



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

PREEKLAMPTİK GEBELİKLERDE PLASENTA VE KANDAN ELDE EDİLEN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDE TRANSKRİPTOM ANALİZİ

Zeynep KUMRAL

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Tuba GÜNEL**

Şubat, 2021

İSTANBUL

Bu alışma, 15.02.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Tuba GÜNEL (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Ercan BAŞTU
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi
Tıp Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 32693 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans sürecimde bana inanıp yoluma ışık tutan, sorumluluk almayı ve bir işi en iyi şekilde sonlandırabilmeyi, ne sorun çıkarsa çıksın her zaman çözüm üretebilmeyi bana öğreten, bilgisiyle, tecrübesiyle, samimiyeti ve sevgisiyle beni her zaman motive eden değerli danışman hocam Prof. Dr. Tuba GÜNEL'e;

Hasta materyallerinin sağlanmasındaki emeklerinden dolayı Prof. Dr. Ali BENİAN ve Doç. Dr. Hale GÖKSEVER ÇELİK'e;

Kök hücre çalışmalarımızda bize laboratuvarını açan Koç Üniversitesi hocalarından Öğr. Üyesi Dr. Serçin KARAHÜSEYİNOĞLU'na;

İstanbul Üniversitesi Genetik Hastalıklar ve Moleküler Analiz Birimi Laboratuvarına ilk girdiğim andan itibaren bana yabancılık hissettirmeyen, tüm stresimizi de mutluluğumuzu da beraber paylaştığımız ve bu süreçte benden desteğini asla esirgemeyen canım arkadaşım İrem Gülfem ALBAYRAK'a ve tüm laboratuvar ekip arkadaşlarıma;

Bu hayatta yaptığım her şeyde, aldığım her kararda benden hiçbir şey esirgemeyen ve koşulsuz hep yanımda olan, bana benden daha çok inanan, benim için her zaman her şeyin en iyisini düşünen, en başta mutlu olabilmeyi, güçlü olmayı ve başarılı olabilmek için gereken azmi bana öğreten meleğim Fatoş KUMRAL, babam Orhan KUMRAL ve bir diğer annem Alev KUMRAL'a;

Bu süreçte bana verdikleri destek ve anlayış için sonsuz teşekkür ederim.

Şubat 2021

Zeynep KUMRAL

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xiv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1 İNSAN PLASENTASININ FONKSİYONU, OLUŞUMU VE GELİŞİMİ	4
2.2 GEBELİKTE HİPERTANSİF HASTALIKLAR	6
2.3 PREEKLAMPSİ NEDİR?	7
2.3.1 Preeklampsisi Tanı Kriterleri	8
2.3.2 Preeklampsinin Risk Faktörleri ve Epidemiyolojisi	9
2.3.2.1 Genetik Risk Faktörleri	11
2.3.4 Preeklampsinin Patogenezi	12
2.3.5 Plasentanın Anormal Düzenlenmesi	13
2.4 PREEKLAMPSİNİN TANISINDA KULLANILAN BİYOBELİRTEÇLER	15
2.4.1 Değişen Anjiyogenik Denge	15
2.4.2 Gebelik ile İlişkili Plazma Protein-A	17
2.4.3 Plasental Protein 13	17
2.4.4 Fetal Hemoglobin ve Alfa 1-Mikroglobulin	18
2.4.5 İnhibin A ve Aktivin A	18
2.5 PREEKLAMPSİ İLE İLİŞKİLİ ADAY GENLER	19
2.5.1 VEGF(A) Geni	23
2.5.2 TIMP-1 Geni	24
2.5.3 EFNA3 Geni	24
2.5.4 THSD7A Geni	25
2.6 KÖK HÜCRENİN TANIMI VE SINIFLANDIRILMASI	25
2.6.1 Mezenkimal Kök Hücre	28

2.6.1.1 Plasental Mezenkimal Kök Hücre (P-MKH)	29
2.6.1.2 Periferik Kan Kökenli Mezenkimal Kök Hücre (PK-MKH)	30
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	31
3.1 ÖRNEKLERİN ELDE EDİLMESİ	31
3.2 MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KÜLTÜRÜ.....	31
3.2.1 Placenta Desidua Dokusundan Mezenkimal Kök Hücre Kültürü	31
3.2.2 Periferik Kandan Mezenkimal Kök Hücre Kültürü	33
3.3 MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN AYIRT EDİLMESİ.....	34
3.3.1 Akım Sitometri Yöntemi (“Flow Cytometry”)	34
3.4 MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDEN GEN ANLATIM ANALİZİ	36
3.4.1 Total RNA İzolasyonu.....	36
3.4.2 Total RNA’dan cDNA Sentezi	38
3.4.3 Primer Tasarlama.....	39
3.4.4 Damlacıklı Dijital Polimeraz Zincir Reaksiyonu	39
3.5 VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ.....	43
4. BULGULAR.....	44
4.1 ÖRNEKLERİN SEÇİMİ.....	44
4.2 MEZENKİMAL KÖK HÜCRE (MKH) KÜLTÜRÜ.....	45
4.2.1 Placenta Desidua Dokusundan Mezenkimal Kök Hücre Kültürü	45
4.2.2 Periferik Kandan Mezenkimal Kök Hücre Kültürü	46
4.3 MEZENKİMAL KÖK HÜCRE AYIRIMI	47
4.3.1 Placenta Desidua Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Ayırt Edilmesi	47
4.3.2 Periferik Kan Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin Ayırt Edilmesi	47
4.4 ÖRNEKLERİN SAFLIK VE KONSANTRASYON ÖLÇÜMÜ	48
4.5 GEN ANLATIM ANALİZİ.....	50
4.5.1 Placenta Desidua Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerde Gen Anlatım Analizi	50
4.5.2 Periferik Kan Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerde Gen Anlatım Analizi.....	54
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	57
KAYNAKLAR.....	67
EKLER	88
EK1: ETİK KURUL KARAR BELGESİ	88
ÖZGEÇMİŞ	91

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Blastosist'in implantasyonu ile birlikte plasentasyonun başlaması (Ander, Diamond ve diğ., 2019).	5
Şekil 2.2: Gebe olmayan, preeklampsi rahatsızlığı olan ve sağlıklı gebelerin spiral arter modellenmesi (Parham, 2004).	13
Şekil 2.3: Sağlıklı bir gebe ile preeklampşik bir gebe arasındaki anjiyogenik ve antianjiyogenik faktörlerin anlatımında oluşan farklılık.	16
Şekil 2.4: Transkripsiyon aşamasında RNA polimeraz II'nin DNA'ya bağlanması ve transkripsiyon yönünde primer mRNA'nın uzaması.	20
Şekil 2.5: VEGF(A) geninin insan genomundaki yerleşimi.	23
Şekil 2.6: TIMP-1 geninin insan genomundaki yerleşimi.	24
Şekil 2.7: EFNA3 geninin insan genomundaki yerleşimi.	24
Şekil 2.8: THSD7A geninin insan genomundaki yerleşimi.	25
Şekil 2.9: Kök hücrelerin sınıflandırılması.	27
Şekil 3.1: Hücre kültüründe kullanılan güvenlik kabini.	32
Şekil 3.2: Periferel kanın santrifüj edildiği Beckman Coulter Allegra® X-12.	33
Şekil 3.3: Periferel kan örneklerinin santrifüj sonrası ayrılmış görüntüsü.	34
Şekil 3.4: Akım sitometrisi için yapılacak olan boyama işleminde kullanılan antikorların örneği.	35
Şekil 3.5: “DG8 Cartridge”.	40
Şekil 3.6: “QX200 Droplet Generator”.	41
Şekil 3.7: 96'lı “plate”.	41
Şekil 3.8: “Bio-Rad's PXP1PCR Plate Sealer”.	42
Şekil 3.9: “Bio-Rad's QX200 Droplet Reader”.	42
Şekil 4.1: Sağlıklı ve preeklampşik plasentadan edilen dMKH kültürlerinin faz kontrast mikroskop görüntüsü.	45

Şekil 4.2: Sağlıklı gebelereeden elde edilen periferel kan kökenli MKH'lerin kültüre alındığı 1. gün.	46
Şekil 4.3: Sağlıklı gebelereeden elde edilen periferel kan kökenli MKH'lerin ayırım öncesi görüntüsü.	46
Şekil 4.4: VEGF(A)'nın rölatif mRNA anlatım analizi ve ROC eğrisi.	52
Şekil 4.5: TIMP-1'in rölatif mRNA anlatım analizi ve ROC eğrisi	52
Şekil 4.6: EFNA3'ün rölatif mRNA anlatım analizi ve ROC eğrisi.	53
Şekil 4.7: THSD7A'nın rölatif mRNA anlatım analizi ve ROC eğrisi.	53
Şekil 4.8: VEGF(A)'nın rölatif mRNA anlatım analizi ve ROC eğrisi.	55
Şekil 4.9: TIMP-1'in rölatif mRNA anlatım analizi ve ROC eğrisi.	55
Şekil 4.10: EFNA3'ün rölatif mRNA anlatım analizi ve ROC eğrisi.	56
Şekil 4.11: THSD7A'nın rölatif mRNA anlatım analizi ve ROC eğrisi.	56

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Gebelikte hipertansif hastalıkların sınıflandırılması.	7
Tablo 3.1: Mezenkimal kök hücrelerin ayırt edilmesi aşamasında kullanılan antikorların isimleri ve miktarları.	35
Tablo 3.2: cDNA sentezin için hazırlanan karışımın bileşenleri.	38
Tablo 3.3: cDNA sentezi için RT-PZR termal döngüsü.	38
Tablo 3.4: Primer listesi.	39
Tablo 3.5: ddPZR aşamasında reaksiyon başına gerekli karışımın miktarları.	39
Tablo 3.6: ddPZR termal döngüsü.	42
Tablo 4.1: Araştırmada yer alan gebelerin klinik özellikleri.	44
Tablo 4.2: MKH'lerden elde edilen RNA'ların kalitesi ve miktar tayini. PE: Preeklampsia hastasına ait.	48
Tablo 4.3: MKH'lerden elde edilen RNA'ların kalitesi ve miktar tayini. K: Kontrol grubuna ait.	49
Tablo 4.4: Placenta desidua kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde gen anlatım analizinin istatistiksel sonuçları.	51
Tablo 4.5: Periferik kan kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde gen anlatım analizinin istatistiksel sonuçları.	54

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
dL	: Desilitre
g	: Gram
<i>g</i>	: <i>RCF</i> "Relative Centrifugal Field"
m ²	: Metrekare
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mmHg	: Milimetre Civa
ng	: Nanogram
Tm	: Erime Sıcaklığı
Zn ²⁺	: Çinko
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
°C	: Santigrad Derece
≥	: Büyük ve(ya) Eşit

Kısaltmalar	Açıklama
A1M	: Alfa 1-Mikroglobulin
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ACOG	: Amerikan Kadın Hastalıkları ve Doğum Koleji
AFA	: Antifosfolipid Antikor
AFS	: Antifosfolipid Antikor Sendromu
aMKH	: Amniyon Mezenkimal Kök Hücreleri
AUC	: Eğri Altında Kalan Alan
BCL2	: B Hücreli Lenfoma 2
Bp	: Baz Çifti
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit

ddPZR	: Damlacıklı Dijital Polimeraz Zincir Reaksiyonu
dH₂O	: Distile Su
DKB	: Diyastolik Kan Basıncı
dMKH	: Desidua Mezenkimal Kök Hücre
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPBS	: Dulbeco's Fosfat Tamponlu Salini
EFNA3	: Efrin A3
ET1	: Endotelin 1
FBS	: Fetal Sığır Serumı
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
Flk1	: Fetal Karaciğer Kinazı 1
Flt1	: Fms İlişkili Reseptör Tirozin Kinaz 1
GAPDH	: Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz
GH	: Gebelik Hipertansiyonu
GPI	: Glikosilfosfatidilinositol
h	: Hafta
H₂O	: Su
HbF	: Hemogloblin F
HGB	: Hipertansif Gebelik Bozukluğu
HIF	: Hipoksi İndüklenebilir Faktör
HIF1-α	: Hipoksi İndüklenebilir Faktör Alfa
HIF1-β	: Hipoksi İndüklenebilir Faktör Beta
HLA	: İnsan Lökosit Antijeni
HLA-DR	: İnsan Lökosit Antijeni -DR İzotipi
HRE	: Hipoksi Tepki Elemanı
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1
IGFBP2	: Protein 2 Bağlayan İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
İHK	: İç Hücre Kitlesi
IL	: İnterlökin
ISCT	: Uluslararası Hücre ve Gen Terapisi Topluluğu
IUGR	: Rahim İçi Büyüme Kısıtlanması
KDR	: Tirozin Kinaz Büyüme Faktörü Reseptörü
KGF	: Keratinosit Büyüme Faktörü
kMKH	: Koryonik Mezenkimal Kök Hücre

kvMKH	: Koryonik Villus Mezenkimal Kök Hücre
mİR	: Mikroribonükleik Asit
miRNA	: Mikroribonükleik Asit
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
MMP-9	: Matriks Metalloproteinaz 9
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NO	: Nitrik Oksit
NTC	: Örnek İçermeyen Kontrol
P-MKH	: Plasental Mezenkimal Kök Hücre
PAPP-A	: Gebeliğe Bağlı Plazma proteini-A
PDGF	: Platelet (Trombosit) Kaynaklı Büyüme Faktörü
PE	: Preeklampsia
PI	: Pulsatilite Endeksi
PI3K	: Fosfoinositid 3 Kinaz
PIGF	: Plasental Büyüme Faktörü
PK-MKH	: Periferik Kan Mezenkimal Kök Hücre
PK-MNH	: Periferik Kan Mononükleer Hücre
PP-13	: Plasental Protein 13
PS	: Penisilin- Streptomisin
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qRT-PZR	: Gerçek Zamanlı Ters Transkripsiyon Kantitatif PZR
RNA	: Ribonükleik Asit
ROC	: “ <i>Receiver Operating Characteristic</i> ”
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RPMI	: “ <i>Rosewell Park Memorial Institute</i> ”
sENG	: Çözünür Endoglin
sFlt1	: Çözünür Fms Benzeri Tirozin Kinaz 1
SGA	: Anne Karnındaki Gelişim Geriliği
SKB	: Sistolik Kan Basıncı
SLE	: Sistemik Lupus Eritematoz
TATA	: Timin- Adenin- Timin- Adenin Nükleotit Dizisi
TE	: Trofektoderm

TF	: Transkripsiyon Faktörleri
TGF-α	: Transforme Edici Büyüme Faktörü Alfa
TGF-β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
THSD7A	: Trombospondin Tip-1 7A
Tie-1	: Tirozin Protein Kinaz Reseptörü 1
Tie-2	: Tirozin Protein Kinaz Reseptörü 2
TIMP-1	: Metallopeptidaz İnhibitör 1
tRNA	: Taşıyıcı Ribonükleik Asit
UAA	: Urasil- Adenin- Adenin Nükleotit Dizisi
UAG	: Urasil- Adenin- Guanin Nükleotit Dizisi
UGA	: Urasil- Guanin- Adenin Nükleotit Dizisi
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGF(A)	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü A
VEGFR1	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptör 1
VEGFR2	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptör 2
β- hCG	: İnsan Koryonik Gonadotropin

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PREEKLAMPTİK GEBELİKLERDE PLASENTA VE KANDAN ELDE EDİLEN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDE TRANSKRİPTOM ANALİZİ

Zeynep KUMRAL

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Tuba GÜNEL

Hipertansif gebelik bozuklukları dünya genelinde gebeliklerin %10'unu etkiler. Maternal, perinatal morbidite ve mortalitenin önemli bir nedenini oluşturur. Hipertansif bir gebelik hastalığı olan preeklampsi (PE), gebeliğin 20. haftasından sonra yapılan tekrarlı ölçümler neticesinde sistolik kan basıncının 140 mmHg veya üstü olması, diastolik kan basıncının ise 90 mmHg veya üstü olması durumudur. Hipertansiyona ek olarak proteinüri ve maternal organ disfonksiyonu da görülebilmektedir.

Preeklampsi gelişen gebelerde implantasyon ile birlikte plasenta gelişimi de eksik ve yetersiz kalmaktadır. Plasenta oluşumu sırasında yaşanan spiral arter yeniden modellenmesindeki bozukluklar dokunun oksijenden yoksun kalmasına neden olur ve hipoksi oluşumunu tetikler. Oksidatif stres ile de antianjiyogenik faktörlerin maternal salınımı gerçekleşir. Anjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler arasındaki dengesizlik anjiyogenez ve plasental vaskülarite de aksamalar yaşanmasına sebep olur.

Mezenkimal kök hücreler (MKH) kendi kendini yenileyebilen ve özel hücre hatlarına farklılaşabilme potansiyeline sahip hücrelerdir. MKH'lerin, plasantasyon sırasında maternal-fetal arayüzün proanjiyogenik, immünomodülatör ve antienflamatuar ortamının düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Plasentanın farklı kısımlarından izole edilen MKH araştırmaları bulunmaktadır. Plasentanın vasküler bir organ olması bu dokudan izole edilen MKH'lerde daha baskın bir anjiyogenik profil olabileceğini düşündürmektedir.

Erişilebilirlik ve yüksek farklılaşma potansiyeli, tıbbi uygulamalar için umut verici bir kaynak olarak kandan türetilen kök hücreler de bir alternatif olmuştur. Periferal kan kökenli MKH'lere ait çalışmalar bulunmaktadır ancak izolasyon sonrasında MKH miktarının yetersiz olması bir kısıtlayıcı faktör olarak çalışmalara yansımaktadır.

Bu tez, PE ve sağlıklı gebelere ait desidua ve periferal kan kökenli MKH'lerin mRNA anlatım analizini kapsamakta ve olası biyobelirteçlerin araştırılması için bir ön çalışma niteliği taşımaktadır. Tez kapsamında yedi preeklampsisi gebeye ve yedi kontrol grubunu oluşturan sağlıklı gebeye ait plasenta dokusu ve periferal kandan toplam 28 örnekten MKH'lerin izolasyonu yapılarak gen anlatım analizi çalışılmıştır. MKH'lerin izolasyonu ve kültürü, hücre yoğunluğu istenilen şekilde arttırıldıktan sonra uygun hücre yüzey belirteçleri aracılığı ile akım sitometrisi yöntemi kullanılarak hücre ayrımı ("cell sorting") yapılmıştır. MKH'lerden total RNA izolasyonu yapılmış ve cDNA'ya çevrilmiştir. Gen anlatım analizi için "Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü A" (VEGF(A)), "Metallopeptidaz İnhibitör 1" (TIMP-1), "Efrin A3" (EFNA3), "Trombospondin Tip 1 7A" (THSD7A) ve normalizasyon için "Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz" (GAPDH) kullanıldı. Gen anlatım analizi damlacıklı dijital polimeraz zincir reaksiyonu (ddPZR) yöntemi ile gerçekleştirildi. Verilerin istatistiksel sonuçları için "Graphpad Prism Version 8.3.0" programı kullanıldı. Sonuçların anlamlılık olarak değerlendirilmesi parametrik olmayan "Mann Whitney Test" ile yapıldı. Özgüllük ve duyarlılık için "Reciever Operating Characteristic" (ROC) analizi yapıldı.

Analizlerin sonucunda, TIMP-1, EFNA3 ve THSD7A hem desidua hemde periferal kan MKH'lerinde mRNA anlatım seviyesinde kat değişimleri olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değerlendirilmemişlerdir. VEGF(A) desidua MKH'lerinde mRNA anlatım seviyesinde kat değişimi olmasına rağmen istatistiksel olarak $p < 0,05$ koşulunu sağlamadığı için anlamlı olarak değerlendirilmedi fakat PE hastalarının periferal kan kökenli MKH'lerindeki VEGF(A) seviyesinde kontrole kıyasla 4,2 kat artış gözlemlendi (AUC: 0,95 $p = 0,019$) istatistiksel olarak $p < 0,05$ koşulunu sağladığı için anlamlı olarak değerlendirildi.

Bu çalışma, preeklampsinin patogenezi ile paralel olarak anjiyogenez üzerinde etkileri olduğu düşünülen genlerin kök hücre seviyesinde gen anlatımlarında bir değişim olup olmadığını gözlemlemek için yapılmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda özellikle periferal kandan elde edilen MKH'lerindeki VEGF(A) seviyesindeki anlamlı artış bu genin potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ve ileride PE'nin tedavisinde hedef gen olarak terapötiklerin kullanılabileceği öngörülebilir.

Şubat 2021, 108 sayfa.

Anahtar kelimeler: Preeklampsisi, Plasenta Desidua Kökenli Mezenkimal Kök Hücre, Periferal Kan Kökenli Mezenkimal Kök Hücre, Anjiyogenez, Gen Anlatımı, Damlacıklı Dijital Polimeraz Zincir Reaksiyonu.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

TRANSCRIPTOME ANALYSIS ON MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED FROM PLACENTA AND BLOOD IN PREECLAMPTIC PREGNANCIES

Zeynep KUMRAL

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Tuba GÜNEL

Hypertensive pregnancy disorders affect 10% of pregnancies worldwide. It is an important cause of maternal, perinatal morbidity and mortality. Preeclampsia (PE), which is a hypertensive pregnancy disease, is a condition where systolic blood pressure is 140 mmHg or above, and diastolic blood pressure is 90 mmHg or above as a result of repeated measurements made after the 20th week of pregnancy. In addition to hypertension, proteinuria and maternal organ dysfunction can also be seen.

