı trofoblastların kısmen yüksek düzeylerde telomeraz aktivitesi eksprese ettikleri ve normal villuslardaki bu aktivitenin gebelik yaşına bağlı olarak azalma eğilimi gösterdiği daha önce gösterilmiştir.(90, 91). İlk trimestırdaki plasentalardaki telomeraz aktivitesini ikinci ve üçüncü trimestırdakilerle karşılaştıran çalışmalara bakıldığında ilk trimestır grubunda belirgin yüksek telomeraz aktivitesi ölçülmüştür.(92, 93, 94).

İnsan telomeraz katalitik alt ünitesinin (hTERT) ekspresyonu telomeraz aktivitesi ile korelasyon gösterir. Telomeraz aktivitesi hücre proliferasyonunda önemli bir faktördür ve hipoksi maruziyetinin hTERT gen ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir, bu aynı zamanda telomeraz aktivasyonunun hipoksi tarafından indüklenen genetik stres için de koruyucu olduğunu düşündürür.(95, 96) hTERT promotörü üzerinde telomeraz aktivitesini arttıran veya inhibe eden çeşitli kontrol elementlerinin ve bağlanma faktörlerinin varlığı bilinmektedir.(97) Bununla birlikte serbest radikaller tarafından indüklenen genetik stresin telomerazı hangi moleküler mekanizmalar aracılığıyla aktiveleştirdiği ayrıntılı olarak incelenmemiştir.(95)

Literatüre bakıldığında son yıllarda telomer uzunluğu, telomeraz aktivitesi, hTERT ekspresyonu ile gebeliğe özgü çeşitli hastalıklar arasındaki ilişkileri inceleyen çalışmalarda artış olduğu görülmektedir. Preeklampsi ile telomer uzunluğu arasında ilişki olmadığına dair çalışmalar olduğu gibi (8) bunun aksine preeklampsi ile telomer uzunluğunda kısalma arasında ilişkili

olduğunu gösteren çalışmalar da görülmektedir.(98) İntrauterin gelişme geriliğinin de telomer uzunluğunda kısalma ile ve telomeraz aktivitesindeki baskılanma aracılığıyla telomer uzunluğunda kısalma ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir.(10)

İnsan hücrelerinin hipoksik koşullara maruz bırakılmasının hTERT ekspresyonunun indüksiyonu aracılığıyla telomeraz aktivitesini arttırdığı daha önce gösterilmiştir.(99) Plasentada hipoksiye yanıt olarak üretilen vazoaktif ve proliferatif faktörlere ilişkin bilgiler bulunmaktadır.(78,88) Hipoksi maruziyetine yanıt olarak çeşitli faktörlerin indüksiyonu artmakta ve buna bağlı olarak hTERT transkripsiyonu indüklenmektedir.(99) Fakat mevcut verilerimiz ve bilgilerimiz hala hipoksi tarafından indüklenen hTERT ekspresyonunu tam olarak aydınlatamamaktadır. Hipoksi ve telomeraz aktivitesinin indüklenmesi arasındaki ilişki için en az iki olası mekanizma göze çarpmaktadır. Birincisi hipoksik durumlar telomer hasarına yol açarak bir DNA hasarı yaratabilir ve buna yanıt olarak çeşitli faktörler (ör. HIF-1alfa gibi) hasarlı kromozom uçlarını onarmak üzere telomerazı indükleyebilir. İkincisi ise, alternatif olarak telomerazın hipoksi indüksiyonu antiapoptotik bir yanıtı tetikleyebilir.