Placental development is incomplete and insufficient as well as implantation in pregnant women with preeclampsia. Disturbances in spiral artery remodeling experienced during placenta formation cause tissue to be deprived of oxygen and trigger hypoxia. Maternal release of anti-angiogenic factors occurs with oxidative stress. Imbalance between angiogenic and anti-angiogenic factors causes disruptions in angiogenesis and placental vascularity.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are self-renewable cells with the potential to differentiate into special cell lines. MSCs are thought to play a role in regulating the proangiogenic, immunomodulatory and anti-inflammatory environment of the maternal-fetal interface during placentation. Placenta is widely studied as a source of MSC. There are MSC studies isolated from different parts of the placenta. The fact that the placenta is a vascular organ suggests that there may be a more dominant angiogenic profile in MSCs isolated from this tissue.

Accessibility and high potential for differentiation have also been an alternative to blood-derived stem cells as a promising resource for medical applications. There are studies of MSCs derived from peripheral blood, but insufficient amount of MSC after isolation is reflected in studies as a limiting factor.

This thesis covers the mRNA expression analysis of decidua and peripheral blood-derived MSCs from PE and healthy pregnant women and is a preliminary study to investigate possible biomarkers. Within the scope of the thesis, gene expression analysis was studied by isolating MSCs from a total of 28 samples from placental tissue and peripheral blood belonging to seven pregnant women with preeclampsia and seven healthy pregnant women. After isolation and culture of MSCs, cell sorting was performed by using flow cytometry method by means of appropriate cell surface markers after increasing cell density as desired. Total RNA was isolated from MSCs and translated into cDNA. For gene expression analysis, “Vascular Endothelial Growth Factor A” (VEGF (A)), “Metalloproteinase Inhibitor 1” (TIMP-1), “Ephrin A3” (EFNA3), “Thrombospondin Type 1 7A” (THSD7A) and for normalization Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used. Gene expression analysis was performed by droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) method. “Graphpad Prism Version 8.3.0” program was used for the statistical results of the data. The significance of the results was evaluated using the nonparametric “Mann Whitney Test”. “Receiver Operating Characteristic” (ROC) analysis was performed for specificity and sensitivity.

As a result of the analyzes, TIMP-1, EFNA3 and THSD7A were not evaluated statistically significant although there were fold changes in the level of mRNA expression in both decidua and peripheral blood MSCs. Although there was a fold change in the mRNA expression level in VEGF (A) decidua MSCs, it was not considered statistically significant because it did not meet the condition of $p < 0.05$, but a 4.2 fold increase in VEGF (A) level in peripheral blood-derived MSCs of PE patients was observed (AUC: 0.95 $p = 0.019$). It was considered to be statistically significant since it met the condition of $p < 0.05$.

This study was conducted to observe whether there is a change in gene expression at the stem cell level of genes thought to have effects on angiogenesis in parallel with the pathogenesis of preeclampsia. In line with these results, it can be predicted that the significant increase in VEGF (A) level in MSCs obtained from peripheral blood can be used as a potential biomarker and the therapeutics can be used as target gene in the treatment of PE in the future.

February 2021, 108 pages.

Keywords: Preeclampsia, Placental Decidua Mesenchymal Stem Cell, Peripheral Blood Derived Mesenchymal Stem Cell, Angiogenesis, Gene Expression, Droplet Digital Polymerase Chain Reaction.

1. GİRİŞ

Preeklampsi (PE), dünya genelinde maternal ölümlerinin ikinci en büyük nedenidir ve hamile kadınların %5-%10'unu etkiler. Hastalığın etyopatogenezi halen kapsamlı bir araştırmanın konusu olmaya devam etmektedir ancak çok faktörlü olabileceğine inanılmaktadır. Bununla birlikte, preeklampsinin gelişmesinden sorumlu olan faktörün fetüsten çok plasentanın varlığı olduğu kabul edilir. Plasenta preeklampsi gelişiminde önemli bir rol oynasa da başlangıç, şiddet ve ilerleme; plasentadan türetilen faktörlerden, proteinlerden ve maternal yanıtta önemli ölçüde etkilenir. Preeklampsi genellikle daha önce normotansif bir kadında 20 haftalık gebelikten sonra hipertansiyon ($\geq 140/90$ mmHg) ve proteinüri gelişimi olarak tanımlanır (Huppertz, 2008). Patogenezindeki moleküler regülasyon hala tam olarak bilinmemektedir.

Preeklampsi; kusurlu plasenta, plasental iskemi, anormal spiral arter yeniden biçimlenmesi, maternal-fetal arayüzde oksidatif stres ve bunu takiben endotel ve hedef-organ hasarı ile maternal dolaşımda anjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler arasındaki dengesizlikle karakterizedir. Yüksek antianjiyogenik faktörler ve düşük anjiyogenik faktör seviyeleri preeklampsinin erken saptanması ve prognozu için yararlı biyobelirteçlerdir (Phipps ve diğ., 2019). Desidua, plasenta ve uterusun kas duvarı arasındaki maternal dokudur. Spiral arterlerin gebelikte ilişkili uterus vasküler yeniden şekillenmesinin ana bölgesidir. PE, spiral arterlerin anormal vasküler yeniden modellenmesi ile ilişkilidir. Anormal spiral arter şekillenmesi plasenta ve desiduada oksijen yetersizliğine neden olur. Bu hipoksik koşullar, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine ve daha sonra oksidatif strese yol açar. PE'de maternal desidua, maternal sistemik vasküler endotel hasarına neden olan dolaşımdaki reaktif oksijen türlerinin ana kaynağıdır.

Mezenkimal kök hücreler (MKH) kemik, kıkırdak, kas, ligament, tendon ve yağ gibi mezenkimal dokulara farklılaşabilen ve rejenerasyona katkıda bulunabilen fibroblast benzeri, plastik yüzeyde yapışma özelliği gösteren hücrelerdir. Ana kaynağı kemik iliğidir. Mezenkimal kök hücreler (MKH) hem plasentadan hem de desiduada izole edilebilir (Chamberlain ve diğ., 2007; Huang ve diğ., 2009). İnsan plasentası sadece fetal gelişim, beslenme ve hormonal dengenin korunmasında değil, bir MKH kaynağı olarak da işlev görmektedir (Wu ve diğ.,

2018). Kemik iliğinden MKH eldesi, az sıklıkta yapılan ve heterojen popülasyon veren invaziv ve yüksek riskli bir yaklaşımdır. Buna alternatif olarak aranan kaynaklar arasında periferik kandan izole edilen MKH'ler de vardır (Wagner ve diğ., 2005). MKH'ler düşük immünojenisite, kolay izolasyon ve "in vitro" yayılma özelliği nedeniyle oldukça ilgi görmüştür. (Pankajakshan ve Agrawal, 2014).

Preeklampsia patofizyolojisinde etkili olan; yetersiz spiral arter modellenmesine, oksidatif stresteki artışa ve anjiyogeneze yansıyan bu düzensizlikleri iyileştirme potansiyeli olan mezenkimal kök hücreler (MKH'ler) geleceğe dönük umut verici bir tedavi olarak görülmektedir. Bağışıklık düzenleyici, pro-anjiyogenik, anti-eflamatuar ve anti-oksidan etkilere sahiptirler. Maternal desidua'da bulunan MKH'lerin, plasantasyon sırasında maternal-fetal arayüzün pro-anjiyogenik, immünomodülatör ve anti-enflamatuar ortamının düzenlenmesinde rol oynadığına inanılmaktadır. Preeklampşik gebeliklerde desidua MKH'lerinde anormal sitokin salınımı tespit edilmiştir (Hwang ve diğ., 2010). MKH'lerin parakrin etkileri, anjiyogeneze ve yara onarımının desteklenmesinde önemli faktörler olarak vurgulanmıştır (Sun ve diğ., 2019). Nuzzo ve diğ., (2014), MKH ile tedavinin, preeklampsili kadınlardan izole edilen villöz eksplantların anjiyogenik potansiyelini, interlökin-6 (IL-6) ve çözünür fms benzeri tirozin kinaz 1 (sFlt-1) anlatımını azaltarak geri kazandırabildiği ve pro-enflamatuar ve antianjiyogenik mRNA anlatımının nötralizasyonu sağladıkları belirtilmiştir. (Nuzzo ve diğ., (2014). MKH aracılı anjiyogeneze regülasyonunun kesin mekanizması hala belirsiz olsada, etkilerinin ağırlıklı olarak endotelial hücrelere farklılaşma kapasitesinden çok parakrin faktörleri tarafından indüklendiğine inanılmaktadır. MKH'lerin endotelial ve trofoblast migrasyonu, invazyonu ve tüp oluşumu üzerindeki benzer pro-anjiyogenik etkileri de vardır.

Bu tezde preeklampsia hastalığının patofizyolojisini aydınlatabilmek ve erken tanıya yönelik bir biyobelirteç tespit etmek amaçlanmıştır. PE hastaları ve kontrol grubunu oluşturacak olan sağlıklı gebelerden elde edilen plasenta desidua dokusu ve periferik kandan MKH'lerin izolasyonu yapılmış ve gen anlatım analizleri çalışılmıştır. Araştırmada 7'si sağlıklı 7'si PE olmak üzere toplamda 14 gebeden kan ve desidua dokusu alınmıştır. Toplamda 28 örnekle çalışmamız gerçekleştirilmiştir. MKH'lerin izolasyonu ve kültürü yapıldıktan sonra uygun hücre yüzey belirteçleri ile akım sitometrisi yöntemi kullanılarak ayırt edilmiştir. MKH'lerden total

RNA izolasyonu yapıp, cDNA'ya çevrildikten sonra mRNA anlatım analizi için “Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü A” (VEGF(A)), “Metallopeptidaz İnhibitör 1” (TIMP-1), “Efrin A3” (EFNA3), “Trombospondin Tip 1 7A” (THSD7A) ve normalizasyon için Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz” (GAPDH) kullanılmıştır. Gen anlatım analizi damlacıklı dijital polimeraz zincir reaksiyonu (ddPZR) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Verilerin istatistiksel sonuçları “*Graphpad Prism Version 8.3.0*” programı kullanılarak elde edilmiş ve anlamlılık değerlendirmesi parametrik olmayan “*Mann Whitney Test*” ile yapılmıştır. Özgüllük ve duyarlılık için ROC (“*Reciever Operating Characteristic*”) analiz yöntemi seçilmiştir.

Analizlerin sonucunda, TIMP-1, EFNA3 ve THSD7A hem desidua hemde periferal kan MKH’lerinde mRNA anlatım seviyesinde kat değişimleri olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değerlendirilmemişlerdir. VEGF(A) desidua MKH’lerinde mRNA anlatım seviyesinde kat değişimi gözlemlenmesine rağmen istatistiksel olarak $p < 0,05$ koşulunu sağlamadığı için anlamlı olarak değerlendirilmemiştir fakat PE hastalarının periferal kan kökenli MKH’lerindeki VEGF(A) seviyesinde kontrole kıyasla 4,2 kat artış gözlemlendiğinden ve (AUC: 0,95 $p = 0,019$) istatistiksel olarak $p < 0,05$ koşulunu sağladığı için anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

Maternal sirkülasyondaki MKH’lerden elde edilen VEGF(A) daki artış; plasental iskemi, hasarlı endotelin onarımının artması ve bu onarıma katkıda bulunan kök hücre sayısının da artması nedeniyledir. VEGF (A)’nın preeklampsinin erken tanısı için çok kuvvetli bir aday olmasının yanı sıra ileride preeklampsinin tedavisine yönelik terapötiklerin hedefi olarak da yer alacağını öngörmekteyiz.

2. GENEL KISIMLAR

2.1 İNSAN PLASENTASININ FONKSİYONU, OLUŞUMU VE GELİŞİMİ

“Plasenta” terimi latince köken almıştır. Diskoid’e benzer bir şekli olduğundan “yassı kek” anlamına gelir. Plasenta, anne ve fetus arasındaki tek fiziksel bağlantıyı sağlayan organdır. Gebelik sırasında plasenta, maternal-fetal değişim için giderek daha geniş bir yüzey alanı sağlamak üzere büyür. Bu dönemde, plasenta yaklaşık 500 g ağırlığında, 15-20 cm çapında, 2–3 cm kalınlığında ve yaklaşık 15 m² yüzey alanına sahiptir.

Plasenta gelişimi, normal fetal büyüme, gelişme ve sağlıklı bir hamileliğin sürdürülmesi için gerekli olan oldukça düzenlenmiş bir süreçtir. Plasenta, anne ve fetus arasındaki arayüz olarak birkaç kritik rolü yerine getirir. Maternal ve fetal dolaşım sistemleri arasındaki besin, gaz ve atık ürünlerinin değişiminin, hormonal dengenin maksimum verimlilikle çalışmasını sağlamak için hassas bir şekilde düzenlenir ve koordine edilir (Gude ve diğ., 2004; Pemathilaka ve diğ., 2019).

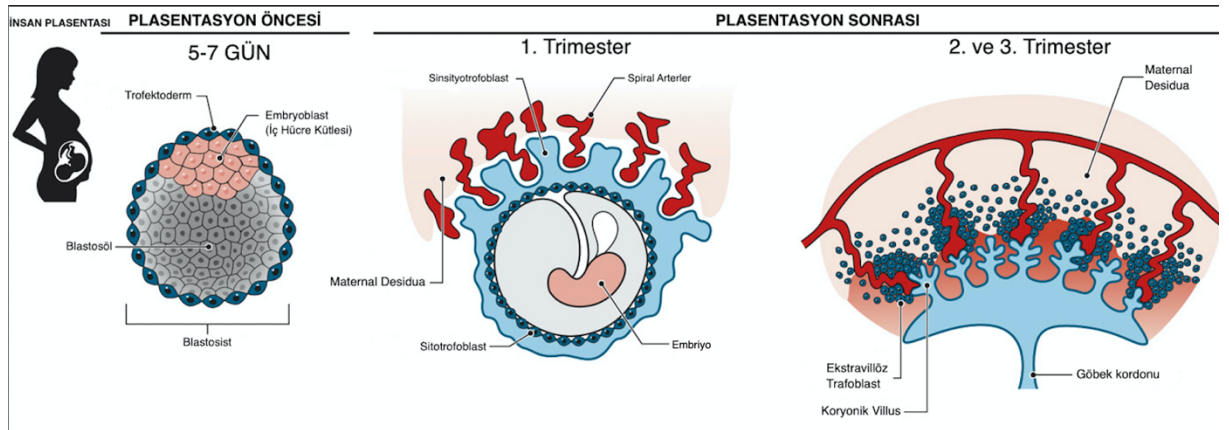
Plasenta; plasental disk, fetal membranlar, amniyotik ve koryonik membranlara bölünmüş fetal kökenli yapılar, endometriyumdan türeyen maternal kökenli desidua ve göbek kordonundan oluşur (de la Torre ve diğ., 2019).

İnsan plasentası, implantasyon öncesi embriyonun dış tabakası olan, döllenmeden ~5 gün sonra oluştan trofoblast hücrelerinden gelişir. Bu aşamada, implantasyon öncesi embriyo (blastosist) iki kökene ayrılır: iç hücre kütlesi (İHK) ve trofektoderm (trofoblast). Polar trofektoderm uterus mukozasının endometriyum olarak isimlendirilen yüzey epiteline bağlanır. Bu yeni kurulan temas bölgesi gebelik sırasında hızlı ve sürekli olarak gelişir. Gebelik boyunca fetomaternal değişimi kontrol eder.

Döllenmeden ~6-7 gün sonra trofoblastlar uterus yüzey epiteline takıldıktan sonra birincil bir sinsityum oluşturmak üzere kaynaşır ve çoğalarak sinsityotrofoblastik hücre külesine farklılaşır. Bu plasenta gelişiminin prelakuner aşamasıdır (Benirschke, 1973; Turco ve diğ., 2019). Sinsityotrofoblastik kütle ilk olarak blastosistin yapıştığı kutupta oluşur ve blastosistin endometriyal stromaya invaziv girişini sağlar. İmplant blastosistin artan yayılma derinliği birkaç saat içinde, sinsityotrofoblastik kütle blastosistin tüm dış duvarı boyunca yayılır. Döllenmeden yaklaşık 14 gün sonra blastosist tamamen desiduaya gömülür ve yüzey

epitelyumu ile kapanır (Hertig ve diğ., 1956). Daha sonra sinsityotrofoblastik kütlenin merkezi kısımlarında genişleyen ve birleşen lakünler ortaya çıkar. Bu laküner aşamadır. Lakünleri çevreleyen sinsityotrofoblast lamelleri ve sütunlarına da trabeküller denir. Trabeküller ve lakün sistemi, lakün içermeyen iki sinsit tabaka ile kaplıdır. Bunlar endometriyuma bakan bazal tabaka olan rofoblastik kabuk ve blastosistik boşluğa bakan yüzeysel tabaka yani birincil koryonik plakadır. Gebelikten sonraki 12. günde primer koryonik plakadan başlayarak çoğalan sitotrofoblast, sinsityal trabeküllere dönüşür ve son olarak trofoblastik kabuğa ulaşır. Trabeküller içindeki sitotrofoblastın çoğalması; uzunlamasına büyümeden ve trabeküllerin dallanmasından önemli ölçüde sorumludur. Laküne çıkıntı yapan dallar birincil villusu oluşturur. Birincil villusun ortaya çıkmasıyla, hala genişleyen laküner sisteme intervillus boşluk denir. Ekstra-embriyonik mezodermal hücreler, birincil koryonik plakanın üzerinde gevşek bir bağ dokusu tabakası oluşturur. Paralelinde, trofoblastik kabuğun trofoblast hücreleri rahim bezlerini ve maternal endometriyal damarları gebe kaldıktan sonraki 12. günde aşındırır. Bu arada, blastosist tamamen endometriyuma gömülüdür ve her taraftan endometriyal stroma ile çevrilidir. Blastosist yüzeyinin daha sonra implante olan kısımları, implantasyon kutbu ile aynı gelişim aşamalarından geçer.

Kısa süre sonra, 17-18. günlerde, ekstraembriyonik mezenkimal hücreler, sekonder villus oluşturmak için villus çekirdeğinden nüfuz eder. Döllenmenin ardından 18. güne kadar, çekirdek içinde fetal kılcal damarlar ortaya çıkar ve bu tersiyer villus gelişimini işaret eder. Villöz sistemi oluşturmak için koryonik plakadan aşamalı dallanma ile hızla genişlemeye devam eder. Bu şekilde, ilk üç aylık dönemin sonunda, plasentanın planı oluşturulur (Şekil 2.1) (Turco ve diğ., 2019).



Şekil 2.1:Blastosist'in implantasyonu ile birlikte plasantasyonun başlaması (Ander, Diamond ve diğ., 2019).

2.2 GEBELİKTE HİPERTANSİF HASTALIKLAR

Hipertansif gebelik bozuklukları (HGB) gebeliğin %5 ila %10'unu zorlaştırmakta ve genç kadınlarda yükselen kardiyometabolik hastalık prevalansı ile artmaktadır. Hipertansif gebelik bozukluğu gelişimi, hamileliğin beraberinde gelen değişimlere uyum sağlayamayan hacim ve hemodinamik değişiklikler ile sonuçlanan bir dizi faktör içerir Amerikan Kadın Hastalıkları ve Doğum Koleji (ACOG), hipertansif gebelik bozukluklarını 4 kategoride sınıflandırmaktadır. Her bir bozukluğa ait açıklama Tablo 2.1'de gösterilmiştir (Ying ve diğ., 2018).

- Gebelik Hipertansiyonu (GH)
- Preeklampsi (PE)- Eklampsi
- Kronik Hipertansiyon
- Üst üste binmiş preeklampsili kronik hipertansiyon

Gebelik hipertansiyonu, preeklampsi ve eklampsiyi içeren bir şemsiye terim olan hipertansif bozukluklar, gebeliklerin %10'unu etkiler. Maternal ve perinatal morbidite ve mortalitenin önemli bir nedenini oluşturur. Gebelikte hipertansiyonun için kesin bir tanım olmasa da “Ulusal Yüksek Tansiyon Eğitim Programı Gebelikte Yüksek Tansiyon Çalışma Grubu” şu anda sistolik kan basıncını (SKB) ≥ 140 mmHg ve / veya diyastolik kan basıncını da (DKB) ≥ 90 mmHg olarak kabul etmektedir (Braunthal ve Brateanu, 2019).

Tablo 2.1: Gebelikte hipertansif hastalıkların sınıflandırılması.

Gebelik Hipertansiyonu (GH)	Gebeliğin 20. haftasından sonra ortaya çıkan 140/90mmHg üzerinde olması durumudur. Herhangi bir başka organ disfonksiyonu durumu ve preeklampsinin beraberinde gelişen proteüniyi yoktur. Gebelik sonrası normale döner.
Preeklampsi (PE)	Preeklampsi, gebeliğin 20. haftasından sonra tansiyonun 140/90 mmHg ve/veya üzerinde seyretmesi ve proteinüri veya maternal organ fonksiyon bozukluğunun hipertansiyona eşlik etmesidir.
Eklampsi	Eklampsi, preeklampsinin devamında oluşan bir nöbet geçirme durumudur. Preeklampsi sonrası gelişebilen önemli bir komplikasyondur.
Kronik Hipertansiyon	Kan basıncının gebelik dönemi öncesinde veya 20. gebelik haftasından önce 140/90mmHg üzerinde görülmesi durumudur.
Üst Üste Binmiş Preeklampsili Kronik Hipertansiyon	20. gebelik haftasından sonra, önceden var olan hipertansiyona ek olarak preeklampsi-eklampsi belirtilerini de göstermesidir.

2.3 PREEKLAMPSİ NEDİR?

Preeklampsi (PE), gebeliklerin %3-8'ini karmaşık hale getiren ve dünya çapında önemli bir morbidite ve mortalite kaynağı oluşturan multisistemik bir hastalıktır. Bir araya geldiklerinde tanı ve tedaviye yol açan bir grup klinik özellik ile karakterize gebeliğe özgü hipertansif bir sendromdur ve bu yüzden kesin tanımı zordur. Arteriyel kan basıncı veya proteinüri gibi preeklampsinin tanısında kullanılan sayısal özelliklerin standart bir değer aralığı yoktur. Bu yüzden önemli belirsizlikler mevcuttur. Yalnızca benzersiz patojenik özelliklere dayanan bir tanım bu yetersiz durumu çözebilecektir. Patofizyoloji netleştikçe, maternal anjiyogenik ve antianjiyogenik faktörlerin konsantrasyonları gibi hastalığın tanı ve tahminine yönelik biyokimyasal biyobelirteçler geliştirilmektedir (Burton ve diğ., 2019; Karumanchi, 2016; Staff ve diğ., 2013).

Bu analizler PE'nin ve ilgili diğer plasental sendromların tanımlarına dahil edilerek daha kesin ve belirgin bir tanım oluşmasına yardımcı olabilirler (Burton ve diğ., 2019; Redman ve diğ., 1977).

PE çoğunlukla kan basıncı normal olan kadınlarda 20 haftalık hamilelikten sonra başlar. İlk olarak genellikle yüksek tansiyon ölçümü ile tespit edilir, ancak tanı koymak için hipertansiyon dışında ek belirtiler de gereklidir. PE günümüzde buna ek olarak feto-plasental alan da dahil olmak üzere başka bir organ sistemine, en sık da karaciğer ve böbreklere verdiği hasar belirtileri ile karakterize edilen bir gebelik komplikasyonudur. Proteinüri, hipertansiyondan sonra PE'nin tanısında en sık aranan özelliktir ancak klinik tanı koymak için zorunlu olarak düşünülmemektedir. Tedavi edilmezse, PE hem maternal hem de perinatal morbidite ve mortaliteye neden olur ve en etkili tedavi bebeğin doğumu ve plasentanın dışarı çıkartılmasıdır (Brown ve diğ., 2000).

2.3.1 Preeklampsi Tanı Kriterleri

PE bazen belirti vermeden de gelişebilir. Ancak kan basıncı ölçümü tanı kriterlerinin başında gelmektedir. Yüksek tansiyon yavaşça veya ani bir başlangıçla kendini gösterebilir. Kan basıncını izlemek doğum öncesi bakımın önemli bir parçasıdır çünkü PE'nin ilk işareti genellikle kan basıncında bir artıştır.

Tanı için kesin gereken:

- 140/90 mmHg veya daha yüksek olan kan basıncıdır.

Preeklampsinin diğer belirti ve semptomları şunları da içerebilir:

- İdrarda aşırı protein (proteinüri) (≥ 0.3 g / 24 saatlik protein idrarla atılması olarak tanımlanır) veya ek böbrek problemi belirtileri.
- 1.02 mg / dL'nin üzerindeki kreatinin ile karakterize edilen böbrek yetmezliği durumu
- Fetal büyüme kısıtlaması
- Şiddetli baş ağrısı
- Geçici görme kaybı, bulanık görme veya ışığa duyarlılık dahil olmak üzere görme duyusundaki değişiklikler
- Üst karın ağrısı

- Mide bulantısı ve/veya kusma
- İdrara çıkışta azalma
- Bozulmuş karaciğer fonksiyonu
- Nefes darlığı
- Preeklampsi ile ani kilo alımı ve ödem- özellikle yüzde ve ellerde- ortaya çıkabilir. Ancak bunlar birçok normal gebelikte de görüldüğü için preeklampsinin güvenilir tanı kriteri olarak kabul edilmezler (Ayoubi, 2011).

2.3.2 Preeklampsinin Risk Faktörleri ve Epidemiyolojisi

PE'yi tanımlamanın karmaşıklığı, özellikle farklı ülkelerde görülme sıklığını belirlemenin de doğruluğunu etkiler. Düşük ve / veya orta gelirli ülkelerde hastaların tümü tespit edilememek ile birlikte teşhis doğruluğunun standardizasyonu neredeyse imkansızdır. Yaklaşık 39 milyon gebelik verilerinden elde edilen küresel bir tahmin, PE'nin %4,6'lık bir insidansı olduğuna işaret etmektedir (Abalos ve diğ., 2013; Burton ve diğ., 2019).

PE ve eklampsinin dünya genelinde yılda 50.000'den fazla anne ölümüne neden olduğu tahmin edilmektedir. ABD'de, 10 yıllık bir süre boyunca ~ 39 milyon doğum izleyen “*National Hospital Discharge Survey*”, gebelikte hipertansif bozuklukların (preeklampsi, eklampsi, gebelik hipertansiyonu) %5,9 civarında olduğu belirtilmiştir. Hastalığın epidemiyolojisi, klinik görünümü ve bu durum ile ilişkili morbidite, erken başlangıçlı veya 'plasental' PE (34 haftadan önce meydana gelen) ve geç başlangıçlı veya 'maternal' PE (34 hafta sonrası ortaya çıkan) arasında farklılık gösterdiğinden PE'nin heterojenliği konusunda tartışmalar devam etmektedir (Phipps ve diğ., 2019).

Genel olarak, maternal ölümlerin %10-15'i doğrudan PE ve gebelikte hipertansiyon ile ilişkilidir. Bu hastalığın maternal öyküsü olan gebelerde PE riski 2 ila 5 kat daha yüksektir.

Irka bağlı olarak, PE'nin görülme sıklığı sağlıklı, daha önce doğum yapmamış kadınlarda %3 ile %7 arasında ve multiparlarda %1 ile %3 arasında değişmektedir. PE riski, daha önce doğum yapmamış olan kadınlarda, bir veya birden fazla doğum yapmış olanlara kıyasla daha fazladır. (Ayoubi, 2011; Duley, 2009; Tubbergen ve diğ., 1999; Young ve diğ., 2010).

Risk faktörleri şunları içerir:

- **Preeklampsinin Tarihi:** Kişisel veya aile preeklampsisi öyküsü, preeklampsisi riskini önemli ölçüde artırır.
- **Kronik Hipertansiyon:** Kronik hipertansiyon mevcut ise preeklampsisi gelişme riski daha yüksektir.
- **İlk Hamilelik:** İlk hamilelik sırasında preeklampsisi gelişme riski en fazladır.
- **Yeni Babalık:** Yeni bir partnerle yapılan her hamilelik, preeklampsisi riskini, aynı partnerle ikinci veya üçüncü bir hamilelikten daha fazla artırır.
- **Yaş:** Preeklampsisi riski, çok genç gebe kadınlar ile 40 yaşından büyük gebe kadınlar için daha yüksektir.
- **İrk:** Siyah kadınlarda preeklampsisi gelişme riski diğer ırkların kadınlarına göre daha fazladır.
- **Obezite:** Obezite preeklampsisi riskini artırır.
- **Çoklu Hamilelik:** Preeklampsisi ikiz, üçüz veya daha fazla taşıyan kadınlarda daha yaygındır.
- **Gebelikler Arasındaki Aralık:** Bebeklerin iki yıldan az veya 10 yıldan uzun ara ile olması, preeklampsisi riskinin daha yüksek olmasına yol açar.
- **Belirli koşulların geçmişi:** Hamile kalmadan önce belirli koşullara sahip olmak- kronik yüksek tansiyon, migren, tip 1 veya tip 2 diyabet, böbrek hastalığı, kan pıhtılaşması veya lupus gibi bir eğilim- preeklampsisi riskini arttıran faktörlerdendir.
- **Sistemik Lupus Eritematoz:** Sistemik lupus eritematozus (SLE) özellikle deri, eklemler, kan, böbrekler ve merkezi sinir sistemi olmak üzere vücudun farklı organlarını etkileyebilen kronik otoimmün bir hastalıktır ve preeklampsisi riskini artırır (Barton ve Sibai, 2008; Duckitt ve Harrington, 2005; Sibai ve diğ., 2005).

Kronik hipertansiyonun tıbbi öyküsü, böbrek hastalığı, diyabet, obezite, ≥ 35 yaş ve ikiz veya molar gebelik, önceki eklampsisi veya fetal konjenital anormallik gibi gebelik özellikleri de diğer risk faktörleri olarak tanımlanmıştır. Yüksek irtifaların, preeklampsisi insidansını arttırdığı ve daha büyük plasental hipoksiye, daha küçük uterin arter çapına ve daha düşük uterin arter kan akışına bağlı olduğu gösterilmiştir (Ayoubi, 2011; Julian, 2011).

2.3.2.1 Genetik Risk Faktörleri

Preeklampsi (PE) ailelerde akış eğilimindedir. İsveç ikiz kayıt çalışmasına göre tahmini kalıtım derecesi %54'tür (Ros ve diğ., 2000). Hem maternal hem de paternal faktörlerin riske katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Preeklampitik gebelikten doğan bir kadının, PE öyküsü olmayan bir kadına kıyasla riski iki katından fazladır. Preeklampitik gebelikten doğan bir erkeğin, PE geçmişi olmayan bir erkeğe göre 1,5 kat daha fazla risk taşıdığı ve bunlara ek olarak kadının kardeşi preeklampitik bir gebelikten doğarsa, PE riskinin iki katına çıkabildiği gösterilmiştir (Skjærven ve diğ., 2005). Etnik gruplar arasında örneğin beyaz Amerikalı ve Afrikalı-Amerikalı kadınlar arasında PE prevalansında belirgin farklılıklar vardır (Shen ve diğ., 2005). Fetüs hem maternal hem de paternal genleri ifade ettiğinden, fetüsü annenin bağışıklık reddinden korumak için mekanizmalar gelişmiştir. Uygun olmayan bir maternal immün yanıtın trofoblast istilasını etkileyebileceği ve PE'ye yol açabileceği düşünülmektedir. Trofoblastlar, insan lökosit antijenlerinin (HLA) anlatımını yaparlar. HLA'nın maternal, paternal ve fetal genotiplerinin etkileşimleri PE'nin patogeneğinde önemli bir rol oynayabilir (Chappell ve Morgan, 2006; Moffett ve diğ., 2007).

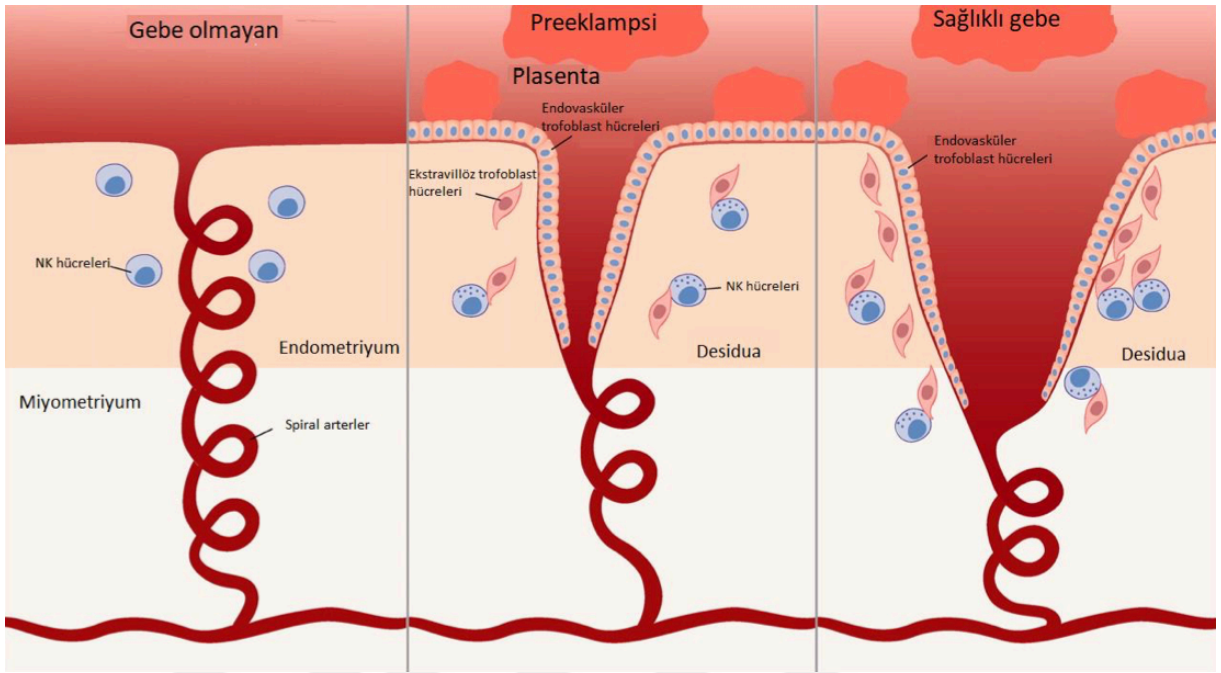
Aile bağlantısı çalışmaları ile duyarlılık lokuslarını (aday gen bölgelerini) tanımlamıştır. Örneğin Finlandiya'da PE görülen ailelerde duyarlılık lokusları 2. ve 9. kromozomlarında bulunmuştur (Majander ve diğ., 2013; Moffett ve Hiby, 2007). Fakat, tek başına genler saptanamamıştır. Genom çapında yeni stratejiler, PE ile ilişkili yaygın ve nadir dizi varyantlarını tanımlama fırsatı sunabilir (Johnson ve diğ., 2012; Zhao ve diğ., 2012). “*InterPregGen*” konsorsiyumu, preeklampitik gebeliklerin yavrularında ilk genom çapında önemli aday gen bölgelerinin keşfedildiğini bildirmiştir (McGinnis ve diğ., 2017). Lokus, PE patofizyolojisinde etkisi olan fms benzeri tirozin kinaz-1 (Flt1)'i kodlayan Flt1 genine yakındır. Şu anda PE'nin tanısı için genetik test mevcut değildir. Ailede PE öyküsü risk tahmini modellerine dahil edilmiştir. Yakın zamanda gelecek vaat eden bulgular ileride PE'nin öngörülmesine yardımcı olabilir ve PE'nin önlenmesinde yeni fırsatlar sunabilir.

2.3.4 Preeklampsinin Patogenezi

Preeklampsi'nin karmaşık heterojenliği, hamileliğin erken döneminde plasental örneklerin elde edilmesindeki etik çıkarımlar ve klinik öncesi modellerin geliştirilmesindeki zorluk, bu hastalığın patogenezinin moleküler regülasyonunun daha iyi anlaşılmasını engellemiştir (Suvakov ve diğ., 2020).

Her ne kadar PE'nin genel etiyolojisi geniş ölçüde zor olsa da bu ciddi gebelik komplikasyonunun patogenezi birçok çalışmada araştırılmıştır. Preeklampsinin patogenezinin iki aşama içerdiği düşünülebilir: Anormal plasenta oluşumu ve maternal sendromun gelişmesi (Phipps ve diğ., 2019).

Preeklampsi, plasentadan kaynaklanan sistemik bir gebelik sendromudur. Plasenta preeklampsi etiyolojisinde her zaman merkezi bir figür olmuştur, çünkü semptomların gerilemesi için plasantanın çıkarılması gereklidir (E. Phipps ve diğ., 2016; J. M. Roberts ve diğ., 2009; James M. Roberts ve diğ., 1989). Yapılan çalışmalar sonucunda iki aşamalı bir model geliştirilmiştir. 1. aşama uterusu plasental iskemiye sebep olan eksik spiral arter yeniden modellemesi (Şekil 2.2) ve 2. aşama ise antianjiyogenik faktörlerin iskemik plasentadan endotel hasarına katkıda bulunan maternal dolaşıma salınmasıdır. İmplantasyon sırasında plasental trofoblastlar uterusu istila eder ve miyometriyal spiral arterlerin tunika ortamını yok ederken; spiral arterleri yeniden modellemeye teşvik eder. Bu, arterlerin gelişmekte olan fetüsü beslemek için maternal vazomotor değişikliklerden bağımsız olarak artan kan akışını karşılamasını sağlar (Kaufmann ve diğ., 2003; E. Phipps ve diğ., 2016). Yeniden modellenmenin bir kısmı trofoblastların bir endotelyal fenotipi ve çeşitli yapışma moleküllerini benimsemesini gerektirir. Bu modelleme bozulursa, plasenta oksijenden yoksun kalır, bu da iskemik plasenta oluşumuna ve devamında oksidatif strese artışa yol açar. Anormal spiral arter yeniden biçimlenmesi, yirmi yıl önce hipertansif olan hamile kadınlarda tanımlanmış (Brosens, 1964; E. Phipps ve diğ., 2016) ve intrauterin gelişme kısıtlaması, gebelik hipertansiyonu, preeklampsi ile komplike olan gebeliklerde merkezi patojenik bir faktör olduğu gösterilmiştir (Kaufmann ve diğ., 2003).



Şekil 2.2: Gebe olmayan, preeklampsi rahatsızlığı olan ve sağlıklı gebelerin spiral arter modellenmesi (Parham, 2004).

Tarihsel olarak “teorilerin hastalığı” diye bilinen preeklampsinin moleküler patogenezi hakkındaki gizem, plasental antianjiyogenik ve anjiyogenik faktörlerdeki değişikliklerin saptanması ile çözülmeye başlamıştır. sFlt1 ve çözünür endoglin gibi antianjiyogenik faktörler, sistemik endotel disfonksiyonuna neden olarak, hipertansiyon, proteinüri ve preeklampsinin diğer sistemik bulgularının çıkmasına sebep olur (Wang ve diğ., 2009).

Bu patojenik faktörlerin plasentadaki düzensizliğinin moleküler temeli bilinmemektedir. Hipoksinin önemli bir düzenleyici olduğu ve aşırı oksidatif stres, iltihaplanma, immün maladaptasyon ve genetik duyarlılığın preeklampsinin patogeneze katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (Maynard ve diğ., 2003; Venkatesha ve diğ., 2006; Young ve diğ., 2010).

2.3.5 Plasentanın Anormal Düzenlenmesi

Plasentanın preeklampsi (PE) patogenezinde merkezi bir rolü vardır. PE yalnızca plasenta varlığında görülür ve genellikle doğumun gerçekleşmesi ile sona erer. Ancak bazı durumlarda sadece fetüsün çıkarılması yeterli olmadığından, plasenta vücuttan uzaklaştırılana kadar da semptomlar devam eder (Shembrey ve diğ., 1995; Wang ve diğ., 2009). Plasenta varlığının preeklampside gerekliliği nedeniyle, plasental vasküler şekillenmedeki erken anormalliklerin hastalıkta nasıl rol oynayabileceği konusunda çok fazla araştırma yapılmıştır.

Normal plasental gelişimin erken dönemlerinde, fetal kaynaklı ekstrasitotrofoblastlar, desidua ve miyometriyumun uterus spiral arterlerini istila eder. Bu istilacı sitotrofoblastlar, maternal spiral arterlerin endotel tabakasının yerini alır, onları küçük, yüksek dirençli damarlardan, büyüyen fetüsün ihtiyaçlarını karşılayabilmek için yeterli plasental perfüzyon sağlayabilen daha büyük çaplı, yüksek kapasiteli damarlara dönüştürür (Wang ve diğ., 2009). PE’de bu dönüşüm eksiktir (Şekil 2.4). Spiral arterlerin sitotrofoblast işgali, yüzeysel desidua ile sınırlıdır ve miyometriyal bölümleri dar kalmaktadır (Meekins ve diğ., 1994).

Zhou ve diğ. normal plasental gelişimde sitotrofoblastların vasküler taklit denilen bir işlem ile endotel fenotipini aldıklarını göstermiştir (Zhou ve diğ., 1997). Preeklampside, sitotrofoblastlar bu hücre-yüzeyi moleküllerinin değişimine uğramaz ve myometriyal spiral arterleri yeterince istila edemezler (Wang ve diğ., 2009; Zhou ve diğ., 1997).

Plasenta vasküler gelişiminin düzenlenmesinde anjiyogenik faktörlerin önemli olduğu düşünülmektedir (Venkatesha ve diğ., 2006). Flt1 (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörü 1 (VEGFR1)), Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (VEGFR2), Tirozin Protein Kinaz Reseptörü 1(Tie-1) ve Tirozin Protein Kinaz Reseptörü 2 (Tie-2) normal plasental vasküler gelişim için gereklidir. Erken gebelikte bu genlerin düzenlenmesindeki değişiklikler preeklampsili kadınların plasentalarında gözlemlenen yetersiz sitotrofoblast istilasına katkıda bulunabilir. Bu gen delesyonları olan farelerde kusurlu plasental vaskülogenez ve erken embriyonik mortalite vardır. İnvaziv sitotrofoblastlar; VEGF, plasental büyüme faktörünü (PIGF) ve VEGFR1'i (Flt1) ifade eder; bu proteinlerin anlatımları PE’de değişiklik gösterir (Wang ve diğ., 2009; Zhou ve diğ., 2002).

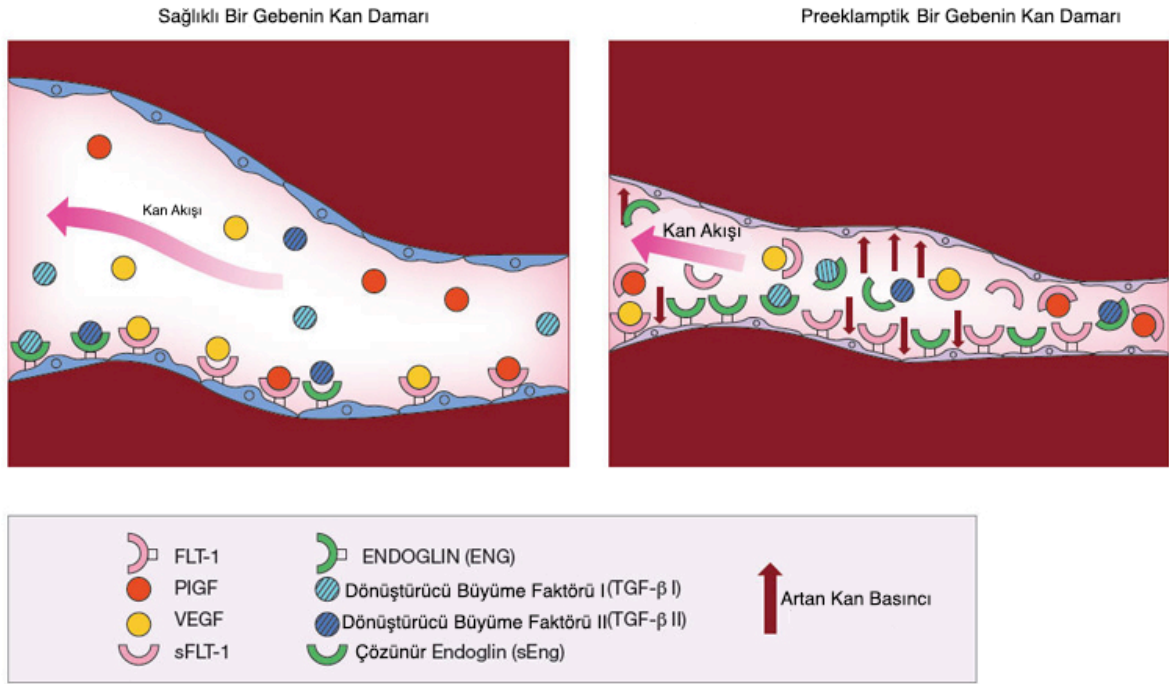
Erken gebelikte bu anjiyogenik sinyallerdeki değişiklikler, preeklampside görülen yetersiz sitotrofoblast istilasına katkıda bulunarak anjiyogenik dengede bir düzensizlik döngüsüne yol açabilir (Wang ve diğ., 2009).