Preeklampsi ve intrauterin gelişme geriliği (IUGR) gebeliğe özgü hastalıklar olup plasental yetmezlikle ilişkili bozulmuş plasental implantasyona örnek olarak gösterilebilirler. Plasental yetmezlik ile birlikte olan preeklampsi ve IUGR gibi durumlarda trofoblastların daha kısa telomer uzunluğu ve azalmış hTERT ekspresyonuna sahip oldukları daha önce gösterilmiştir Bu komplikasyonların hem kısa hem de uzun dönemde maternal ve fetal morbidite ve mortalite üzerine etkileri vardır. Bu iki durum eş zamanlı görülebileceği gibi birbirinden bağımsız olarak da boy gösterebilir. Preeklampsi ve IUGR ile komplike olan gebeliklere ait plasentalar incelendiğinde karakteristik olarak benzer yapısal ve hücrel anormalliklerin olduğu gözlenmiştir. Preeklampsi ve IUGR'de anormal plasental fonksiyonlar ortak olsa da bu hastalıkların maternal belirtileri aynı olmak zorunda değildir. Bu iki durumdan sadece biri olan tüm hastalarda diğerinin de gelişmemesi ileri araştırma gerektiren bir durumdur. Hipoksinin hem preeklampsi hem de IUGR için anahtar bir özellik olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda preeklampsi gelişen gebeliklerde preeklampsi IUGR ile komplike olsun ya da olmasın elde edilen plasental örneklerde hTERT mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalmış olduğu bulundu ($p=0,001$ ve $p=0,015$). Tablo 7’de de görüldüğü üzere preeklampsi ve IUGR ile komplike olan gebeliklere ait plasental örnekler kontrol grubuyla kıyaslanmış ve hTERT ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüştür ($p=0,001$), benzer şekilde yalnızca preeklampsi ile komplike olan gebeliklere ait plasental örnekler kontrol grubuyla kıyaslandığında da yine istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüştür ($p=0,015$). Literatüre bakıldığında preeklampsi ile komplike olan gebeliklerdeki hTERT ekspresyonunu değerlendiren çalışmaların mevcut olduğu görülmektedir. Çalışmamıza benzer metodolojide preeklampitik gebelerde hTERT mRNA ekspresyonunu rt-PCR ile değerlendiren bir çalışmada preeklampitik olgularda daha yüksek hTERT mRNA ekspresyon değerleri olduğu saptanmıştır.(100) hTERT upregülasyonunun apoptozise karşı koymada bir biyolojik yanıt olduğu ve apoptozis ile indüklendiği öne sürülmüştür. Fakat bu çalışmada da telomeraz aktivitesinin veya telomer uzunluğunun direk değerlendirilen faktörler olmadığı gözükmemektedir. Preeklampsi, IUGR ve IUGR ile komplike olan preeklampsi olgularında FISH ile telomer uzunluğunu ve immünohistokimyası ile hTERT ekspresyonunu değerlendiren başka bir çalışmada ise elde edilen sonuçlarda araştırılan her üç grup için de kontrollere kıyasla telomer uzunluğunda kısalma olduğu ve hTERT ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır.(98) Burada gözlenen hTERT ekspresyonunun düşük olması telomeraz aktivitesindeki azalmayı düşündürecek olduğu göze alınırsa telomer uzunluğundaki kısalmanın da gözlenmesi bu düşüncayı desteklemektedir. Öte yandan hTERT gen transkripsiyonunun telomeraz aktivitesi ile yakından ilişkili olduğu bilinmesine ve bununla birlikte çalışmalar her ne kadar hTERT’in transkripsiyonel regülasyonu üzerine yoğunlaşmış olsa da elde edilen veriler git gide telomeraz regülasyonunun kompleks bir mekanizma olduğuna işaret etmektedir.(101) hTERT’in transkripsiyonel regülasyonunun yanı sıra nükleer lokalizasyon, telomeraz holoenziminin toplanması, telomerazın telomere seçilimi, ve telomeraz enziminin transkripsiyon işlemi sonrası modifikasyonu da artık yoğun araştırma konusu olan noktalar olarak değerlendirilmektedir.(102) hTERT’in

lokalizasyonu ve fonksiyon yeri nükleus olarak gözükmemektedir. Oksidatif stresin hTERT'in nükleustan sitoplazmaya translokasyonunu tetiklediği gösterilmiş olup bu telomerazın fonksiyonel bozukluğuna örnek olarak gösterilebilir.(103) Aynı zamanda çeşitli araştırmacılar bazı proteinlerin oksidatif stres nedeniyle nükleer translokasyonunun bozulduğunu bildirmektedir.(104, 105) Tüm bu bulgular göz önünde bulundurulduğunda kesin olan bir şey varsa oksidatif stresin telomeraz aktivitesini sadece transkripsiyonel düzeyde etkilemediği, aynı zamanda hTERT'in normal olan nükleer lokalizasyonunu değişmesine yol açabildiği ve bunun telomeraz fonksiyon kaybı ile sonuçlanabildiğidir.(101) Bu nedenle bundan sonra yapılacak çalışmalarda bu dinamiklerin daha iyi ve net şekilde anlaşılabilmesi için telomer uzunluğu, hTERT ekspresyonu ve telomeraz aktivitesinin eş zamanlı çalışılması gerekliliğinin yanında sentezi yapılan bu faktörlerin hücre içi lokalizasyonları da çalışılmalıdır.

İlaveten çalışmaya dahil olan olguların araştırılan gebeliğe özgü hastalıkların etyopatogeneze göre erken ve geç başlangıçlı olarak alt gruplara ayrılması sonucu yapılan incelemede çalışma gruplarında hTERT mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol gruplarından daha düşük olma eğiliminde olduğunu (Tablo 8 ve Tablo 9), bununla birlikte görülen azalmadaki istatistiksel olarak anlamlılığın sadece erken başlangıçlı preeklamps ve IUGR grubunda sağlandığını görmekteyiz ($p=0,000$). Bildiğimiz kadarıyla literatürde çalışılan hastalıkları çalışmamızdaki gibi erken ve geç başlangıçlı olarak gruplandıran başka bir çalışma bulunmamaktadır. Elde edilen bu farklılığın ışığında incelenen hastalıkları erken başlangıçlı ve geç başlangıçlı olarak değerlendirdiğimizde her iki grubun da etyopatogenezinde farklı mekanizmaların etkili olabileceğini düşünmek doğru olacaktır.