2.4 PREEKLAMPSİNİN TANISINDA KULLANILAN BİYOBELİRTEÇLER

2.4.1 Değişen Anjiyogenik Denge

Anjiyogenez, mevcut endotelden yeni kan damarlarının gelişmesidir. Anjiyogenez, normal plasental gelişim için gereklidir. Gebeliğin erken evrelerindeki anjiyogenez kusuru, PE'nin ana nedenleri; uterus spiral arterlerinin eksik yeniden şekillenmesi, anormal plasental vasküler gelişimidir ve endotel disfonksiyonuyla sonuçlanır (Nikuei ve diğ., 2017). Anjiyogenik büyüme faktörlerinden VEGF ve PlGF normal trofoblastik proliferasyon ve implantasyona katkıda bulunduğu düşünülmektedir ve bu büyüme faktörlerinin anlatımındaki dengesizliğin preeklampsinin patogenezinde çok önemli bir rol oynadığı varsayılmaktadır (Thadhani ve diğ., 2004). PlGF ve VEGF sinyalleşmesi ile ilişkili çözünür fms benzeri tirozin kinaz-1'in (sFlt-1) artan anlatımı, tarif edilen ilk anormalliklerdendir (Ahmad ve Ahmed, 2004; Maynard ve diğ., 2003). VEGF, olgun kan damarlarındaki endotel hücrelerini stabilize eder ve özellikle böbrek, karaciğer ve beyinde endotelin korunmasında önemlidir. VEGF iki ana reseptör aracılığıyla sinyal verir: Flk ve Flt1 reseptörleri. sFlt1, antianjiyogenik özelliklere sahip bir tirozin kinaz proteindir ve sinsityotrofoblastlar tarafından maternal dolaşıma salgılanır. VEGF ve PlGF'nin anjiyogenik faktörlerini bağlayarak serbest VEGF ve PlGF konsantrasyonlarının azaltılması yoluyla kan damarı büyümesini azaltır (Şekil 2.3) (Clark ve diğ., 1998).

sFlt1'in plasental anlatımı PE'de artar ve maternal dolaşımda belirgin bir artış gösterir (Maynard ve diğ., 2003). Birçok araştırmacı, maternal dolaşımdaki sFlt1 artışının klinik hastalığın başlangıcından önce olduğunu ve hastalık şiddeti ile ilişkili olduğunu doğrulamıştır (Chaiworapongsa ve diğ., 2004; Levine ve diğ., 2004; McKeeman ve diğ., 2004; Wathén ve diğ., 2006).



Şekil 2.3: Sağlıklı bir gebe ile preeklampitik bir gebe arasındaki anjiyogenik ve antianjiyogenik faktörlerin anlatımında oluşan farklılık.

PE, sEng (çözünür endoglin) dahil olmak üzere anjiyogenik faktörlerde bir dengesizlik ile karakterizedir (Leaños-Miranda ve diğ., 2019). Çeşitli çalışmalar, antianjiyogenik bir faktör olan sEng'nin PE etiyolojisindeki rolünü göstermiştir (Aggarwal ve diğ., 2012). sEng, transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β) için çözünür bir yardımcı reseptör izoformudur. TGF- β bir proanjiyogenik moleküldür. Endoglin, TGF- β reseptörü ile birlikte TGF- β 'ya bağlanır (Şekil 2.3). Ancak, sEng, TGF- β 'ya bağlanarak dolaşımdaki serbest TGF- β miktarını azaltır ve antianjiyogenik etki gösterir. Çeşitli gözlemler sEng'in preeklampsisi patogenezindeki rolünü desteklemektedir. (Levine ve diğ., 2006).

2.4.2 Gebelik ile İlişkili Plazma Protein-A

Gebelik ile ilişkili protein A (PAPP-A) esas olarak plasenta tarafından üretilir (Anderson ve diğ., 2012). PAPP-A plasenta fonksiyonunu yansıtır. Büyüme ve onarım süreçlerinde rol oynar. (Kaijomaa ve diğ., 2016). Anne kanında bu protein gebelik yaşıyla birlikte artar ve doğumdan sonra hızla azalır. Gebeliğin ilk üç ayında (ilk trimesterde) Down sendromu taraması için rutin olarak kullanılır ve normal sağlıklı bir gebeliğe göre anlatımının azalması, hem kromozom anomalileri hem de olumsuz gebelik sonuçları için artmış bir risk olduğunu gösterir. Erken başlangıçlı preeklampsi (PE) olmak üzere, daha sonra PE gelişimini öngören bir biyobelirteç grubuna aittir. Kabul edilebilir bir yanlış pozitiflik oranı ile daha yüksek bir saptama oranı elde etmek için uterin arterin Doppler ultrasonografisi ve diğer biyokimyasal ve maternal faktörlerle birleştirilmelidir. Bazı çalışmalar, daha sonra preeklampsi gelişen kadınlarda, preeklampsi gelişmeyen kadınlara kıyasla, gebeliğin erken ikinci trimesterinde PAPP-A'nın daha da belirgin bir şekilde azaldığını göstermiştir ve fakat gebeliğin son üç aylık döneminde ise PE hastalarında PAPP-A'nın konsantrasyonunun PE olmayan hastalara kıyasla artmış olduğunu belirtmişlerdir (Kalousová ve diğ., 2014). İlk üç aylık dönemde PAPP-A'nın tarama performansı preeklampsi için tek bir biyobelirteç olarak sadece %10-20'dir (Poon ve diğ., 2009; C. A. Spencer ve diğ., 2008). Diğer olası değişkenler ile birlikte risk tahmini algoritmalarında daha iyi performans gösterebilir.

2.4.3 Plasental Protein 13

Plasental protein-13 (PP-13) plasental trofoblast hücreleri tarafından üretilir. Normal implantasyon ve plasenta vasküler gelişiminde rol oynayan, sinsityotrofoblastlar tarafından anlatımı yapılan, galektin ailesi üyesidir (Than ve diğ., 2008). Normal gebeliklerde, serum PP-13 seviyeleri gebelik yaşı ile birlikte yükselir (Anderson ve diğ., 2012). Daha sonrasında preeklampsi gelişen kadınlarda, PP-13 düzeyleri ilk trimesterde daha düşüktür ve erken başlangıçlı veya şiddetli preeklampsi ile bu bulgular daha da belirginleşir (Gonen ve diğ., 2008; K. Spencer ve diğ., 2007). Farklı çalışmalar, öngörücü bir belirteç olarak PP-13'ün performansı hakkında farklı bilgiler üretmiştir (Akolekar ve diğ., 2009). Tespit oranları, PP-13'ün preeklampsi öngörüsünde tek bir biyobelirteç olarak kullanılmasını sağlayacak kadar yüksek değildir. Örneğin, PP-13'ü Doppler ultrason ölçümü ile birleştirirken, hamileliğin erken dönemindeki tahmin oranı, Khalil ve meslektaşlarının yaptığı bir çalışmada %10'luk yanlış pozitif oranla %71 idi (Khalil ve diğ., 2010). Başka bir çalışma, Doppler ultrason ile %10 yanlış

pozitif oran ve 11 h+ 0-13h + 6 gebelik haftasında erken başlangıçlı preeklampside %90 tahmin oranı bildirmiştir (Nicolaides ve diğ., 2006).

2.4.4 Fetal Hemoglobin ve Alfa 1-Mikroglobulin

Fetal hemoglobin (HbF) preeklampsinin patogenezinde ve HbF'ye karşı fizyolojik savunmada “hem” ve radikal temizleyici olan alfa 1-mikroglobulin (A1M) ile ilişkili olabilir (Anderson ve diğ., 2012; May ve diğ., 2011). Preeklampitik plasentalarda artmış Hb üretimi gösterilmiştir (Olsson ve diğ., 2010). Hb genlerinin preeklampitik plasentadaki hücrelerinde anlatımının çok fazla olabileceği ve plasenta kan damarı lümenine salınabileceği varsayılmaktadır (Centlow ve diğ., 2008). Serbest Hb ve onun metabolitleri “hem” ve demir güçlü toksinlerdir ve endotel hasarı ve iltihaplanmasına neden olur (Kumar ve diğ., 2005; Tsemakhovich ve diğ., 2005). Plasental hücreler, azalmış perfüzyona ve lokal hipoksiye yanıt olarak hematopoez uyarıcı ajanlar üretir (Centlow ve diğ., 2008). Birkaç Hb ve “hem” detoksifikasyon sistemi tarif edilmiştir. Serbest “hem” ve radikal nötrleştirici A1M, karaciğer ve plasenta tarafından üretilir (Olsson ve diğ., 2012). Hb, “hem” ve reaktif oksijen türlerine (ROS) maruz kaldıktan sonra anlatımı artar. Daha sonra preeklampsisi gelişen kadınlarda, ilk trimesterde HbF ve de A1M önemli ölçüde yükselir. İlk trimesterde preeklampsinin öngörülmesinde HbF ve A1M'yi değerlendiren çalışmaların umut verici sonuçları vardır (Ulrik Dolberg Anderson ve diğ., 2011; Olsson ve diğ., 2010). Bu iki biyobelirteç ile maternal klinik risk faktörlerinin birleştirilmesi preeklampsisi için bir tahmin modeli olarak kullanılabilir (Ulrik Dolberg Anderson ve diğ., 2016).

2.4.5 İnhibin A ve Aktivin A

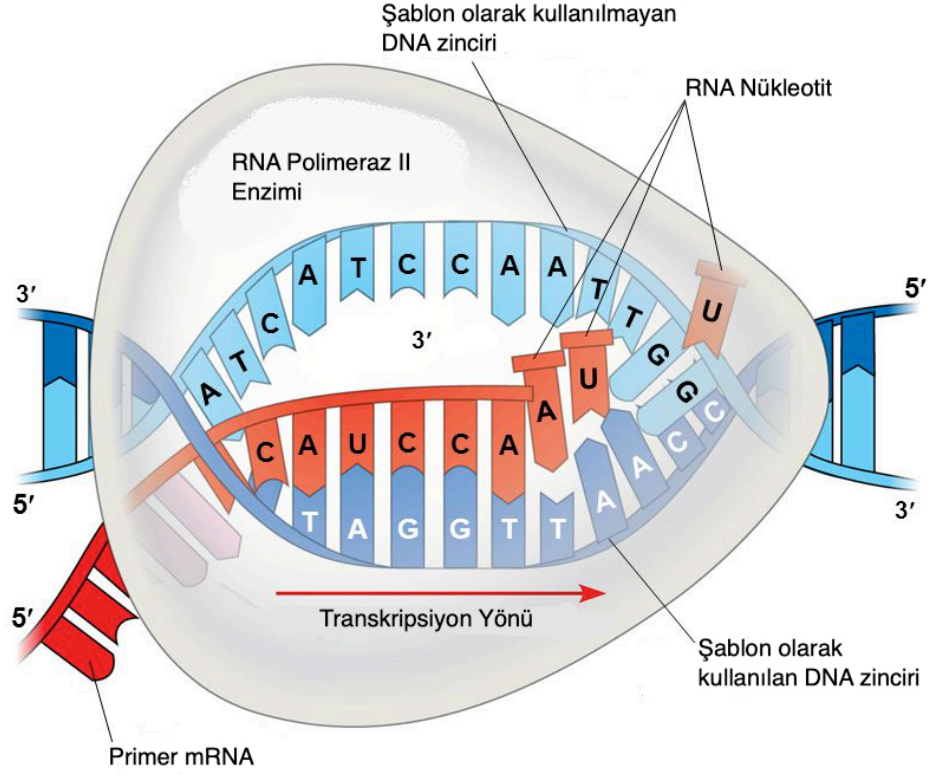
Her iki glikoprotein hormonu da fetoplasental birim tarafından üretilir. Çeşitli çalışmalar, preeklampsisi gelişen hastaların normal sağlıklı gebelikleri olan hamile kadınlara kıyasla anne kanında ilk trimesterde hem inhibin A'nın hem de aktivin A'nın anlatımının arttığını göstermiştir (Akolekar ve diğ., 2011). Normal gebeliklerde, üçüncü trimesterde her iki hormonun konsantrasyonlarının arttığı ve şiddetli preeklampsisi görülen kadınlarda bu hormon seviyelerinin kontrollere göre yaklaşık 10 kat artış gösterdiği belirtilmiştir (Muttukrishna ve diğ., 1997). Şiddetli preeklampsisi geliştirmeye devam eden gebelerin ikinci trimesterinde hem amniyotik sıvıdan hemde serumdan bakılan inhibin A hormonunun konsantrasyonunun yüksek olduğu görülmüştür. Gebeliğin sona ermesine yakın yapılan serum ölçümünde hastalığın şiddeti

ile inhibin A arasında bir ilişki olabileceği varsayılmaktadır (Zeeman ve diğ., 2002). Bununla birlikte, bozulmuş trofoblast istilas, endotel disfonksiyonu ve artmış aktivin A konsantrasyonu arasında bir ilişki bulunmamıştır (Akolekar ve diğ., 2009). Yapılan bir başka araştırmada, uterus ven seviyelerinde olduğu gibi preeklampsili kadınların idrar örneklerinde de aktivin A ve inhibin A düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Muttukrishna ve diğ., 2006). Aktivin A'daki ve inhibin A'daki bu artışların nedeni henüz tam olarak anlaşılamamıştır ve bu hormonların preeklampsisi etiyolojisinde bir rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Üriner inhibin A'nın ve aktivin A'nın ölçümü de dahil olmak üzere ileriye dönük prospektif çalışmalar açıkça gereklidir.

2.5 PREEKLAMPSİ İLE İLİŞKİLİ ADAY GENLER

Gen anlatımı, DNA'DA kodlanmış bilgilerin protein gibi fonksiyonel bir ürüne dönüştürülme işlemidir. Gen ifadesi, bir hücrenin değişen ortamına yanıt vermesini sağlayan sıkı şekilde düzenlenmiş bir işlemdir.

DNA'da yer alan genetik kodun özgül proteinlere dönüşebilmesi için iki ana evre vardır: Transkripsiyon ve translasyon evreleri. Transkripsiyon basitçe DNA'dan RNA sentezi olarak tanımlanır. Genetik bilgi RNA molekülüne transkribe edilir. RNA polimeraz enzimi DNA sarmalının kopyalanacak zincirini açarak ayırır ve 3' ucundan başlayarak yeni RNA molekülü için nükleotitleri bağlar (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Transkripsiyon aşamasında RNA polimeraz II'nin DNA'ya bağlanması ve transkripsiyon yönünde primer mRNA'nın uzaması.

Yeni oluşan RNA molekülü (mRNA) 5' ucundan 3' ucuna doğru sentezlenmiş olur. DNA'da yer alan ve transkripsiyonun başlangıç ve bitiş noktalarını belirleyen özel bölgeler bulunmaktadır. RNA polimerazın bağlandığı ve transkripsiyona başladığı DNA dizisine promotör bölge ve transkripsiyonun bittiği sinyali veren diziye de terminatör bölge denir. Ökaryotlarda prokaryotların aksine 3 tip RNA polimeraz bulunur. mRNA sentezinde RNA polimeraz II kullanılır. Ökaryotlarda RNA polimeraz II enziminin promotöre bağlanabilmesi ve transkripsiyonun başlayabilmesi için, öncesinde transkripsiyon faktörleri (TF) olarak adlandırılan bir takım proteinin promotöre bağlanması gerekmektedir. Ökaryotik promotörlerde, transkripsiyon başlangıç noktasından önce 25 nükleotit boyutlarında TATA kutusu olarak isimlendirilen TATA nükleotitlerini içeren bir dizi bulunur. TATA bölgesini tanıyan bir TF, RNA polimeraz II enziminin önce DNA'ya bağlanır. Diğer TF'leri de transkripsiyon kompleksini oluşturmak üzere RNA polimeraz II'yi DNA'ya bağlar. DNA sarmalı açılır ve transkripsiyon başlar. Transkripsiyon, terminatör bölgedeki gen dizisinin transkribe edilmesi ile biter. (Sonlanma sinyali)

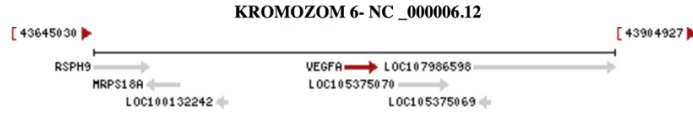
Ökaryotlarda prokaryotlardan farklı olarak RNA polimeraz II enzimi, primer mRNA'da sonlanma sinyali olan AAUAAA 'yı da geçer ve 10-35 nükleotitten sonra RNA, DNA'dan ayrılır. Ökaryot hücrelerde yer alan çekirdekteki enzimler transkripsiyon olduktan sonra primer mRNA'yı değişikliğe uğratar. Primer mRNA 5' ucundan 3' uca doğru sentezlendiğinden, ilk olarak 5' uca, değiştirilmiş guanozin trifosfat başlığı eklenir. Bu başlık mRNA'yı hidrolitik enzimlere karşı korur ve sitoplazmaya geçen mRNA'nın ribozomlara bağlanmasını kolaylaştırır. (bağlanma sinyali görevi görür) Bir başka enzim ise primer mRNA'nın 3' ucuna poli(A) kuyruğu olarak isimlendirilen ve RNA'nın parçalanmasını engelleyen bir 50-250 nükleotitlik adenin bağlar. RNA'nın korunmasını sağlar ve sitoplazmaya geçişini kolaylaştırır. Ökaryotik genlerde ve RNA transkriptlerinde parçalı gen yapısından dolayı, kodlama yapan (ekzon) ve kodlama yapmayan (intron) bölgeler bulunur. Transkripsiyon aşamasında bir gen bölgesinden primer mRNA oluşurken RNA polimeraz II intron ve ekzonları da transkribe eder. Kesintisiz bir kodlama bölgesi elde etmek için ise intronlar primer mRNA'dan kesip çıkarılır ve ekzon uçları birleştirilir. Bu işleme RNA splayı denir. mRNA sitoplazmaya geçiş yaptıktan sonra translasyon aşaması başlar. Translasyon, mRNA'nın taşıdığı genetik mesajın proteine dönüşmesi işlemidir. mRNA molekülü 5' ucundan ribozoma bağlanır. mRNA'nın getirdiği genetik bilgi (kodon) transfer RNA (tRNA) tarafından getirilen antikodonlarla tercüme edilir. Her bir tRNA molekülü bir aminoasite özgüdür. tRNA'daki 3 nükleotit (antikodon) dizisi mRNA'daki tamamlayıcı kodon ile baz eşleşmesi gerçekleştirir. Oluşan aminoasitler tRNA'lar ile polipeptid zincirine taşınır. Translasyon üç ana evrede gerçekleşir. İlk evre başlama evresidir. Ribozomun küçük alt birimi mRNA'nın 5' ucuna ve başlatıcı tRNA'ya bağlanır. Ökaryotlarda, transkripsiyon aşamasında primer mRNA'nın 5' ucuna eklenen guanozin trifosfat başlığı bu küçük alt birimin mRNA'ya bağlanmasını sağlar. Başlama kodonu olan AUG ile metiyonin aminoasidini taşıyan UAC tRNA'sı bağlandıktan sonra büyük ribzom alt biriminin de birleşmesi ile translasyon için kompleks tamamlanmış olur. Başlama faktörleri olarak adlandırılan proteinlerle bu yapılar birleşir. İkinci evre uzama evresidir. Gelen tRNA molekülü mRNA'daki kodonu tanır ve eşleşir. Uzayan polipeptidin sonuna oluşan yeni aminoasit peptit bağı ile eklenir. Son evre ise sonlanma evresidir. mRNA'daki durdurma kodonu olarak işlev gören UGA, UAA ve UAG nükleotitleri aminoasite tercüme olmazlar. Ayrılma faktörü olarak isimlendirilen protein ribozoma bağlanır ve polipeptidi tRNA'dan hidrolize ederek ribozomdan ayırır. Polipeptid zinciri katlanmaya başlar ve kendi 3 boyutlu yapısını oluşturur (Campbell ve Reece 2010).

Günümüzde; biyomedikal ve bilimsel araştırmalar, belirli bir hastalığı geliştiren mekanizmaları açıklamaya çalışmaktadır. Bu nedenle gen anlatımı çalışmalarının büyük bir kaynak olduğu kanıtlanmıştır. Gen anlatımı, spesifik bir genin haberci RNA (mRNA) seviyelerini saptamaya ve ölçmeye yöneliktir (Segundo-Val ve diğ., 2016).

Preeklampsi hastalığı için yapılan gen anlatım çalışmaları bulunmaktadır. Preeklampsi ile ilişkili aday genlerin tam olarak tanımlanamamış olmasından yola çıkarak Daniel A Enquobahrie ve diğ. (2008), yaptığı bir araştırmada plasental gen anlatımını araştırmak için mikrodizi ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu çalışmaları gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada çeşitli fonksiyonlara sahip genlerin anlatımının hastalığın patogenezindeki karmaşıklığı belirterek preeklampsi riski ile ilişkili olup olmadığını göstermişlerdir. (Enquobahrie ve diğ., 2008). Preeklampsi patogenezinin ilk olarak gebeliğin ilk yarısında zayıf plasantasyon ve devamında gelişen maternal yanıt olarak iki aşamalı oluşum teorisinden yola çıkarak bir başka çalışma yapılmıştır. Virginia ve diğ.(2011) desidua dokusunda gen anlatım profilini inceleyerek PE'de plasental katkıyı göstermeyi amaçlamışlardır. Yapılan bu araştırmada hem normal plasantasyondaki hem de PE durumunda gelişen plasentada gen anlatım değişikliklerini mikrodizi yöntemi ile göstermişlerdir (Winn ve diğ., 2011). Preeklampsi patogenezinde yer alan anjiyogenik faktörler arasındaki dengesizlik üzerine yapılan gen anlatım analiz çalışmaları da mevcuttur. Geçtiğimiz on yıl boyunca, epidemiyolojik, deneysel ve terapötik çalışmalar, dolaşımdaki sFlt-1 ve PlGF ve sEng gibi ilgili proteinlerin anlatımındaki değişiklikler nedeniyle antianjiyogenik durumun da değiştiğine dair kanıt sağlamıştır (Karumanchi, 2016).

2.5.1 VEGF(A) Geni

Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (A) (VEGF(A)) geni 6. kromozomun kısa kolunda 6p21.1 bölgesinde yer almaktadır (Şekil 2.8). Trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve vasküler endotelyal büyüme faktörü ailesinin bir üyesidir. Alternatif kırılma ile altı farklı izoform olan VEGF-A121, VEGF-A145, VEGF-A165, VEGF-A183, VEGF-A189 ve VEGF-A206 mevcuttur.



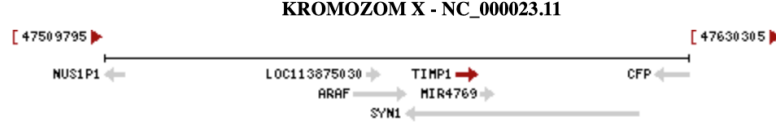
Şekil 2.5: VEGF(A) geninin insan genomundaki yerleşimi.

VEGF(A)'nın (VEGF olarak da bilinir) endotelyal hücrelerde göçü, proliferasyonu ve tüp oluşumunu destekler. Bu büyüme faktörü hem fizyolojik ve patolojik anjiyogenez hem de vaskülogenez için gereklidir. VEGF(A) geni VEGF sinyal yolağında bulunmaktadır (*KEGG Pathway Database*).

Agarwal ve diğ., (2019), preeklampsia gelişen gebelerde implantasyon ile birlikte plasenta gelişiminin eksik ve yetersiz kaldığını vurgulamışlardır. Bu koşullar altında oksijen yetersizliğinden kaynaklı hipoksinin geliştiği ve artan oksidatif stres ile beraber antianjiyogenik faktörlerin anlatımının artabileceği çalışmalarda gösterilmiştir. Hipoksik koşullar altında, hipoksi indüklenebilir faktör-1 alfa (HIF1- α) hücre çekirdeğine taşınır ve hipoksi indüklenebilir faktör-1 beta (HIF1- β) ile birleşir. Bu kompleks daha sonra DNA'nın hipoksi tepki elemanı (HRE) bölgesine bağlanır ve bu da eritropoez, glikoliz ve anjiyogenez gibi birçok işlemde yer alan genlerin transkripsiyonu ile sonuçlanır (Matsubara, 2017). VEGF(A) HIF1 sinyal yolağında bulunan bir gendir (*KEGG Pathway Database*). Preeklampsia patogeneziindeki anahtar rolü sebebiyle benzer birçok bilimsel çalışmanın odağı olmuştur (Agarwal ve diğ., 2019). MKH'lerin de başta VEGF(A) olmak üzere anjiyogenik parakrin faktörleri salgıladıkları çalışmalarda gösterilmiştir (Pankajakshan ve Agrawal, 2014).

2.5.2 TIMP-1 Geni

Metalloproteinaz doku inhibitörü 1 (TIMP-1) geni X kromozomunun kısa kolunda Xp11.3 bölgesinde konumlanmıştır (Şekil 2.9).

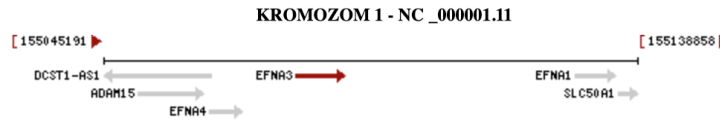


Şekil 2.6: TIMP-1 geninin insan genomundaki yerleşimi.

Matriks metaloproteinazlar (MMP'ler), benzer yapılar ve karmaşık fonksiyonlara sahip bir proteolitik enzimler sınıfıdır. Matriks yıkımında en önemli enzimdir. Zn^{2+} bağımlı enzimler ailesine aittir. TIMP'ler, MMP'lerin doğal doku inhibitörüdür. MMP'lerin aktif olmayan formlarını bağlayarak matriks yıkımını inhibe eder (Nikolov ve diğ.,2020).

2.5.3 EFNA3 Geni

Efrin A3 (EFNA3) geni 1. kromozomunda 1q21.3 bölgesinde konumlanmıştır (Şekil 2.10). Bu gen efrin ailesinin bir üyesini kodlar. Efrin reseptörleri ve ligandları (efrinler) reseptör tirozin kinazların en büyük ailesine aittir. Efrin ligandları, plazma membranına bağlanma şekillerine bağlı olarak A ve B olmak üzere iki alt sınıfa ayrılır. Efrin A alt sınıf ligandları (A1-A5), bir glikosilfosfatidilinositol (GPI) yoluyla membrana bağlanır. Efrin B alt sınıf ligandları bir transmembran proteinidir (Arvanitis ve Davy, 2012).



Şekil 2.7: EFNA3 geninin insan genomundaki yerleşimi.

Zhang ve diğ., (2012), hedef geni olarak EFNA3 çalışmışlardır. Embriyogenez sırasında gelişim, hücre göçü ve vasküler yeniden modellenme gibi farklı biyolojik fonksiyonlarda yer aldığını belirtmişlerdir.

2.5.4 THSD7A Geni

THSD7A (“*Thrombospondin Type 1 Domain Containing 7A*”) geni 7. kromozomun kısa kolunda 7p21.3 bölgesinde konumlanmıştır (Şekil 2.11). THSD7A, gelişme sırasında endotel göçünü ve vasküler modellenmeyi etkilediği bilinen yeni bir endotel proteindir. Plasenta damarlanmasında ve insan göbek kordonu veni endotel hücrelerinde anlatımı gözlemlenmiştir (C.H. Wang ve diğ., 2009).



Şekil 2.8: THSD7A geninin insan genomundaki yerleşimi.

2.6 KÖK HÜCRENİN TANIMI VE SINIFLANDIRILMASI

Kök hücreler kendi kendini yenileme ve farklı hücre tiplerine farklılaşma özelliğine sahiptir. Farklılaşma potansiyellerine göre;

- Unipotent: Tek bir hücre tipine farklılaşabilen
- Pluripotent: Her 3 germ tabakasına da farklılaşabilen (ektoderm, endoderm, mezoderm)
- Multipotent: Özelleşmiş hücre grupları oluşturabilen
- Totipotent: Tüm organizmayı oluşturabilecek kapasiteye sahip hücreler olarak ayrılırlar.

Elde edildikleri kaynaklara göre; embriyodan, fetüsten, perinatal dokudan ve yetişkinlerden olmak üzere dört genel bölüme ayrılırlar. (Blanpain ve diğ., 2004) (Şekil 2.9).

Embriyonik Kök Hücre:

Embriyonik kök hücreler, blastosistlerden türetilen pluripotent, kendi kendini yenileyen hücrelerdir. Döllenmeden 4-5 gün sonra embriyo gelişiminin çok erken aşamalarından alınırlar (Lerou, 2011; Q. L. Ying ve diğ., 2003). Bunlar kültür içinde farklılaşmamış hücre dizileri olarak saklanabilir ve herhangi bir hücre dizisine farklılaşmaları için uyarılabilirler (Klimanskaya ve diğ., 2006). Endoderm, mezoderm ve ektoderm olmak üzere embriyonik germ

tabakalarına ve ayrıca her tür somatik hücreye farklılaşabilirler. Bu nedenle, doku rejenerasyon tedavisinde büyük bir kapasiteye sahiptirler (Zhang ve Huang, 2010).

Fetal Kök Hücre:

Fetal kök hücreler, fetüslerin organlarında bulunan primal hücre tipleridir. Pluripotent kök hücreler ve hematopoietik kök hücreler olmak üzere iki tür kök hücreye farklılaşabilirler. Fetüslerden nöral krest kök hücreleri, fetal hematopoietik kök hücreler ve pankreatik adacık hücreleri izole edilmiştir (Beattie ve diğ., 1997).

Perinatal Kök Hücre:

Göbek kordonu kök hücreleri: Göbek kordonu kanında, kemik iliği ve yetişkin periferik kandakinden farklı olan kök hücreler bulunur. Kordon kanı kök hücrelerinin nöronlara ve karaciğer hücrelerine farklılaşabilmesi onların çok potansiyelli olduğunun bir kanıtıdır. (Rogers ve Casper, 2004).

Wharton Jölesi Kök Hücreleri: Göbek kordonu matriksi olan *Wharton*'un jölesi mezenkimal kök hücrelerin kaynağı olarak kabul edilir. Bu hücreler tipik kök hücre belirteçlerini ifade eder, uzun süre çoğaltılabilir ve “in vitro” nöronlara farklılaşmaları için uyarılabilir (Mitchell ve diğ., 2003).

Yetişkin Kök Hücre:

Yetişkin kök hücreleri, olgun dokudan alınan kök hücrelerdir. Tamamen gelişmiş bir bebeğin (tüm embriyo) veya bir yetişkinin dokularında bulunurlar. Sınırlı sayıda hücre tipi üretebilirler. Bu hücrelerin gelişme evresi nedeniyle embriyolardan ve fetüslerden türetilen kök hücrelerle karşılaştırıldığında sınırlı farklılaşma potansiyeline sahiptirler. Doku onarımı, rejenerasyonunda hayati bir rol oynarlar (Gimble ve diğ., 2007). Kemik iliği, yetişkin kök hücrelerinin yer aldığı en bol kaynaktır. (Gao ve diğ., 2008).

Mezenkimal Kök Hücre:

Mezenkimal Kök Hücreler (MKH'ler), çeşitli somatik soylara farklılaşma potansiyeli olan farklı bir hücre popülasyonudur. Osteositler, kondrositler, adipositler, tenositler ve miyositler halinde farklılaşabilen fibroblast benzeri görünüme sahip, tutunma özelliği gösteren hücreler

olarak tanımlanırlar (Deng ve diğ., 2001). MKH'ler kemik iliğinden izole edilebilir ve plastik yüzeye tutunma özelliği göstererek hematopoetik kök hücrelerden kolayca ayrıştırılabilirler (Zhang ve Chan, 2010). Doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta kullanılırlar (Kim ve diğ.,2005). Potansiyellerinde büyük bir kayıp olmadan uzun süre saklanabilme özelliği taşırlar (Parekkadan ve Milwid, 2010).



Şekil 2.9: Kök hücrelerin sınıflandırılması.

Hematopoetik (Kan) Kök Hücre:

Hematopoetik kök hücreler, kendini yenileme potansiyeline ve tüm hematopoetik soyların farklılaşmış hücrelerini meydana getirme özelliğine sahiptir (Xie ve diğ., 2006).

Nöral Kök Hücre:

Nöral hücreler multipotent ve kendini kopyalayabilme özelliğine sahip hücrelerdir. Yetişkin memeli beyinde özelleşmiş moleküler mikroçevrede bulunurlar. Beynin hücresel tedavisinde potansiyel rol gösterebilirler (Imitola, 2007).

2.6.1 Mezenkimal Kök Hücre

1970 yılında, Friedenstein ve arkadaşları, kemik iliğindeki, morfolojik yapısı fibroblastlara benzeyen, yapışma özelliği gösteren küçük bir popülasyon olan ve klonal büyüme sergileyen hücreleri tarif ettiler. Bunların osteoblastlara dönüşme kabiliyetine sahip progenitör hücreler olduğunu gösterdiler (Friedenstein ve diğ., 1987). Daha sonra Caplan yaptığı bir çalışma sonucunda kemik iliğindeki kıkırdak ve kemiğe farklılaşma kabiliyeti sergileyen alt popülasyona mezenkimal kök hücre terimini verdi (Caplan, 1991). Mezenkimal kök hücreler, göbek kordonu, kemik iliği ve yağ dokusu dahil olmak üzere birçok dokuda bulunan çok işlevli yetişkin kök hücreleridir. Mezenkimal kök hücreler bölünerek kendini yenileyebilir ve kemik, kıkırdak, kas ve yağ hücreleri ve bağ dokusu dahil olmak üzere birçok dokuya farklılaşabilir.

Kök hücreler onarım işlemini transdiferasyon, hücre füzyonu, mikro-tanecikler veya eksozomlar gibi çeşitli mekanizmalarla ve en önemlisi parakrin faktörlerini salgılayarak düzenler (Pankajakshan ve Agrawal, 2014). Ayrıca, bu hücreler enflamatuar mikroçevrelere göç etme kabiliyetine sahiptir, burada anjiyogenez ve yara iyileşmesi gibi birçok olayı temel olarak parakrin tarzda indükleyerek aktif bir rol oynarlar (de la Torre ve diğ., 2019).

Maternal desiduada bulunan MKH'lerin, plasantasyon sırasında maternal-fetal arayüzün pro-anjiyogenik, immünomodülatör ve antienflamatuar ortamının düzenlenmesinde rol oynadığına inanılmaktadır. Preeklampsili hastalarda desidual MKH sitokin üretiminde ve miRNA düzeylerinde anormalliklerin tespit edildiği çalışmalar mevcuttur (G. Zhao ve diğ., 2014). Preeklampsisi olan ve olmayan kadınlardan yağ dokusu kaynaklı MKH'lerin işlevini değerlendiren bir çalışmada, preeklampsili kadınlardan izole edilen MKH'lerin hayatta kalması, proliferasyonu ve migrasyonu bozulmuştu ve yaşlanmaya bağlı olarak daha düşük anjiyogenik potansiyel göstermişlerdi (Sonja Suvakov ve diğ., 2019).

2.6.1.1 *Plasental Mezenkimal Kök Hücre (P-MKH)*

Plasenta, hem maternal hem de fetal hücrelerin bir arada bulunduğu çok hücreli bir bariyer olduğundan eşsiz bir organdır. Plasenta, genetik olarak farklı iki birey, anne ve fetus arasında metabolik değişim ve endokrin regülasyon fonksiyonlarını yerine getirirken, aralarındaki immünolojik toleransı korur (Cross ve diğ., 1994) Placentel doku tıbbi atık olarak kolayca elde edilebilir. Placentadan türetilen MKH'ler, invaziv prosedürler olmaksızın tıbbi atıklardan tedarik edilebilir ve embriyonik kök hücrelerin aksine kullanımını kısıtlayan etik tartışmalar yoktur. İnsan plasentasının sadece fetal gelişim, beslenme ve toleransta temel ve önemli bir rol oynadığı değil, aynı zamanda bir MKH kaynağı olarak da işlev gördüğü bilinmektedir (Wu ve diğ., 2018). Placentanın karmaşıklığı göz önüne alındığında fetal kısım olarak amniyon, koryon ve göbek kordonu, maternal kısım olarak da desidua şeklinde iki bölüme ayrılabilir. Placentanın farklı kısımlarından elde edilen MKH'ler üzerine raporlar yayımlanmıştır (Abumaree ve diğ., 2013; Castrechini ve diğ., 2012; in 't Anker ve diğ., 2004; Kusuma ve diğ., 2015; Miao ve diğ., 2006; Yen ve diğ., 2005).

Preeklampsi gibi gebelikle ilişkili birçok bozuklukta ciddi disfonksiyonel damarlanma ve anjiyogenez bozukluğu görülür (Hitzerd ve diğ., 2019). Gebelik bozuklukları sıklıkla trofoblastik anormalliklerle ilişkilidir ve P-MKH'ler plasentada sadece gebelik süresi kadar bulunduğundan, burdan izole edilen P-MKH'lerin ilgili bozukluğu araştırmak için alternatif bir yöntem olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir (Fuchi ve diğ., 2017). Plasenta oldukça vasküler bir organ olduğundan, onlardan izole edilen MKH'lerin daha anjiyogenik özelliklere sahip olması gerektiği varsayılmaktadır (Castrechini ve diğ., 2010; Chen ve diğ., 2015). Bu varsayım ayrıca plasentadaki mezenkimal hücrelerin, fetal kan hücrelerinden ziyade hemanjiyogenik hücrelerin erken progenitörlerinin oluşumuna doğrudan katkısını gösteren çalışmalar ile desteklenmektedir. Hemanjiyogenik hücreler, plasentadaki ilk damarları oluşturur ve P-MKH'lerin anjiyogenezdeki varsayılan rolüne dair daha fazla kanıt sağlar (Demir ve diğ., 1989). Genel özelliklerinin yanı sıra, anjiyogenik faktörlerin salgılanması, migrasyon ve kılcal tüp oluşumuna aracılık etmek için matriks metaloproteinazların salgılanması da placentanın anjiyogenez temelli araştırmalarda uygunluğunu desteklemektedir. Placentadan türetilen MKH'ler, kültürde plastiğe tutunma özelliği gösterir. CD105, CD73 ve CD90 gibi belirli bir hücre yüzeyi belirteçlerinin ifadesinde pozitif ve CD34, CD45 ve CD14 veya CD11b, CD79a veya CD19 ve HLA-DR dahil hematopoietik belirteçlerin ifadesinde de negatiftirler.

2.6.1.2 Periferik Kan Kökenli Mezenkimal Kök Hücre (PK-MKH)

Günümüzde, rejeneratif tıp, doku mühendisliği ve birçok bilimsel araştırmada çok sayıda hücre tipine ayrılma kapasitesine sahip kök hücrelerin izolasyonu ilgi çekmiştir (Egusa ve diğ., 2012). Periferik kan kökenli mezenkimal kök hücreler (PK-MKH), invaziv olmayan prosedürlerle hastanın kanından kolayca toplanabilen, otolog, düşük maliyetli bir kök hücre kaynağı sağlar (G. Wu ve diğ., 2015). Kemik iliğinden (ana kaynak olarak) ekstraksiyon, düşük sıklıkta yapılan ve heterojen popülasyon veren invaziv ve yüksek riskli bir yaklaşımdır (Wagner ve diğ., 2005). Bu sorunları aşmak için araştırmacılar mezenkimal kök hücreleri alternatif ve erişilebilir doku kaynaklarından izole etmeye çalıştılar (Hass ve diğ., 2011). Kandan türetilen kök hücreler, erişilebilirlik ve yüksek farklılaşma potansiyelleri ile tıbbi uygulamalar için umut verici bir kaynak olarak alternatif oluşturmuştur. Periferik kandan türetilen MKH'ler olarak da adlandırılan dolaşımdaki MKH'ler başlangıçta fibroblast benzeri hücreler olarak keşfedildi ve daha sonra birçok araştırmacı tarafından periferik kan yoluyla taşınan koloni oluşturan birimler olarak doğrulandı (Luria ve diğ., 1971; Paul, 1958). Son dönemlerde yapılan çalışmalarda, periferik kandan türetilen MKH'ler rapor edilmiştir, ancak birçok çalışmada bu hücrelerin dolaşımdaki miktarının yetersiz kaldığı kısıtlayıcı bir faktör olarak gösterilmiştir (Kassis ve diğ., 2006; Wexler ve diğ., 2003). PK-MKH'leri CD105, CD73 ve CD90 hücre belirteçlerini ifade ederler ve CD45, CD34, CD14, HLA - DR'nin anlatımından yoksundurlar (Jones ve diğ., 2002).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 ÖRNEKLERİN ELDE EDİLMESİ

Proje için örnek elde etme işlemleri İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıklar ve Doğum biriminde uzman doktor tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızın etik kurul izni İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 07/11/2018 tarihli 49403 sayılı kararla alınmıştır. Preeklampsi tanısı konan ve kontrol grubu olarak sağlıklı gebeler çalışmamızın araştırma gruplarını oluşturmuştur. Gebelerden doğum öncesi “BD Vacutainer K2 EDTA (10ml)” tüpe 10 mL periferik venöz kan ve ameliyat sırasında da plasenta desiduasından doku parçası alınmıştır. Alınan desidua parçası; hücrelerin yıkanması, taşınması ve seyreltilmesi gibi hücre kültürü uygulamaları için kullanılan HBSS 1X GIBCO® (“Hanks Balanced Salt Solution”) içerisinde 50 mL’lik falkon tüpe konulmuştur. Toplanan örnekler oda sıcaklığında taşınarak Koç Üniversitesi Translasyonel Tıp Araştırma Merkezi (KUTTAM)’ne götürülmüştür.