Sonuç olarak preeklamps ile komplike gebeliklerde hTERT ekspresyonunun azalmış olduğunu göstermiş bulunuyoruz. Bu konuda literatürdeki farklı bulgular olduğu göz önünde bulundurulduğunda bu konunun hala net olarak ortaya konamamış güncel bir araştırma konusu olduğu göze çarpmaktadır ve plasental telomer homeostaz mekanizmalarının daha kesin bir biçimde araştırılmasının ve aydınlatılmasının gerekliliği görülmektedir. Trofoblastik dokulardaki telomer biyolojisinin daha iyi anlaşılması ile

preeklampsi ve IUGR gibi hastalıklara dair bilgilerimizi geliştirebileceği aşikardır. Hatta bu mekanizma ve etkileşimlerin anlaşılması ile çeşitli markerlar geliştirilerek bu hastalıkların gelişimi açısından riskli bireylerin takibine ve yönetimine yönelik ek bilgiler de kazanılacaktır. Gebeliğe özgü bu hastalıkların etyopatogenezinde yatan hipoksi ve stres ilişkili mekanizmaların ve dolayısıyla bu hastalıkların daha iyi anlaşılabilmesi için telomer biyolojisinin anlaşılmasında ışık tutacak daha büyük ölçekli ve telomer uzunluğu, temoleraz aktivitesi ve hTERT ekspresyonunu eş zamanlı olarak değerlendirecek daha kapsamlı çalışmalar gerekmektedir.



6. SONUÇ

Çalışmaya olgu alımında gruplara maternal yaş ve gebelik haftasına göre eşleşmiş olacak şekilde dengeli dağılımın yapılması esas alınmıştı. Diyabet ve gestasyonel diyabetin hTERT ekspresyonu üzerine olası etkisini ortadan kaldırmak için bu ek hastalığı olan hastalar çalışmaya dahil edilmemişti. Çalışmaya dahil olan olguların gruplar arası demografik özellikleri (yaş, gebelik haftası, gravida, parite) incelendiğinde gruplar arası uyumsuzluk veya bu parametreler için istatistiksel farklılık olmadığı gözükmemektedir.

hTERT ekspresyon düzeylerine baktığımızda yalnızca preeklampsi grubunda da, preeklampsi ve IUGR grubunda da kontrol grubuna kıyasla ekspresyon düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış olduğu gözükmemektedir. Bu bize intrauterin gelişme geriliği eşlik etsin veya etmesin preeklampitik gebeliklerde hTERT ekspresyon düzeyinde azalmanın karakteristik bir özellik olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışma grupları ayrıca 34 hafta sınır olarak alınarak erken ve geç başlangıçlı olarak alt gruplara ayrılıp incelenmiştir. Erken başlangıçlı olgularda yalnızca preeklampsi grubunun kontrollerle arasında hTERT ekspresyon düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık yokken, preeklampsi ve IUGR grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlı farklılık olduğu gözükmemektedir. Geç başlangıçlı olguları değerlendirdiğimizde ise her iki grubun da kontrollere kıyasla hTERT ekspresyon düzeyi açısından istatistiksel anlamlı farklılık göstermediği gözükmemektedir. Bunun sonucunda alt gruplardan sadece erken başlangıçlı preeklampsi ve IUGR grubunda hTERT ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu gözükmemekte ve bu farklılık bize incelenen alt grupların etyopatogenezinde farklı mekanizmaların etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Gebeliğe özgü bu hastalıkların etyopatogenezinde yatan hipoksi ve stres ilişkili mekanizmaların ve dolayısıyla bu hastalıkların daha iyi anlaşılabilmesi için telomer biyolojisinin anlaşılmasında ışık tutacak daha büyük ölçekli ve telomer uzunluğu, temoleraz aktivitesi ve hTERT ekspresyonunu eş zamanlı olarak değerlendirecek daha kapsamlı çalışmalar gerekmektedir.

7. ÖZET

Amaç: Normal gebeliklere, preeklampsi ile komplike olmuş gebeliklere ve preeklampsi ve IUGR ile komplike olmuş gebeliklere ait plasental örneklerde hTERT mRNA düzeyleri araştırılmıştır ve bu farklı gruplardaki hTERT ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır.