3.2 MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KÜLTÜRÜ

3.2.1 Plasenta Desidua Dokusundan Mezenkimal Kök Hücre Kültürü

1. Kültüre başlamadan önce besiyeri hazırlandı. Besiyeri içerisinde olması gereken malzemeler aşağıda listelenmiştir:
 - 900 mL dH₂O + “Dulbecco’s Modified Eagles’s Medium/ Nutrient Mixture F-12” (DMEMF12 Hams) tozu
 - 1.2 g Sodyum Bikarbonat
 - 10 mL Penisilin-Streptomisin (PS) – 10.000 Unit/mL Penisilin, 10000 µg/mL Streptomisin)
 - 20 mL L-glutamin
 - 100 mL “Fetal Bovine Serum” (FBS)
2. Eklemeler yapıldıktan sonra karışım filtrelendi.
3. Hücre kültürüne güvenlik kabini içinde başlandı (Şekil 3.1). Çalışılacak alan ve kullanılacak malzemeler steril edildi.



Şekil 3.1: Hücre kültüründe kullanılan güvenlik kabini.

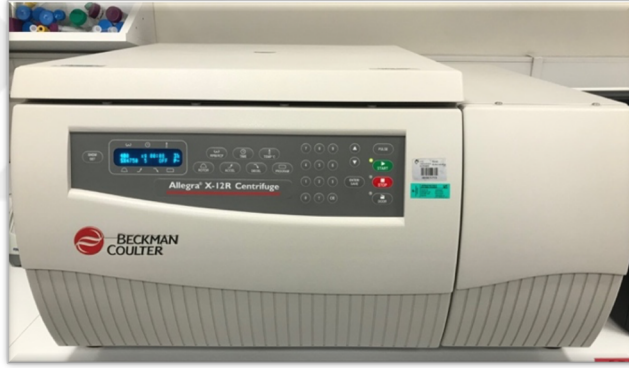
4. Çalışılacak doku örneği petri kabına çıkartıldı.
5. Plasenta doku örneği DPBS (“Dulbecco’nun Fosfat Tamponlu Salin’i”) ile yıkandı.
6. Neşter yardımı ile plasenta dokusu küçük parçalara ayrılarak yıkamaya 2-3 kez daha devam edildi.
7. Yıkanan plasenta dokusu 50’lik falkon tüpe aktarıldı.
8. 40 mL DPBS eklenir ve el yardımıyla aşağı yukarı karıştırıldı.
9. Falkon tüp içerisindeki doku parçaları petri kabına kondu ve neşter ile daha küçük parçalara kesildi.
10. Yeni bir falkon tüpe 40 mL DMEM/F12 (“Dulbecco’s Modified Eagles’s Medium/ Nutrient Mixture F-12”) eklendi.
11. -20°C’den kollejenaz çıkartıldı ve elde çözündürüldü. Çözöldükten sonra konsantrasyon %0,4 olacak şekilde, önceden hazırlanan falkon tüp içerisindeki besi yerine eklendi.
12. Hazırlanan solüsyon 2 falkon tüpe 20’şer mL olacak şekilde paylaştırıldı.
13. Falkon tüplerine doku parçaları paylaştırıldıktan sonra kapağı kapatıldı ve parafinle sarıldı.
14. Hazırlanan tüpler 37°C’ye ayarlanmış çalkalamalı su banyosuna konuldu ve 1 saat beklendi.
15. Su banyosundan çıkartılan falkon tüplere dolana kadar DPBS eklendi ve el yardımıyla karıştırıldı.
16. 10 dk boyunca 400 x g’de santrifüj edildi.
17. Süpernatant az miktar kalacak şekilde atıldı.
18. Üzerine, toplam miktar 20 mL olacak şekilde DMEM/F12 eklendi ve pipetaj yapıldı.

19. 4 tane T75'lik “*Flask*” çıkartıldı.

20. Her birine hazırlanan örnekli solüsyondan 12-15 mL kadar, ekim yapıldı.

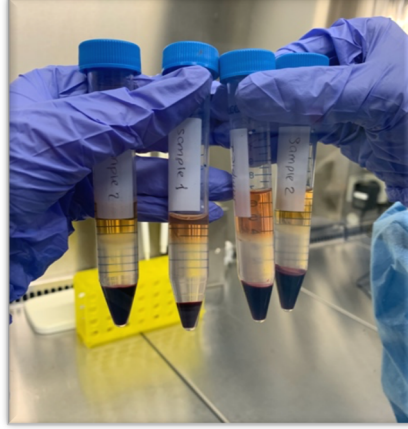
3.2.2 Periferel Kandan Mezenkimal Kök Hücre Kültürü

1. 10 mL kan tüpünde gelen kan örneği 50 mL'lik falkona aktarıldı.
2. Üzerine 20 mL RPMI (“*Roswell Park Memorial Institute*”) eklendi.
3. Aşağı yukarı hafifçe karıştırıldı.
4. 8 adet 15 mL'lik falkon çıkartıldı. Üzerlerine 3'er mL “*Ficoll- Paque PREMIUM density gradient media (600 mL)*” eklendi.
5. Üzerine 4 mL 1/3 sulandırılmış kan falkonu eğerek gradient oluşması için yavaşça eklendi.
6. +4°C 400x g'de 30 dk Allegra X-12 cihazında santrifüj edildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: Periferel kanın santrifüj edildiği Beckman Coulter Allegra® X-12.

7. Tüplerin üzerindeki en üst tabaka aspire edildi.
8. Orta tabakada görünen bulutsu tabaka toplanıp 15 mL'lik yeni bir falkona aktarıldı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Periferik kan örneklerinin santrifüj sonrası ayrılmış görüntüsü.

9. Üzerine falkon dolana kadar DPBS eklendi.
10. 10 dk 400 x g’de santrifüj edildi.
11. Süpernatant uzaklaştırıldı.
12. 2 mL DPBS eklendi ve pipetaj yapıldı.
13. “6-well plate”lere ekim yapıldı.

3.3 MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN AYIRT EDİLMESİ

3.3.1 Akım Sitometri Yöntemi (“Flow Cytometry”)

1. Deneye başlamadan önce DPBS “(Dulbecco’nun Fosfat Tamponlu Salin’i)” ve tripsin 37°C’ye ayarlı su banyosuna kondu.
2. %1 FBS ve %1 PS içeren DPBS solüsyonu hazırlandı. Şırınga yardımıyla filtrelendi.
3. İnkübatördeki, yeterli yoğunluğa ulaştığı görülen hücre solüsyonu çıkartıldı. Hücreler %0.05 tripsin ile kaldırıldı. En fazla 5 dk tripsinde bekletildi. Mikroskop ile hücrelerin flask yüzeyinden kalkıp kalkmadığı kontrol edildi. Eğer yeterince hücre kalkmamışsa, hücre solüsyonunun daha uzun süre tripsin de beklememesi için mekanik etkilerle yüzeyden ayrılması sağlandı.
4. Koyulan tripsin miktarının yaklaşık 2 katı kadar %1 FBS, %1PS içeren DPBS solüsyonu eklendi ve yıkama işlemi yapıldı. 1500 rpm’de 5 dk santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı.
5. 100 µL %1 FBS, %1PS içeren DPBS solüsyonu eklendi.

6. Boyama işlemine geçildi. Her bir antikor için tüplerin üzerinde belirtilen test başına kaç μL kullanılacağı ya da toplam da ne kadar miktar ile kaç test yapılacağı (Şekil 3.4) yazdığından bu bilgilere göre her bir antikor için gereken miktarlar Tablo 3.1’de gösterildiği şekilde ayarlandı.



Şekil 3.4: Akım sitometrisi için yapılacak olan boyama işleminde kullanılan antikorların örneği.

Tablo 3.1: Mezenkimal kök hücrelerin ayırt edilmesi aşamasında kullanılan antikorların isimleri ve miktarları.

PERCP CD105 (+)	5 μL
FITC CD73 (+)	5 μL
APC CD45 (-)	20 μL
PE CD34 (-)	20 μL

7. Karanlıkta buz üzerinde 15 dk bekletildi.
8. 500 μL %1 FBS, %1PS içeren DPBS solüsyonu eklendi. 1500 rpm’de 5 dk santrijüj edildi. Süpernatant atıldı.
9. 1 adet “Collection” tüp, 1 adet “sample” tüp çıkartıldı. Üzerleri etiketlendi. Negatif kontrol için “sorting” tüp ayrı olarak hazırlandı.
10. Akım sitometrisinde çalışılacak ve sınıflandırılacak hücreler “collection” tüpte birikeceğinden içerisine sadece besiyeri kondu.
11. 500 μL %1 FBS, %1PS içeren DPBS solüsyonu eklendi. Pipetaj ile süspanse edildi. Hazırlanan bu solüsyon “sample” tüp içerisine aktarıldı.

12. “Collection” tüp, “sample” tüp ve “sorting” tüp buz üzerinde akım sitometrisi cihazına götürüldü.
13. Cihazın kalibrasyonu yine cihaza özel olan kalibrasyon solüsyonu ile yapıldı. Cihaza ait gereken prosedür takip edildi.
14. Kalibrasyon sona erdikten sonra “sample”tüp ve “collection”tüp cihaz içerisindeki gerekli alanlara yerleştirildi. Cihaz analiz için başlatıldı. (“SONY Cell Sorter SH800Z)

3.4 MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDEN GEN ANLATIM ANALİZİ

3.4.1 Total RNA İzolasyonu

Hücrelerden total RNA izolasyonu aşamasını gerçekleştirmek için “Nucleospin miRNA Kit” kullanılmıştır. Firmanın önerdiği prosedür takip edilmiştir:

1. Protokole başlamadan önce “rDNase” (“RNase-free”) ve “Wash Buffer MW2” hazırlandı.
2. Kitin içerisinde 2 şişe “rDNase, RNase-free” liyofilize halinde çıktı. Liyofilize haldeyken +4°C’de saklandı. Kullanılacağı zaman her bir şişe için 3 mL “Reaction Buffer for rDNase” ilave edildi ve 1 dk oda sıcaklığında bekletildi. “rDNase, RNase-free”nin çözünmesi için yavaşça karışması sağlandı. Hazırlanan çözelti bölüntülere ayrıldı ve -20°C’de saklandı. Parçalara ayrılan çözeltileri 3 defadan fazla dondurulup çözdürememeye dikkat edildi.
3. “Wash Buffer MW2” şişesine de 48 mL %96-100’lük etanol ilave edildi.
4. Santrifüj ile önceden elde edilen hücre peletine 300 µL “Buffer ML” eklendi ve hücrelerin parçalanmasını sağlamak için pipetaj veya vorteks yapıldı.
5. Mor halkalı “NucleoSpin” filtresi 2 mL’lik kapaklı “Collection” tüpe yerleştirildi. Vizkositeyi azaltmak için lizat filtreden geçirildi. 11.000 g ‘de 1 dakika santrifüj edildi.
6. Kullanılan mor halkalı “Nucleospin” filtresi atıldı. Deneye altta kalan sıvı ile devam edildi. Büyük ve küçük RNA’ların bağlanma koşullarını ayarlamak için homojenize olmuş lizata 150 µL %96-100’lük etanol eklendi ve 5 sn vorteks ile karışması sağlandı. 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. (18-25°C)
7. Her reaksiyon için bir adet kapaklı “Collection” tüpüne yerleştirmek üzere mavi halkalı “NucleoSpin” RNA filtresi alındı. Lizatı filtreye yüklemeden 2-3 kez pipetaj yapıldı ve

- aktarıldı. 11.000 x g 'de 1 dk santrifüj edildi. Büyük RNA ve DNA'nın bağlandığı filtre ve altta kalan, küçük RNA ve proteinleri içinde bulunduran sıvı muhafaza edildi.
8. Mavi halkalı "*NucleoSpin*" RNA filtresi, kapaksız yeni bir 2 mL'lik "*Collection*" tüpe yerleştirildi.
 9. Altta kalan sıvının bulunduğu "*Collection*" tüpün kapağı kapatıldı. Deneye ilk olarak filtre ile devam edildi.
 10. Mavi halkalı "*NucleoSpin*" RNA filtresi üzerine 350 µL "*Buffer MDB*" eklendi. 11.000 g 'de 1 dk santrifüj edildi.
 11. Altta kalan sıvı atıldı ve filtre geri yerleştirildi.
 12. 100 µL rDNase doğrudan filtreye yüklendi. Oda sıcaklığında en az 15 dk beklemeye alındı ve bu süre de 7. basamakta ayrılan, altta kalmış olan sıvıyla deneye devam edildi.
 13. Ayırdığımız sıvının üzerine 300 µL "*Buffer MP*" eklendi ve 5 sn vorteks yapıldı. Ardından 11.000 x g 'de 3 dk santrifüj edildi. Bu işlem proteinleri çöktürmek için yapıldı.
 14. Kapaklı yeni bir "*Collection*" tüpe beyaz halkalı "*Nucleospin*" filtresi yerleştirildi. Üzerine 13. basamakta elde ettiğimiz süpernatant eklendi. 11.000 g 'de 1 dk santrifüj edildi. Filtre atıldı ve altta kalan sıvı ile devam edildi.
 15. 800 µL "*Buffer MX*" sıvıya ilave edildi. 5 sn vorteks yapıldı.
 16. Bu karışımdan 600 µL 12. basamakta kullandığımız mavi halkalı "*NucleoSpin*" RNA filtresi üzerine yüklendi. 11.000 g 'de 30 sn santrifüj edildi. Altta kalan sıvı atıldı. Filtre geri yerleştirildi. Elde kalan karışım bitene kadar bu basamağa tekrar edildi.
 17. Yıkama aşamasına geçildi.
 - 1. Yıkama: 600 µL "*Buffer MW1*" filtreye yüklendi. 11.000 x g 'de 30 sn santrifüj edildi. Alta geçen sıvı atıldı ve filtre geri yerleştirildi.
 - 2. Yıkama: 700 µL "*Buffer MW2*" filtreye yüklendi. 11.000 x g 'de 30 sn santrifüj edildi. Alta geçen sıvı atılır ve filtre geri yerleştirildi.
 - 3. Yıkama: 250 µL "*Buffer MW2*" filtreye yüklendi. 11.000 x g 'de 2 dk santrifüj edildi. "*Collection*" tüp atıldı. Filtre yeni bir 1.5 mL'lik kapaklı "*Collection*" tüpe yerleştirildi.
 18. 50 µL "*RNase-free H₂O*" eklendi. Oda sıcaklığında 1 dk bekletildi. 11.000x g 'de 30 sn santrifüj edildi. Filtre atıldı. Altta kalan sıvı RNA stabilizasyonu için -80°C'de muhafaza edildi.

3.4.2 Total RNA'dan cDNA Sentezi

İzole edilmiş total RNA'lardan "*iScript cDNA Synthesis*" kiti kullanılarak önerilen prosedür doğrultusunda cDNA sentezlendi. Optimum sonuçlar elde edebilmek için reaksiyonlar buz üzerinde gerçekleştirildi. Kit içerisinde çıkan "*5x iScript Reaction Mix*", "*iScript Reverse Transcriptase*" enzimi, "*Nuclease-free water*" ve izole edilmiş total RNA buz üzerinde çözündürüldü. Her bir örnek için PCR tüpler hazırlandı ve etiketlendi. Tüplerin her birine 4 μ L "*5x iScript Reaction Mix*", 10 μ L "*Nuclease-free water*", 5 μ L total RNA örnekleri kondu ve en son 1 μ L "*iScript Reverse Transcriptase*" enzimi eklendi ve pipetaj ile karışması sağlandı.

Total RNA örnekleri 1 μ L'sinde 100 ng olacak şekilde ayarlandı ve pipetaj hatasını minimuma indirmek için 5 μ L alındığında 100 ng olacak şekilde sulandırılıp eklendi.

Deney sırasında, toplam hacimin 20 μ L olmasına dikkat edilecek şekilde total RNA ve "*Nuclease-free water*"ın miktarları değiştirilebildi. cDNA reaksiyonu için gerekli bileşenler Tablo 3.2'de ve termal döngü için gereken koşullar da Tablo 3.3 'te gösterilmiştir.

Tablo 3.2: cDNA sentezin için hazırlanan karışımın bileşenleri.

cDNA Reaksiyon Bileşenleri	Reaksiyon Başına Eklenecek Hacim (μ L)
" <i>5x iScript Reaction Mix</i> "	4 μ L
" <i>Nuclease-free water</i> "	10 μ L
" <i>iScript Reverse Transcriptase</i> "Enzim	1 μ L
Total RNA Örneği	5 μ L
Toplam	20 μ L

Tablo 3.3: cDNA sentezi için RT-PZR termal döngüsü.

	Sıcaklık	Süre
Primer Aşaması	25 °C	5 dk
Ters Transkripsiyon Aşaması	46 °C	20 dk
Ters Transkripsiyon İnaktivasyonu	95 °C	1 dk

3.4.3 Primer Tasarlama

Primer tasarımları “*Ensemble*,” “*Primer3plus*” ve “*in silico PCR*” kombinasyonu kullanılarak yapıldı. Primerlerin ve büyütecekleri ürün boyutlarının özgüllüğü, internet üzerinden halka açık olan “*Ensembl*” ve NCBI veritabanları vasıtasıyla kontrol edildi. Tüm genler için primerlerin detaylı listesi aşağıda gösterilmiştir. (Tablo 3.4)

Tablo 3.4: Primer listesi.

Genin Adı	“ <i>Forward Primer</i> ” (5’- 3’)	“ <i>Reverse Primer</i> ” (5’- 3’)	Tm F-R (°C)	Boyut (bp)
VEGF(A)	GCTACTGCCATCCAATCGAG	TGGTGATGTTGGACTCCTCA	59-57	162
TIMP-1	AAGGCTCTGAAAAGGGCTTC	GAAAGATGGGAGTGGGAACA	57-57	161
EFNA3	CATGCGGTGTACTGGAACA	AGATAGTCGTTACGTTACCT	57-58	80
THSD7A	ACAGGCTGGAATCCATGAGT	AGTGCGCTTTCTGGTCCTAA	57-57	160
GAPDH	AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT	CCCCACTTGATTTTGGAGGGA	58-60	425

3.4.4 Damlacıklı Dijital Polimeraz Zincir Reaksiyonu

1. Deneye başlamadan önce cDNA’nın konsantrasyonu 1ng olarak ayarlandı.
2. Her primer için reaksiyon başına oluşturulacak karışımda gereken bileşenler Tablo 3.5’de gösterildiği gibi hazırlandı.

Tablo 3.5: ddPZR aşamasında reaksiyon başına gerekli karışımın miktarları.

Bileşen	Bir Reaksiyon İçin Gereken Miktar
“ <i>Eva Green Supermix</i> ”	10,5 µL
“ <i>Forward Primer</i> ”	1,68 µL
“ <i>Reverse Primer</i> ”	0,84 µL
cDNA örneği	2 µL
“ <i>Nuclease-Free Water</i> ”	5,98 µL
TOPLAM	21 µL

3. Oluşturulan karışımlar 8’li şerit PZR tüplerine aktarıldı.
4. Tüplere konsantrasyonları önceden 1 ng olacak şekilde ayarlanmış cDNA örnekleri eklendi.
5. Kullanılan her bir primer için cDNA örneği yerine “*Nuclease-Free Water*” eklendi ve NTC tüpleri (“*No-template control*”) hazırlandı.
6. Hazırlanan 8’li şerit PZR tüpleri 200 x g x’de 2 dk köpük kalmamasına dikkat edilerek santrifüj edildi.
7. 8 kanallı pipet kullanılarak PZR tüplerindeki örnekler “*DG8 Cartridge*”deki “*sample*” yazan kuyucuklarına 20 µL eklendi (Şekil 3.5).

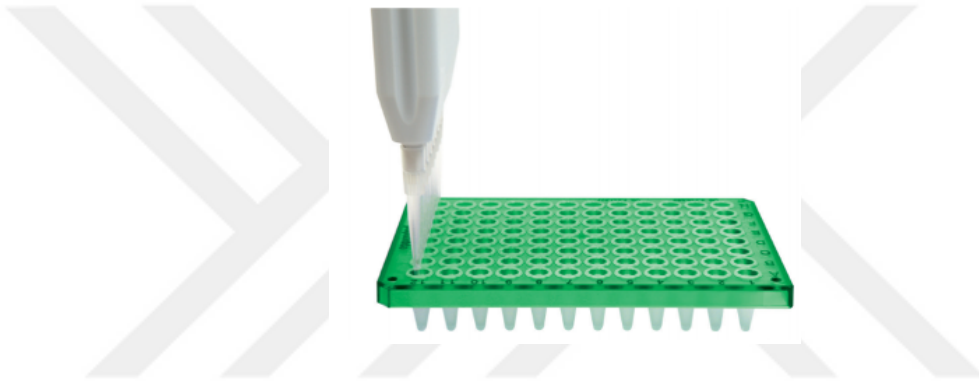


Şekil 3.5: “*DG8 Cartridge*”.

8. “*DG8 Cartridge*”deki “*oil*” kuyucuklarına 70 µL “*Droplet Generator Oil*” yüklendi.
9. “*DG8 Cartridge*” “*QX200 Droplet Generator*” cihazına yerleştirildi. Cihaz yağ ve örnekler ile damlacık “*droplet*” oluşturdu (Şekil 3.6).
10. “*DG8 Cartridge*”deki “*droplet*” kuyucuğundaki damlacıklardan 40 µL alınarak 96’lı “*plate*”e aktarıldı (Şekil 3.7).
11. Tüm örneklerin aktarımı tamamlandıktan sonra 180°C ‘ye önceden ayarlanmış olan “*Bio-Rad’s PX1PCR Plate Sealer*” (Şekil 3.8) cihazı kullanılarak “*plate*”in üstü “*Piercable Foil Heat Seal*” ile kapatıldı.



Şekil 3.6: “QX200 Droplet Generator”.



Şekil 3.7: 96’lı “plate”.



Şekil 3.8: “Bio-Rad’s PX1PCR Plate Sealer”.

12. Bu işlem 1-2 dk içerisinde sona erdi ve PZR aşamasına geçildi.
13. “Eva Green Supermix” prosedüründe belirtilen termal döngü PZR cihazında Tablo 3.6’da gösterildiği gibi ayarlandı.