Materyal Metod: Preeklampsi olan ve preeklampsi ve IUGR olan term ve preterm gebeliklere ait plasentalardan biyopsiler alınıp hTERT mRNA düzeyleri etkilenmemiş gebeliklerle karşılaştırılmıştır. Oluşturulan gruplar doğum sırasında 24-34 gebelik haftası arasında yer alan olgular erken ve 34 haftadan daha büyük gebelik haftasındaki olgular geç olmak üzere ayrıca alt gruplara da ayrılmıştır. Preeklampsi ve IUGR grubu olarak 19 olgudan (9'u erken, 10'u geç başlangıçlı), yalnızca preeklampsi grubu olarak 16 olgudan (8'i erken, 8'i geç başlangıçlı) plasental biyopsiler alınmıştır. Kontrol grubu olgular çalışma grupları ile gebelik haftası ve maternal yaş bakımından eşleştirilerek dahil edilmiştir ve 20 olgudan (9'u erken, 11'i geç başlangıçlı) oluşmuştur. Plasenta doku örneklerinde hedef genimiz hTERT'in mRNA düzeyindeki değişiklikleri belirlemek amacıyla gen ekspresyonlarına bakılmıştır. Bu amaçla dokulardan total RNA izolasyonunu takiben, cDNA sentezi gerçekleştirilmiş ve belirlenen PCR protokolleri ile mRNA seviyesindeki gen ekspresyonları belirlenmiştir.

Bulgular: hTERT mRNA ekspresyon değeri kontrol grubuyla kıyaslandığında yalnızca preeklampsi ve preeklampsi ve IUGR gruplarının her ikisi için de azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmış olup p değerleri sırasıyla $p=0,015$, $p=0,001$ olarak bulunmuştur. Alt gruplara bakıldığında ise sadece erken başlangıçlı preeklampsi ve IUGR grubunda hTERT mRNA ekspresyonu değerlerinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalmış olduğu ($p=0,000$), diğer alt gruplarda kontrollere kıyasla istatistiksel farklılık gözlenmediği bulunmuştur.

Sonuç: Preeklampsi ile komplike olan gebeliklerde IUGR eşlik etsin veya etmesin hTERT mRNA ekspresyon düzeylerinde azalma olduğu görülmüştür. Alt gruplara bakıldığında ise bu farklılığın sadece erken başlangıçlı

preeklampsi ve IUGR grubunda olduğu gözükmehtedir. Bu bulguların patofizyolojik anlamlılığının daha iyi anlaşılabilmesi ve bu bağlamda gebeliğe özgü bu hastalıkların daha iyi anlaşılabilmesi için telomer biyolojisinin anlaşılmasına ışık tutacak çalışmalar gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Plasenta; Telomer; Telomeraz; hTERT; Preeklampsi; IUGR



KAYNAKLAR

1. National High Blood Pressure Education Program Working Group, Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy, *Am J Obstet Gynecol*, 183, 1-22, (2000)
2. National High Blood Pressure Education Program Working Group, National High Blood Pressure Education Working Group: High blood pressure during pregnancy, *Am J Obstet Gynecol*, 163, 1689-1712, (1990)
3. American College of Obstetricians and Gynecologists, American College of Obstetricians and Gynecologists: Hypertension in pregnancy. Washington, DC, The college; Technical Bulletin No. 219, (1996)
4. Steegers EA., von Dadelszen P., Duvekot JJ., Pijnenborg R., Preeclampsia. *Lancet*, 21, 376, 631-44, (2010)
5. Roberts JM., Hubel CA., The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. *Placenta*, 30, 32-7, (2009)
6. Sampson MJ, Winterbone MS, Hughes JC, Dozio N, Hughes DA: Monocyte telomere shortening and oxidative DNA damage in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 29(2):283-289., (2006)
7. Saretzki G, Von Zglinicki T: Replicative aging, telomeres, and oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci*, 959:24-29., (2002)
8. Harville EW, Williams MA, Qiu CF, Mejia J, Risques RA. Telomere length, pre-eclampsia, and gestational diabetes. *BMC Res Notes*. Apr 23;3:113., (2010)
9. Biron-Shental T, Sukenik-Halevy R, Sharon Y, Goldberg-Bittman L, Kidron D, Fejgin MD, Amiel A. Short telomeres may play a role in placental dysfunction in preeclampsia and intrauterine growth restriction.