Tablo 3.6: ddPZR termal döngüsü.

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Enzim Aktivasyonu	95°C	5 dk	1
Denatürasyon	95°C	30 sn	40
Bağlanma & Uzama	55-60°C	1 dk	40
Sinyal Stabilizasyonu	4°C	5 dk	1
	90°C	5 dk	1
Bekleme	4°C	Sonsuz	1

14. PZR aşaması bittikten sonra “plate” alındı ve “Bio-Rad’s QX200 Droplet Reader” cihazına yerleştirildi (Şekil 3.9).

**Şekil 3.9:** “Bio-Rad’s QX200 Droplet Reader”.

15. Cihaz tek tek kuyucuklardaki negatif ve pozitif “droplet”leri okudu ve sonuçlar analiz edildi.

3.5 VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ

Tez çalışmasında “*EvaGreen*” boyası temelli ddPZR yöntemi kullanıldı. Bu yöntem ile analizi yapılan genler için özel tasarlanmış primerler ve tüm örneklerin normalizasyonu için GAPDH geni çalışıldı. Her bir örnek için bulunan kopya/ μ l değerleri “*QX200™ Droplet Reader*” cihazında yüklü olan “*QuantaSoft version 1.7.4*” programı ile analiz edildi. Çıkan verilerin GAPDH geni ile gerekli oranlamaları yapıldıktan sonra normalizasyon değerleri elde edildi. mRNA anlatımının karşılaştırılması için normalizasyon sonuçları “*Graphpad Prism Version 8.3.0*” programına girildi ve parametrik olmayan “*Mann Whitney Test*” ile istatistiksel analizleri yapıldı. Analizler sonucunda “*p*” değeri 0,05’ten az olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu olarak kabul edildi. ROC (“*Reciever Operating Characteristic*”) analizi ve ROC eğrisi altında kalan alan (AUC) tanı testleri ve(ya) yapılan testlerin kontrol ve hasta grubu karşılaştırmasında iyi bir şekilde ayrımının yapılabilmesi için önemli bir analizdir tekniğidir.

Bu tez çalışmasında sağlıklı olarak değerlendirilen kontrol grupları ve preeklampsi tanısı konan hastalar çalışıldı. Seçilmiş genlerin anlatım farklılıkları değerlendirildi ve yukarıda bahsedilen testler, analizler; preeklampsinin tanısı ve mekanizmasını aydınlatmak için biyobelirteç araştırması yapmak üzere uygulandı.

4. BULGULAR

4.1 ÖRNEKLERİN SEÇİMİ

7'si sağlıklı (kontrol) ve 7'si preeklampsi olmak üzere tüm gebelerden kan ve plasenta desidua doku örneği elde edildi. (Toplam 14 gebe 28 örnek) Gebelerimizin takibi ve tanıların koyulması İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı uzman hekimlerimiz tarafından yapıldı. Araştırmada yer alan bireylerin klinik özellikleri aşağıda gösterildi. (Tablo 4.1)

Tablo 4.1: Araştırmada yer alan gebelerin klinik özellikleri.

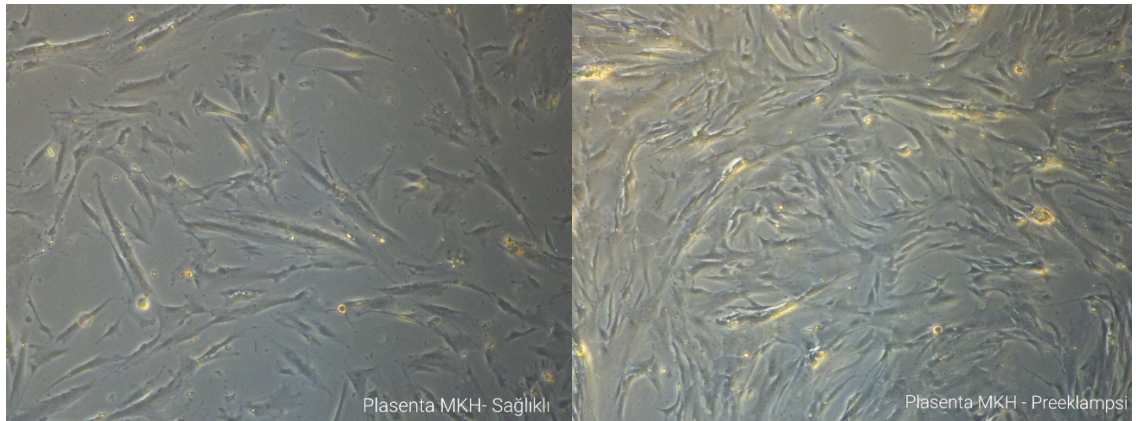
	Preeklampsi (n=7)	Kontrol (n=7)
Yaş	31,4 ± 5,7	28 ± 5,9
Gebelik Haftası	37,7 ± 1,7	38 ± 1
Vücut Kütle İndeksi	36,4 ± 6,1	31,8 ± 8,6
Sistolik Kan Basıncı	142,3 ± 4,08	113,3 ± 5,2
Diastolik Kan Basıncı	92,8 ± 4,4	78 ± 7,6
İdrarda Protein Atımı	2(+) ± 0,7	yok

4.2 MEZENKİMAL KÖK HÜCRE (MKH) KÜLTÜRÜ

4.2.1 Plasenta Desidua Dokusundan Mezenkimal Kök Hücre Kültürü

Bölüm 3.2.1’de anlatılan prosedüre uygun şekilde plasenta desidua dokusunun enzimatik parçalanmasından sonra mezenkimal kök hücre(dMKH) kültürü gerçekleştirildi ve içinde besiyeri olan kültür kabına ekildi.

Plasenta doku parçası besiyerine bırakıldıktan sonra tamamen kültür kabına yapışmasını sağlamak için 5 gün bekletildi. Kültür kabına doku parçasının hücreleri yayılana kadar besiyeri değiştirildi. Plasenta, mezenkimal, hematopoietik, trofoblastik ve olası daha ilkel kök hücreler dahil olmak üzere fibroblast benzeri hücreler ve çeşitli progenitör hücre popülasyonlarının kaynağı olduğu için kültürün ilk kontrollerinde farklı kökenli hücreler görüldü. MKH’lerin plastiğe tutunma, yapışma özelliği olduğundan, bunlar dışında kalan istenmeyen hücreler besiyeri değişimi sırasında ortamdan uzaklaştırılmış oldu. Hücre kültür kabını kaplayan hücreler için pasajlama aşamasına geçildi. Yeterli yoğunluğa her ulaştıklarında tekrar pasajlandı ve numaralandırıldı. Her pasajlama da istenmeyen mikroorganizmalar uzaklaştırıldı ve 2-3 pasaj sonra tabana yapışan hücreler olabildiğince saf hale geldi. Aşağıda giderek saf hale getirilen MKH’lerin akım sitometrisi aşamasına geçmeden önce çekilmiş görüntüleri mevcuttur (Şekil 4.1).

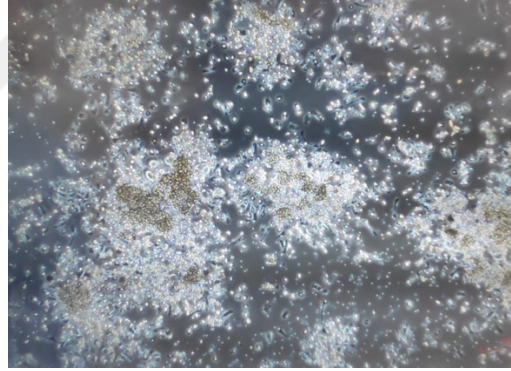


Şekil 4.1: Sağlıklı ve preeklampitik plasentadan edilen dMKH kültürlerinin faz kontrast mikroskop görüntüsü.

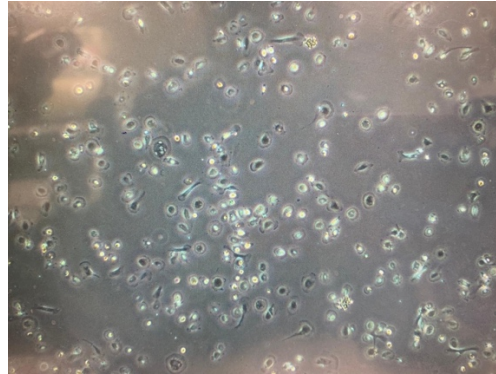
Plasenta dokusu için toplam 14 örneğe (7 preeklampsi+7 kontrol) ait kültürler, kültür kabında yeterli yoğunluğa ulaştıklarında bölüm 3.3.1’de anlatılan prosedüre uygun olarak MKH ayırt edilmesi için akım sitometrisi “*Flow Cytometry*” yöntemi uygulandı.

4.2.2 Periferel Kandan Mezenkimal Kök Hücre Kültürü

Preeklampsi ve kontrol grubuna ait 14 periferel kan örneği, MKH’leri elde etmek amacıyla, bölüm 3.2.2’de de prosedürü belirtildiği şekilde kültüre edildi. Plasenta desidua dokusuna kıyasla kandaki MKH sayısı daha azdı ve gerekli yoğunluğa ulaşması daha fazla zaman aldı. Kültür yapıldıktan sonra 5 gün hücrelerin tutunması için beklendi. Ardından kültür ortamı her 2 günde bir değiştirildi ve süspansiyon halindeki hücreler besiyeri yenilendikçe ortamdan uzaklaştırılmış oldu. Bu kültür ortamında besiyeri değişimleri sonucunda yapışma özelliği gösteren MKH’ler elde edildi (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).



Şekil 4.2: Sağlıklı gebelereeden elde edilen periferel kan kökenli MKH’lerin kültüre alındığı 1. gün.



Şekil 4.3: Sağlıklı gebelereeden elde edilen periferel kan kökenli MKH’lerin ayırım öncesi görüntüsü.

Yeterli yoğunluğa her ulaştıklarında tekrar pasajlandı ve numaralandırıldı. Her pasajlama da istenmeyen hücreler uzaklaştırıldı ve 2-3 pasaj sonra tabana yapışan hücreler olabildiğince saf halde elde edilmiş oldu. Periferal kan için toplam 14 örnek (7 preeklampsi+7 kontrol) tamamlandıktan sonra periferal kan kökenli MKH ayırt edilmesi için akım sitometrisi “*Flow Cytometry*” yöntemi bölüm 3.3.1’de anlatılan prosedüre göre uygulandı.

4.3 MEZENKİMAL KÖK HÜCRE AYRIMI

4.3.1 Plasenta Desidua Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Ayırt Edilmesi

- Bölüm 4.2.1’de anlatılan aşamalardan sonra 4. pasajlamada olabildiğince saf MKH’ler elde edilmişti ancak hala homojen bir hücre popülasyonu değildi. Elimizdeki hücrelerin saf MKH olduğundan emin olabilmek için akım sitometrisi yöntemi uygulandı. Mezenkimal kök hücrelere özgü floresan işaretli hücre yüzey belirteçleri seçildi (APC CD45(-) / PE CD34(-) ve PerCP CD105(+) / FITC CD73(+)).

Akım sitometrisi yöntemi ile MKH’lerin seçilmesi “*SONY Cell Sorter SH800Z*” cihazıyla gerçekleştirildi. Sonuçlar FCS “*Flow Cytometry Standard*” dosyası olarak kaydedildi.

Akım sitometrisinin analiz aşamasında sağlıklı sonuçlar elde edebilmek için çıkan grafik sonuçlarından canlı olduğunu düşündüğümüz, debris olmayan hücreler (canlı olan ve istenmeyen partikül içermeyen) için “*Gating*” kümeleme adı verilen sistem oluşturuldu. Veriler bu şekilde kaydedildi.

4.3.2 Periferal Kan Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin Ayırt Edilmesi

- Bölüm 4.2.2’de anlatılan aşamalardan sonra 4. pasajlamada olabildiğince saf MKH’ler elde edilmişti ancak hala homojen bir hücre popülasyonu değildi. Elimizdeki hücrelerin saf MKH olduğundan emin olabilmek için akım sitometrisi yöntemi uygulandı. Mezenkimal kök hücrelere özgü floresan işaretli hücre yüzey belirteçleri seçildi (APC CD45(-) / PE CD34(-) ve PerCP CD105(+) / FITC CD73(+)).

Akım sitometrisi yöntemi ile MKH’lerin seçilmesi “*SONY Cell Sorter SH800Z*” cihazıyla yapıldı. Sonuçlar FCS “*Flow Cytometry Standard*” dosyası olarak kaydedildi.

Akım sitometrisinin analiz aşamasında sağlıklı sonuçlar elde edebilmek için çıkan grafik sonuçlarından canlı olduğunu düşündüğümüz, debris olmayan hücreler için “*Gating*” kümeleme adı verilen sistem kandan elde edilen MKH’ler içinde gerçekleştirildi.

4.4 ÖRNEKLERİN SAFLIK VE KONSANTRASYON ÖLÇÜMÜ

Preeklampsi ve kontrol grubuna ait 28 örneğin kültür ve mezenkimal kök hücre ayrımı “*Flow Cytometry*” ile gerçekleştirildikten sonra total RNA izolasyonu yapıldı. İzolasyon için “*Nucleospin miRNA Kit*” kullanıldı ve bölüm 3.4.1’de anlatılan prosedür uygulandı. Örneklerin saflık ve konsantrasyon değerleri “*NanoDrop IMPLEN P-Class*” spektrofotometresi kullanılarak elde edildi. Örneklere ait veriler Tablo 4.2 ve Tablo 4.3’te gösterildi.

Tablo 4.2: MKH’lerden elde edilen RNA’ların kalitesi ve miktar tayini. PE: Preeklampsi hastasına ait.

PREEKLAMPSİ				
	PLASENTA		KAN	
Örnek No	ng/μl	A260/280	ng/μl	A260/280
PE 1	379,9	2,07		
PE 2	387,6	2,09	419,4	2,11
PE 3	399,5	2,11	430,7	2,09
PE 4	193,1	2,07		
PE 5	431,6	2,12	373,9	2,11
PE 6	377,6	2,09	312,8	2,13
PE 7	1573,9	2,10	465,2	2,06

Tablo 4.3: MKH'lerden elde edilen RNA'ların kalitesi ve miktar tayini. K: Kontrol grubuna ait.

KONTROL				
	PLASENTA		KAN	
Örnek No	ng/μl	A260/280	ng/μl	A260/280
K 1	1168,1	2,1	121	2,13
K 2	1663,1	2,1	907,8	2,14
K 3	614,1	2,11	216,3	2,12
K 4	395,5	2,09	309	2,14
K 5	251,4	2,06		
K 6	1414,1	2,12	268,8	2,11
K 7	2545,5	2,10	711,8	2,11

4.5 GEN ANLATIM ANALİZİ

Preeklampsi ve kontrol grubuna ait toplam 28 örneğin anlatım farklılığı analizinde hem plasenta hemde kanda izole edilen total RNA’larda Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü A (VEGF(A)), Metallopeptidaz İnhibitör 1 (TIMP-1), Efrin A3 (EFNA3), Trombospondin Tip 1 7A (THSD7A) ve normalizasyon için GAPDH genleri hedef alındı. Her bir gen için kendisine özel primer tasarlandı ve normalizasyon için GAPDH kullanıldı. “Bio-Rad’s QX200 Droplet Reader” ile örneklerin kopya/ µl değerleri otomatik olarak belirlendikten sonra istatistiksel analiz aşamasında “Graphpad Prism Version 8.3.0” kullanıldı. Parametrik olmayan “Mann Whitney Test” ile sonuçlarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı analiz edildi. Analizler sonucunda “p” değeri 0,05’ten az olan sonuçlar anlamlı bir farklılık bulundu olarak kabul edildi. Özgüllük ve duyarlılık için ROC (“Reciever Operating Characteristic”) analizi yapıldı.

4.5.1 Plasenta Desidua Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerde Gen Anlatım Analizi

7 preeklampsi hastası ve 7 kontrol grubuna ait toplam 14 örneğin plasenta desiduasından elde edilen total RNA’lardan gen anlatım analizi ddPZR ile yapıldı. Bakılan 4 gen içerisinde kontrol ve hasta grubu için artış oranları aşağıda belirtilmiştir;

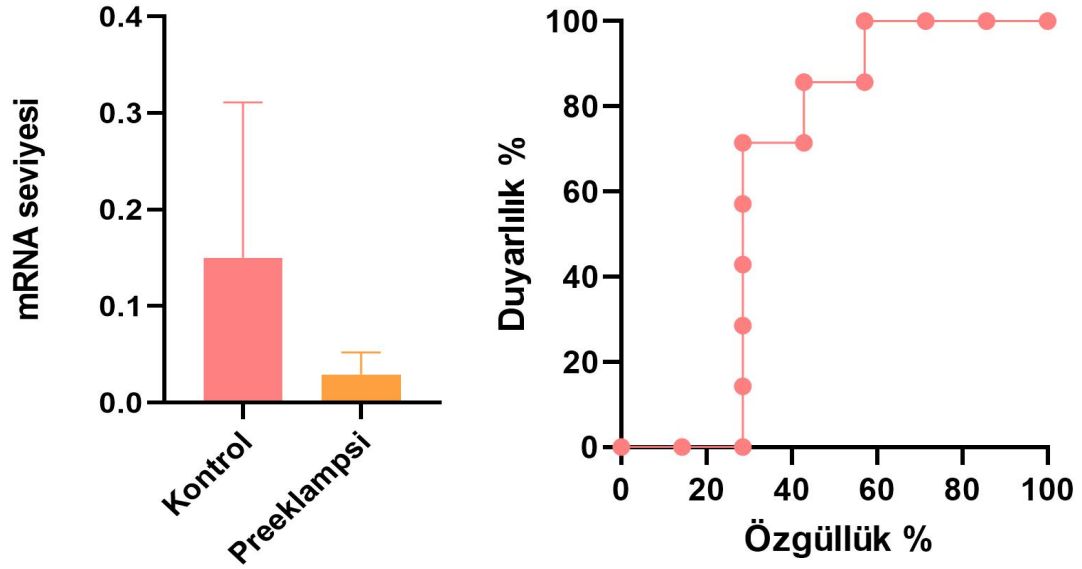
- VEGF(A): Hastada kontrole kıyasla 5,16 kat azalma gözlemlendi.
- TIMP-1:Hastada kontrole kıyasla 1,68 kat azalma gözlemlendi.
- EFNA3:Hastada kontrole kıyasla 1,57 kat azalma gözlemlendi.
- THSD7A: Hastada kontrole kıyasla 2,56 kat artış gözlemlendi.
- GAPDH: Normalizasyon.

Tüm genler için uygulanan “Mann Whitney Test” sonucunda “p” değeri 0,05’ten az olan sonuçlar anlamlı kabul edildiğinden plasenta grubundaki gen analizlerinde sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: Plasenta desidua kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde gen anlatım analizinin istatistiksel sonuçları.

	<i>“Mann Whitney Test”</i>	ROC ANALİZİ			
Gen	<i>“p”</i> Değeri	AUC	Standart Sapma	<i>“p”</i> Değeri	%95 Güven Aralığı
VEGF(A)	0,38	0,65	0,16	0,33	0,32-0,98
TIMP-1	0,38	0,65	0,15	0,33	0,34-0,95
EFNA3	>0,99	0,51	0,17	0,94	0,17-0,84
THSD7A	>0,99	0,51	0,17	0,94	0,16-0,85

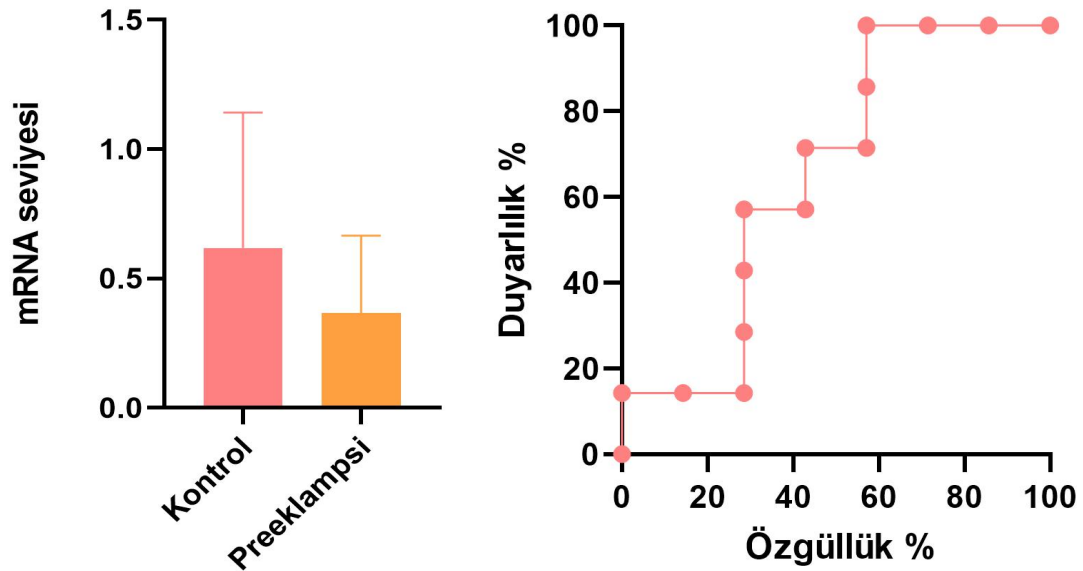
VEGF(A) PLASENTA



Duyarlılık: %58,21 / Özgüllük: %58,24

Şekil 4.4: VEGF(A)'nın rölatif mRNA anlatım analizi ve ROC eğrisi.