10. Davy P, Nagata M, Bullard P, Fogelson NS, Allsopp R. Fetal growth restriction is associated with accelerated telomere shortening and increased expression of cell senescence markers in the placenta. *Placenta*. Jun;30(6):539-42., (2009)
11. Khan KS., Wojdyla D., Say L., WHO analysis of causes of maternal death: A systematic review., *Lancet* 367, 1066, (2006)
12. Madazlı R., Özgön M., Aksu M.F., Köse Y., Maternal Mortality in Cerrahpasa Medical Faculty Department of Obstetrics and Gynecology and Intensive Care Unit. Weinstein D, Chervenak F, The First World Congress on Maternal Mortality. Monduzzo Editore, Pp 145-148 (1997)
13. Levine RJ., Ewell MG., Hauth JC., Curet LB., Catalano PM., Morris CD., Choudhary G., Sibai BM., Should the definition of preeclampsia include a rise in diastolic blood pressure of ≥ 15 mm Hg to a level < 90 mm Hg in association with proteinuria?, *Am J Obstet Gynecol.*, 183, 787-92, (2000)
14. North RA., Taylor RS., Schellenberg JC., Evaluation of a definition of pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*, 106, 767-73, (1999).
15. Alexander JM., McIntire DD., Leveno KJ., Cunningham FG., Selective magnesium sulfate prophylaxis for the prevention of eclampsia in women with gestational hypertension. *Obstet Gynecol*, 108, 826-32, (2006)
16. Lindheimer MD., Conrad KP., Karumanchi SA., Renal physiology and disease in pregnancy,. Seldin and Giebisch's *The Kidney; Physiology and Pathophysiology*, 4th ed., Alpern RJ, Hebert SC, Academic Press, Elsevier, San Diego, California, Pp 2339 –98, (2008)
17. Cunningham FG., Leveno KJ., Bloom SL., Hauth JC., Rouse DJ., Spong CY., Chapter 34 Pregnancy Hypertension, *Williams obstetrics*. 23rd Edition McGraw-Hill, New York, Pp 706-756, (2009)

-
18. Lawlor DA., Morton SM., Nitsch D., Leon DA., Association between childhood and adulthood socioeconomic position and pregnancy induced hypertension: results from the Aberdeen children of the 1950s cohort study., *J Epidemiol Community Health*, 59, 49-55, (2005)
 19. Palmer SK., Moore LG., Young D., Cregger B., Berman JC., Zamudio S., Altered blood pressure course during normal pregnancy and increased preeclampsia at high altitude (3100 meters) in Colorado., *Am J Obstet Gynecol.*, 180,1161-8, (1999).
 20. Ananth CV, Basso O., Impact of pregnancy-induced hypertension on stillbirth and neonatal mortality., *Epidemiology*, 21, 118-23, (2010).
 21. Conde-Agudelo A., Belizán JM., Risk factors for pre-eclampsia in a large cohort of Latin American and Caribbean women., *BJOG*, 107, 75-83, (2000)
 22. Sibai BM., Ewell M., Levine RJ., Klebanoff MA., Esterlitz J., Catalano PM., Goldenberg RL., Joffe G., Risk factors associated with preeclampsia in healthy nulliparous women., The Calcium for Preeclampsia Prevention (CPEP) Study Group., *Am J Obstet Gynecol.*, 177, 1003-10, (1997)
 23. Walker JJ., Pre-eclampsia., *Lancet*, 356, 1260-5, (2000)
 24. Sibai BM., Hauth J., Caritis S., Lindheimer MD., MacPherson C., Klebanoff M., VanDorsten JP., Landon M., Miodovnik M., Paul R., Meis P., Thurnau G., Dombrowski M., Roberts J., McNellis D., Hypertensive disorders in twin versus singleton gestations. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units., *Am J Obstet Gynecol*, 182, 938-42, (2000)
 25. Getahun D., Ananth CV., Oyelese Y., Chavez MR., Kirby RS., Smulian JC., Primary preeclampsia in the second pregnancy: effects of changes in prepregnancy body mass index between pregnancies., *Obstet Gynecol*, 110, 1319-25, (2007)

-
26. Bainbridge SA., Sidle EH., Smith GN., Direct placental effects of cigarette smoke protect women from pre-eclampsia: The specific roles of carbon monoxide and antioxidant systems in the placenta., *Med Hypotheses*, 64, 17-27, (2005)
 27. Zhang J., Klebanoff MA., Levine RJ., The puzzling association between smoking and hypertension during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 18, 1407- 13, (1999)
 28. Ananth CV, Bowes WA, Savitz DA, et al: Relationship between pregnancy- induced hypertension and placenta previa: A population-based study. *Am J Obstet Gynecol*, 177, 997- (1997)
 29. ACOG Committee on Obstetric Practice., ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January. American College of Obstetricians and Gynecologists., *Int J Gynaecol Obstet*, 77, 67-75 (2002)
 30. Redman CWG., Sargent IL., Roberts JM., Immunology of abnormal pregnancy and preeclampsia., *Chesley's Hypertensive Disorders of Pregnancy*, 3rd ed., Lindheimer MD, Roberts JM, Cunningham FG (eds), Elsevier, New York, Pp:129, (2009)
 31. Robertson WB., Brosens I., Dixon G., Maternal uterine vascular lesions in the hypertensive complications of pregnancy., *Hypertension in pregnancy*, Lindheimer MD., Katz Al., Zuspan FP., John Wiley, New York, 115-29, (1976)
 32. Pijnenborg R., Trophoblast invasion and placentation in the human: morphological aspects., *Trophoblast Res*, 4, 33-47, (1990)
 33. Zhou Y., Fisher SJ., Janatpour M., Genbacev O., Dejana E., Wheelock M., Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate: a strategy for successful endovascular invasion?, *J Clin Invest*, 99, 2139-51, (1997)
 34. Zhou Y., Damsky CH., Chiu K., Roberts JM., Fisher SJ., Preeclampsia is

-
- associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts., *J Clin Invest*, 91, 950-60, (1993)
35. Fox H., The placenta in pregnancy hypertension. In: Rubin PC, editor. *Handbook of hypertension, volume 10: hypertension in pregnancy.*, Elsevier, New York, 16-37, (1988)
 36. Harrison GA., Humphrey KE., Jones N., Badenhop R., Guo G., Elakis G., A genomewide linkage study of preeclampsia/eclampsia reveals evidence for a candidate region on 4q., *Am J Hum Genet*, 60, 1158-67, (1997)
 37. Taylor RN., Review: immunobiology of preeclampsia., *Am J Reprod Immunol*, 37, 79-86, (1997)
 38. Huppertz B., Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis., *Hypertension*, 51, 970-5, (2008)
 39. Seeds JW., Impaired fetal growth: definition and clinical diagnosis., *Obstet Gynecol*, 64, 303-310, (1984).
 40. Raphael NP., Micheal YD., Intrauterine growth retardation: Definition, classification and etiology., *Clin Obstet Gynecol*, 35, 99-107, (1992)
 41. Campbell S., Thoms A., Ultrasound measurement of the fetal head to abdomen circumference ratio in the assessment of growth retardation., *Br J Obstet Gynaecol*, 84, 165-174, (1977)
 42. Campbell S., Fetal growth., *Clin Obstet Gynecol*, 1, 41-47, (1974)
 43. Gruenwald P., Growth of human fetus: Normal growth and its variation., *Am J Obstet Gynecol*, 94, 1112-1118, (1966)
 44. Cunningham FG., Leveno KJ., Bloom SL., Hauth JC., Rouse DJ., Spong CY., Chapter 38 Fetal Growth Disorders, *Williams obstetrics*. 23rd Edition., McGraw-Hill, New York, Pp 842-858., (2009)
 45. Baschat AA., Gembruch U., Harman CR., The sequence of changes in

-
- Doppler and biophysical parameters as severe fetal growth restriction worsens., *Ultrasound Obstet Gynecol*, 18:571-7, (2001)
46. Önderoğlu L, İntrauterin büyüme geriliğinin tanı ve takibi, *TJOD Uzmanlık Sonrası Eğitim Dergisi*, 8, 150-156, (2004)
 47. Resnik R., Intrauterine growth restriction., *Obstet Gynecol*, 99, 490-496, (2002)
 48. Kupferminc MJ., Peri H., Zwang E., Yaron Y., Wolman I., Eldor A., High prevalence of prothrombin gene mutation in women with intrauterine growth retardation, abruptio placenta and second trimester loss., *Acta Obstet Gynecol Scand*, 79, 963-7, (2000)
 49. Martinelli P., Grandone E., Colaizzo D., Familial thrombophilia and the occurrence of fetal growth restriction., *Hematologica*, 86, 428-31, (2001)
 50. Heilman L., von Tempelhoff GF., Pollow K., Antiphospholipid syndrome in obstetrics., *Clin Appl Thromb Hemost*, 9, 143-50, (2003)
 51. Heionen S., Taipale P., Saaroski S., Weights of placentae from small-for-gestational infants revisited., *Placenta*, 22, 399-404, (2001)
 52. Krebs C., Macara LM., Leiser R., Bowman AW., Greer IA., Kingdom JC., Intrauterine growth restriction with absent end diastolic flow velocity is associated with maldevelopment of the placental terminal villous tree., *Am J Obstet Gynecol*, 175, 1534-42, (1996)
 53. Baschat AA., Fetal growth restriction – From observation to intervention., *J Perinat Med*, 38, 239–246, (2010).
 54. Cartwright JE., Fraser R., Leslie K., Wallace AE., James JL., Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders., *Reproduction*, 140, 803-13, (2010)
 55. Blackburn EH, Structure and function of telomeres. *Nature* 350: 569-573, (1991)

-
56. Blackburn EH, Telomere structure and synthesis. *J Biol Chem* 265: 5919-5921, (1990)
 57. Blackburn, E. H. and Gall, J. G., A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J. Mol. Biol.* 120, 33-53, (1978)
 58. Blackburn, E. H., Switching and signaling at the telomere. *Cell*, 106(6),66-173, (2001)
 59. de Lange T., Shiue L., Myers R.M., Cox D.R., Naylor S.L., Killery A.M., and Varmus H.E., Structure and variability of human chromosome ends. *Mol. Cell. Biol.* 10: 518, (1990)
 60. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep;85(18):6622-6, (1988)
 61. Henderson ER, Blackburn EH., An overhanging 3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol Cell Biol.*,9(1):345-8, (1989)
 62. Stansel, R.M., de Lange, T., and Griffith, J.D., T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3- telomeric overhang *EMBO J.* 20, E5532– E5540, (2001)
 63. Theimer, C. a, & Feigon, J., Structure and function of telomerase RNA. *Current opinion in structural biology*, 16(3), 307-18, (2006)
 64. Kilian, A., Bowtell, D.D.L. and Abud, H.E., Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex slicing patterns in different cell types. *Hum. Mol. Genet.*, 6, 2011–2019., (1997)
 65. Prescott JC, Blackburn EH. Telomerase: Dr Jekyll or Mr Hyde? *Curr Opin Genet Dev.* 1999 Jun;9(3):368-73. Review., (1999)
 66. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*, 33(5),787-791, (1997)

-
67. Zakian VA. Life and cancer without telomerase. *Cell*. 1997 Oct 3;91(1):1-3. Review., (1997)
 68. Zakian VA. Telomeres: beginning to understand the end. *Science*. 1995 Dec 8;270(5242):1601-7. Review., (1995)
 69. Harrington L, Robinson MO. Telomere dysfunction: multiple paths to the same end. *Oncogene*. Jan 21;21(4):592-7. Review, (2002)
 70. Urquidi, V., Tarin, D., Goodison, S. Role of telomerase in cell senescence and oncogenesis. *Annu. Rev. Med.*, 51: 65–79, (2000)
 71. Blasco, M.A., M. Rizen, C.W. Greider, and D. Hanahan., Differential regulation of telomerase activity and telomerase RNA during multi-stage tumorigenesis. *Nature Genet*.12: 200 -204, (1995)
 72. Cong, Y.-sheng, Wright, W. E., & Shay, J. W., Human Telomerase and Its Regulation, 66(3), 407-425, (2002)
 73. Harley CB. Telomerase is not an oncogene. *Oncogene*, 21: 494-502, (2002)
 74. Ulaner GA, Hu J, Vu TH, Giudice LC, Hoffman AR. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res*, 58: 4168–72, (1998)
 75. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW, Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes.*Nat Med*. 1(3):249-55, (1995)
 76. Aisner DL, Wright WE, Shay JW. Telomerase regulation: not just flipping the switch. *Curr Opin Genet Dev*; 12: 80–85, (2002)
 77. Wong JM, Kusdra L, Collins K. Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage. *Nat Cell Biol*, 4: 731–36, (2002)

-
78. Rajakumar, A., and K. P. Conrad., Expression, ontogeny, and regulation of hypoxia-inducible transcription factors in the human placenta. *Biol. Reprod.* 63:559–569. (1990)
 79. Smith R, Maiti K, Aitken RJ. Unexplained antepartum stillbirth: a consequence of placental aging? *Placenta.* Apr;34(4):310-3, (2013)
 80. Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, Cawthon RM. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101:17312e5, (2004)
 81. Cattan V, Mercier N, Gardner JP, Regnault V, Labat C, Ma'ki-Jouppila J, Nzietchueng R, Benetos A, Kimura M, Aviv A, Lacolley P. Chronic oxidative stress induces a tissue-specific reduction in telomere length in CAST/Ei mice. *Free Radic Biol Med*, 44:1592e8, (2008)
 82. Katakura Y., *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334, 450–459 457, (2005)
 83. Kaufmann P, Castellucci M. Extravillous trophoblast in the human placenta e a review. *Trophoblast Res*, 10:21e65, (1997)
 84. Gosseye S, Fox H. An immunohistological comparison of the secretory capacity of villous and extravillous trophoblast in the human placenta. *Placenta*, 5:329e47, (1984)
 85. Berkotz, R. S., and D. P. Goldstein., Chorionic tumors. *N. Engl. J. Med.* 335:1740–1748, (1996)
 86. Shimonovitz, S., A. Hurwitz, M. Dushnik, E. Anteby, T. Geva-Eldar, and S. Yagel., Developmental regulation of the expression of 72 and 92 kd type 4 collagenases in human trophoblasts: a possible mechanism for control of trophoblast invasion. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 171:832–838, (1994)
 87. Schammel, D. P., and T. Bocklage. p53 PCNA, and Ki-67 in hydropic molar and nonmolar placentas: an immunohistochemical study. *Int. J.*

Gy- necol. Pathol. 15:158–166, (1996)

88. Caniggia, I., S. Grisaru-Gravnosky, M. Kuliszewsky, M. Post, and S. J. Lye. Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *J. Clin. Investig.* 103:1641–1650, (1999)
89. Bamberger CM, Minas V, Bamberger AM, Charalampopoulos I, Fragouli Y, Schulte HM, et al. Expression of urocortin in the extravillous human tropho- blast at the implantation site. *Placenta*, 28:127e32, (2007)
90. Kyo, S., M. Takakura, M. Tanaka, T. Kanaya, T. Sagawa, T. Kohama, H. Ishikawa, T. Nakano, K. Shimoya, and M. Inoue. Expression of telomerase activity in human chorion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241:498–503, (1997)
91. Nishi, H., N. Yahata, K. Ohyashiki, K. Isaka, K. Shiraishi, J. H. Ohyashiki, K. Toyama, and M. Takayama. Comparison of telomerase activity in normal chorionic villi to trophoblastic diseases. *Int. J. Oncol.* 12:81–85, (1998)
92. Kyo S, Takakura M, Tanaka M, Kanaya T, Sagawa T, Kohama T, Ishikawa H, Nakano T, Shimoya K, Inoue M. Expression of telomerase activity in human chorion. *Biochem Biophys Res Commun*, 241:498e503, (1997)
93. Chen RJ, Chu CT, Huang SC, Chow SN, Hsieh CY. Telomerase activity in gestational trophoblastic disease and placental tissue from early and late human pregnancies. *Hum Reprod*, 17:463e8, (2002)
94. Izutsu T, Izutsu N, Iwane A, Takada A, Nagasawa T, Kanasugi T, Sugiyama T. Expression of human telomerase reverse transcriptase and correlation with telomerase activity in placentas with and without intrauterine growth retardation. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 85: 3e11, (2006)
95. Minamino, T., Mitsialis S. A., Kourembanas S., Hypoxia extends the life

-
- span of vascular smooth muscle cells through telomerase activation. *Mol. Cell. Biol.* 21:3336–3342, (2001)
96. Seimiya, H., M. Tanji, T. Oh-hara, A. Tomida, I. Naasani, and T. Tsuruo.. Hypoxia up-regulates telomerase activity via mitogen-activated protein kinase signaling in human solid tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260:365–370, (1999)
97. Kyo S, Takakura M, Taira T, Kanaya H, Itoh M, Yutsudo M, et al. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res*, 28:669e77, (2000)
98. Biron-Shental T, Sukenik-Halevy R, Sharon Y, Goldberg-Bittman L, Kidron D, Fejgin MD, Amiel A. Short telomeres may play a role in placental dysfunction in preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* Apr;202(4):381.e1-7, (2010)
99. Nishi H, Nakada T, Kyo S, Inoue M, Shay JW, Isaka K. Hypoxia-inducible factor 1 mediates upregulation of telomerase (hTERT). *Mol Cell Biol.* Jul;24(13):6076-83, (2004)
100. Geifman-Holtzman O, Xiong Y, Holtzman EJ, Hoffman B, Gaughan J, Liebermann DA. Increased placental telomerase mRNA in hypertensive disorders of pregnancy. *Hypertens Pregnancy.*29(4):434-45, (2010)
101. Katakura Y, Yoshizaki K, Yasuda T, Tsunematsu T, Uehara N, Miura T, Fujiki T, Shirahata S. Functional impairment of telomerase in sublines derived from human lung adenocarcinoma exposed to mild oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.* Aug 26;334(2):450-9., (2005)
102. Aisner D.L., Wright W.E., Shay J.W., Telomerase regulation: not just flipping the switch, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12 80–85, (2002)
103. Haendeler J., Hoffmann J., Brandes R.P., Zeiher A.M., Dimmeler S.,

Hydrogen peroxide triggers nuclear export of telomerase reverse transcriptase via Src kinase family-dependent phosphorylation of tyrosine 707, *Mol. Cell. Biol.* 23 4598–4610, (2003)

104. Stochaj U., Rassadi R., Chiu J., Stress-mediated inhibition of the classical nuclear protein import pathway and nuclear accumulation of the small GTPase Gsp1p, *FASEB J.* 14 2130–2132, (2000)
105. Okamoto K., Tanaka H., Ogawa H., Makino Y., Eguchi H., Hayashi S., Yoshikawa N., Poellinger L., Umesono K., Makino I., Redox-dependent regulation of nuclear import of the glucocorticoid receptor, *J. Biol. Chem.* 274 10363–10371, (1999)