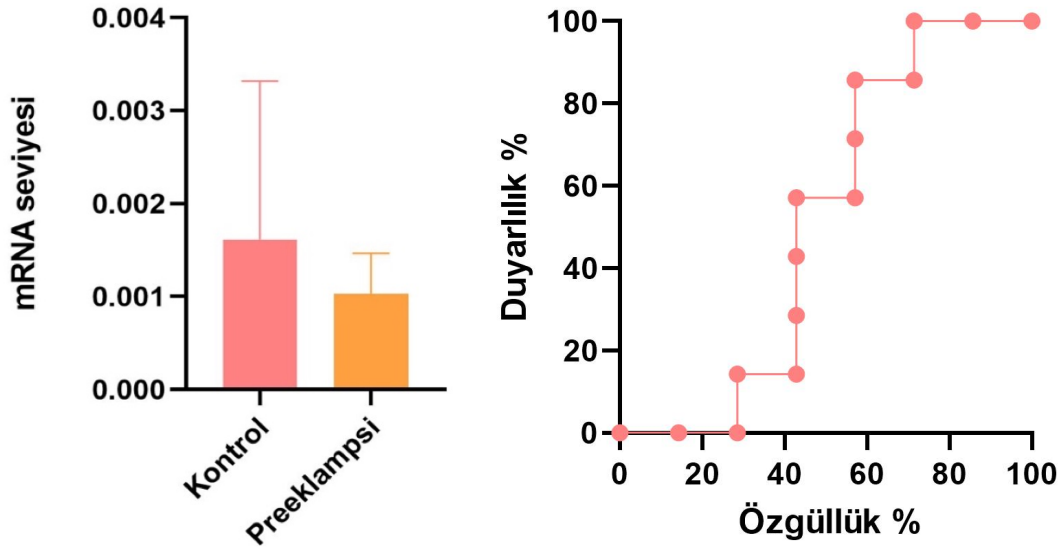
TIMP-1 PLASENTA



Duyarlılık: %58,24 / Özgüllük: %58,24

Şekil 4.5: TIMP-1'in rölatif mRNA anlatım analizi ve ROC eğrisi

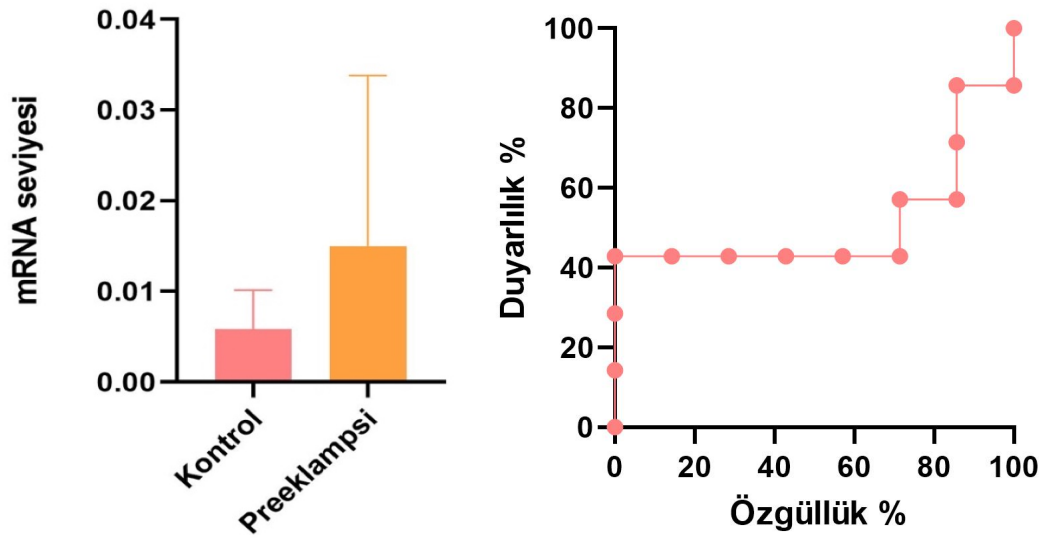
EFNA3 PLASENTA



Duyarlılık: %50,54 / Özgüllük: %50,54

Şekil 4.6: EFNA3'ün rölâtif mRNA anlatım analizi ve ROC eğrisi.

THSD7A PLASENTA



Duyarlılık: %50,55 / Özgüllük: %50,55

Şekil 4.7: THSD7A'nın rölâtif mRNA anlatım analizi ve ROC eğrisi.

4.5.2 Periferik Kan Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerde Gen Anlatım Analizi

7 preeklampsia hastası ve 7 kontrol grubuna ait toplam 14 periferik kan örneğinden elde edilen total RNA'lerden gen anlatım analizi ddPZR ile yapıldı. Bakılan 4 gen içerisinde kontrol ve hasta grubu için artış oranları aşağıda belirtilmiştir;

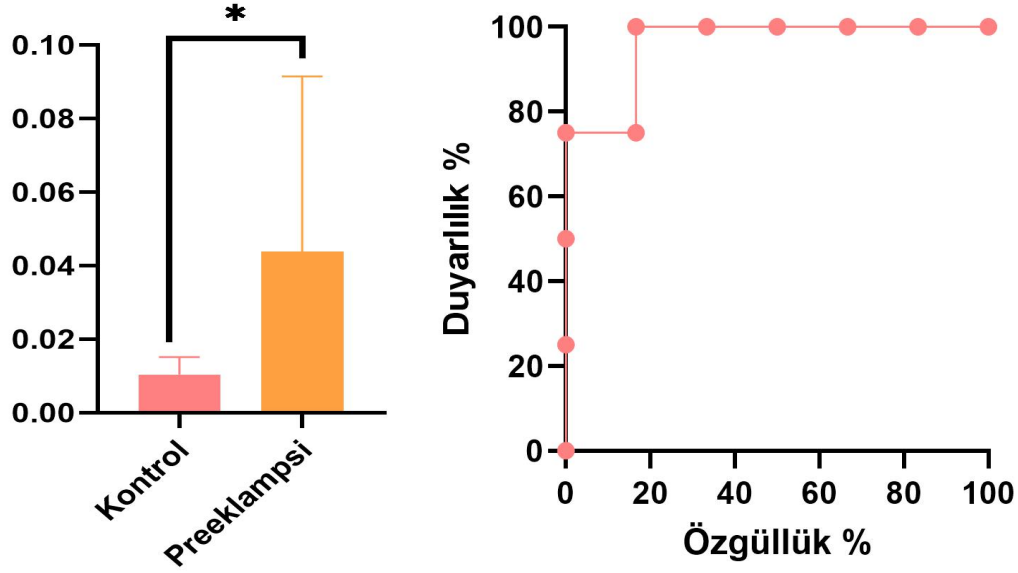
- VEGF(A): Hastada kontrole kıyasla 4,2 kat artış gözlemlendi.
- TIMP-1: Hastada kontrole kıyasla 2,4 kat azalma gözlemlendi.
- EFNA3: Hastada kontrole kıyasla 1,39 kat artış gözlemlendi.
- THSD7A: Hastada kontrole kıyasla 1,06 kat artış gözlemlendi.
- GAPDH: Normalizasyon.

Tüm genler için uygulanan “*Mann Whitney Test*” sonucunda “*p*” değeri 0,05'ten az olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildiğinden VEGF(A) geni periferik kan MKH'lerinde anlamlı olarak değerlendirildi ($p=0,0190$) (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Periferik kan kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde gen anlatım analizinin istatistiksel sonuçları.

	<i>“Mann Whitney Test”</i>	ROC ANALİZİ			
Gen	<i>“p”</i> Değeri	AUC	Standart Sapma	<i>“p”</i> Değeri	%95 Güven Aralığı
VEGF(A)	0,019	0,95	0,06	0,019	0,83-1,00
TIMP-1	>0,99	0,50	0,20	>0,99	0,09-0,90
EFNA3	0,79	0,56	0,19	0,71	0,18-0,94
THSD7A	0,93	0,53	0,18	0,85	0,17-0,89

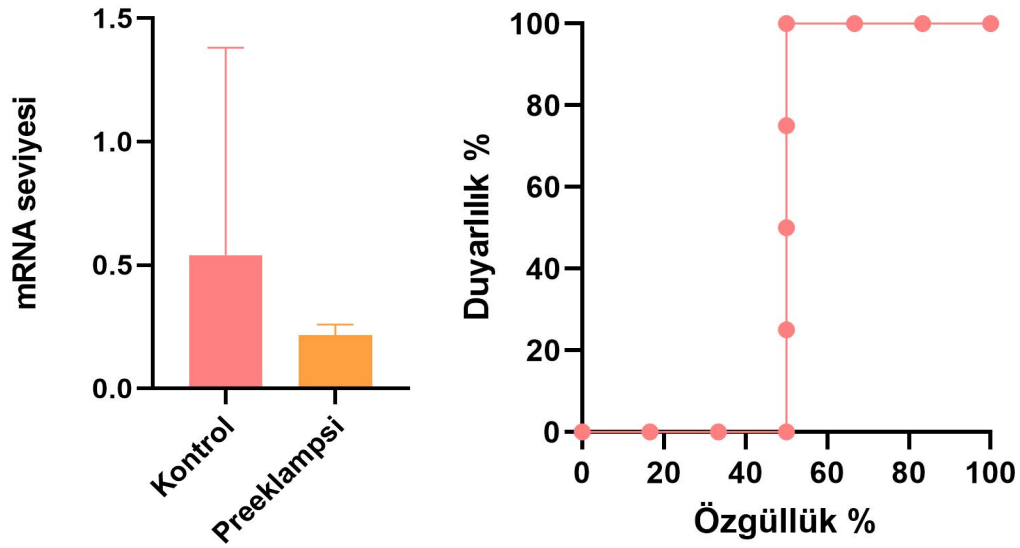
VEGF(A) KAN



Duyarlılık: %80,85 / Özgüllük: %70,37

Şekil 4.8: VEGF(A)'nın rölâtif mRNA anlatım analizi ve ROC eğrisi.

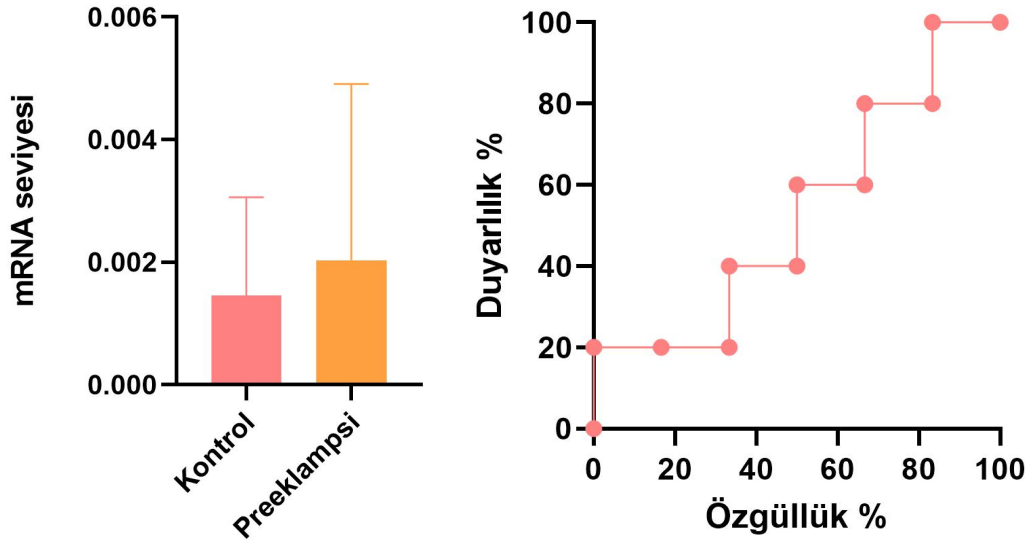
TIMP-1 KAN



Duyarlılık: %38,88 / Özgüllük: %48,14

Şekil 4.9: TIMP-1'in rölâtif mRNA anlatım analizi ve ROC eğrisi.

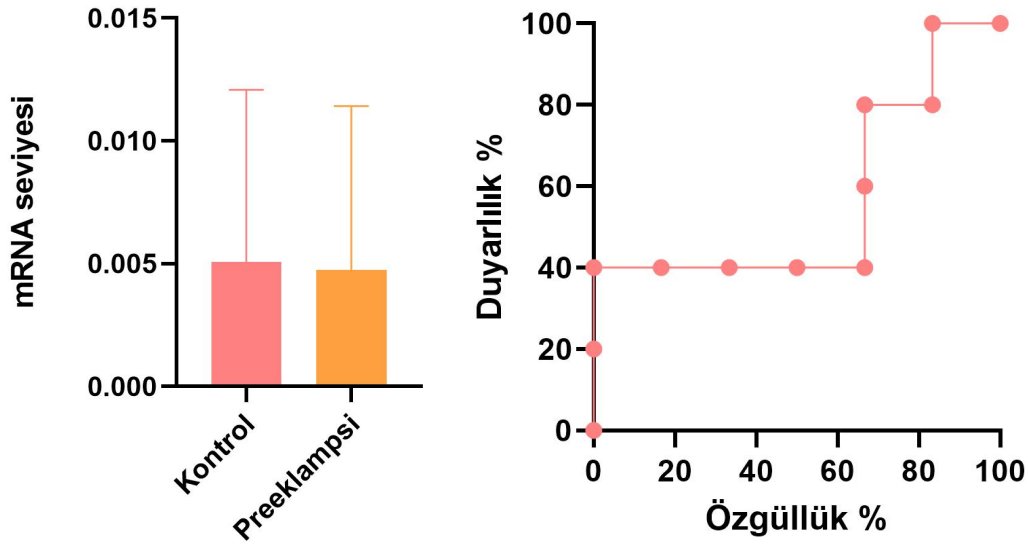
EFNA3 KAN



Duyarlılık: %52 / Özgüllük: %51,66

Şekil 4.10: EFNA3'ün rölâtif mRNA anlatım analizi ve ROC eğrisi.

THSD7A KAN



Duyarlılık: %54 / Özgüllük: %53,33

Şekil 4.11: THSD7A'nın rölâtif mRNA anlatım analizi ve ROC eğrisi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Preeklampsi (PE), 20 haftalık gebelikten sonra hipertansiyon ve proteinüri (idrarda yüksek protein seviyeleri) gelişimi ile karakterize, çok sistemli, gebeliğe özgü bir hastalıktır. Dünya çapında maternal, perinatal ve neonatal mortalite ve morbiditenin önde gelen nedenidir. Gelişmiş ülkelerde görülme sıklığının %10'a varabildiği, gebelik sürecini zorlaştıran önemli bir hastalıktır. PE plasental abrupsiyon, erken doğum, fetal intrauterin büyüme kısıtlaması, akut böbrek yetmezliği, serebrovasküler ve kardiyovasküler komplikasyonlar ve maternal ölüm riski ile ilişkilidir. Bu nedenler, PE'nin erken teşhisinin yapılabilmesinin hayati bir öneme sahip olduğunu gösterir (Grill ve diğ., 2009).

Klinik olarak, normotansif bir kadında 20 haftalık gebelikten sonra sırasıyla sistolik ve diyastolik kan basıncı okumalarının en az 6 saat arayla iki ayrı ölçümde ≥ 140 ve ≥ 90 mmHg olarak ortaya çıkması ve buna proteinürinin de eşlik etmesi ile PE tanısı koyulur (Sibai ve diğ., 2005). PE'nin patofizyolojisi tam olarak anlaşılmamış olsa da endotelial disfonksiyonun bir sonucu olarak plasental implantasyon problemleri ve trofoblastik invazyon seviyesi, bu bozukluğun gelişmesinde ve ilerlemesinde merkezi bir rol oynamaktadır. Endotel disfonksiyon, sinsityotrofoblast stres altında olduğunda ve plasental yatağın spiral arterlerini düzgün bir şekilde yeniden modifiye edemediğinde ortaya çıkar. Normal hamilelik sırasında, fetüsten elde edilen sitotrofoblastlar, küçük çaplı, yüksek dirençli arterlerin yüksek kapasiteli, düşük dirençli damarlara dönüştürüleceği şekilde maternal uterin spiral arterleri istila eder ve yeniden şekillendirir. Bu işlem anne kanının dağılımını optimize etmek ve gelişen uteroplasental bölgenin anne dolaşımından yeterli oksijen ve besin iletimine sahip olmasını sağlamak içindir (Reddy ve diğ., 2009). PE'nin iki aşamada geliştiği düşünülmektedir. İlk asemptomatik aşama plasental hipoksiye sebep olan ve oluşan oksidatif stresin plasentanın vasküler stabilitesini etkilemesine sebebiyet veren desiduada trofoblastlastik invazyonda bozulma olduğu düşünülmektedir. İkinci aşama olarak da bu gelişen hipoksik faktörlerin plasentadan maternal dolaşıma katılarak anjiyogenik, antianjiyogenik ve proinfalamtuar faktörlerin anormal anlatımına sebep olmasıdır. Bu da maternal endotelial disfonksiyon ile sonuçlanır (M ve diğ., 2018).

Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), osteositler, adipositler ve kondrositler de dahil olmak üzere çeşitli soylara farklılaşabilen multipotent hücrelerdir (Murray ve Péault, 2015). MKH'lerin plastiğe tutunma ve “in vitro” koşullar altında osteoblastlar, adipositler ve kondroblastlar halinde farklılaşma kabiliyetleri vardır. MKH'ler, her zaman büyük miktarlarda olmasa da, vücuttaki hemen hemen tüm yetişkin dokulardan izole edilebilir (Dominici ve diğ., 2006). Başlangıçta kemik iliğinde keşfedilen bu hücre kaynağı (Friedenstein ve diğ., 1987) aynı zamanda adipoz doku (Choudhery ve diğ., 2014), diş pulpası (Gronthos ve diğ., 2000), periferik kan (Tondreau ve diğ., 2005) ve doğumdan türetilen dokular (Gang ve diğ., 2004; Koike ve diğ., 2014) da dahil olmak üzere çeşitli kaynaklarda da tanımlanmıştır.

Uluslararası Hücresel Terapi Derneği'nin Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi, insan MKH'lerini tanımlamak için gerekli minimum kriterleri tanımlamışlardır. İlk olarak, MKH'ler standart kültür koşullarında saklandığında plastiğe yapışmalıdır. İkinci olarak CD105, CD73 ve CD90 hücre yüzey reseptörlerini ifade etmeli ve CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79α veya CD19 ve HLA-DR hücre yüzey reseptörlerinin ifadesini içermemelidir. Üçüncü olarak ise “in vitro” olarak osteoblastlara, adipositlere ve kondroblastlara farklılaşmalıdır (Dominici ve diğ., 2006).

MKH'ler doğumla ilişkili dokulardan elde edilebilir. İnvaziv prosedürler olmadan kolayca temin edilebilir ve kullanımı etik tartışmalara yol açmaz. Yetişkin MKH'ler ile kıyaslandığında kültür kabına yapışma ve benzer morfolojiye sahiptir. Plasenta kökenli MKH'ler kemik iliği MKH'leri ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir proliferatif kapasiteye sahip olduğu öne sürülmüştür (Barlow ve diğ., 2008). Bu özelliğin, gen ifadesini de etkileyen ‘ex vivo’ yaşlanma riskini azaltarak daha az pasajlama ile çok daha yoğun hücre elde etmeyi mümkün kıldığı düşünülmektedir. (Wagner ve diğ., 2009). Ayrıca, plasenta kökenli MKH'lerin daha fazla CD49d, CD10 ve CD56 anlatım seviyelerine sahip olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Mariotti ve diğ., 2008). Buna karşılık, “in vitro” göç hızlarını karşılaştırırken, kemik iliği MKH'lerinin plasenta kökenli MKH'lerden daha yüksek bir göç oranına sahip olduğunu gösteren araştırmalar da mevcuttur (Li ve diğ., 2009). Plasentanın farklı bölümlerinden alınan kök hücreleri tanımlayan raporlar yayımlanmıştır. Plasmal dokulardan izole edilen kök hücrelerin çoğu mezodermal kaynaklı hücrelerdir. Köken aldıkları tabakaya bağlı olarak amniyon mezenkimal kök hücreleri (aMKH'ler), koryon mezenkimal kök hücreleri

(kMKH'ler), koryonik villus mezenkimal kök hücreleri (kv-MKH'ler) ve desidua mezenkimal kök hücreleri (dMKH'ler) olarak adlandırılırlar. Yetişkin MKH eldesine kıyasla plasentadan MKH izolasyonu, elde etme kolaylığının yanında aynı zamanda daha homojen bir hücre popülasyonu sunduğu varsayılmaktadır (MacIas ve diğ., 2010).

Kemik iliği, mezenkimal kök hücrelerin temel kaynağı olarak kabul edilir, ancak klinik uygulamada birçok dezavantajı vardır. Bu yüzden alternatif bir kaynak olarak daha az invaziv yöntemlerle elde edilebilen periferik kandan MKH'leri izole edilmiştir (Fu ve diğ., 2014). Periferik kan kökenli mezenkimal kök hücreler de CD105, CD73 ve CD90 hücre yüzey reseptörlerini ifade ederler ve CD45, CD34, CD14, HLA DR'nin anlatımı açısından da negatiftirler (Jones ve diğ., 2002). Kemik iliği ve periferik kan MKH'lerinin akım sitometrisinde analizi gerçekleştirilmiş ve sonucunda benzer profilde yani CD44, CD105, CD73 anlatımında pozitif ve CD45, HLA-II ,CD14, CD34 anlatımında negatif veriler ortaya koymuştur (Tondreau ve diğ., 2005).

Tez kapsamında, PE patogenezi hakkında daha fazla bilgi edinmek, kök hücrelerdeki genlerin anlatım farklılığının hastalığın patogenezinde etkili olup olmadığı hakkında bilgi sahibi olmak hastalığın erken tanısına yönelik bir biyobelirteç bulmak amacıyla PE hastalarına ait örneklerle, kontrol grubu olarak seçilen sağlıklı gebelere ait örnekler karşılaştırılmıştır. Çalışma grubumuz 7 PE hastası ve 7 sağlıklı gebeden oluşmaktadır. PE hastalarına ait plasenta ve periferik kan örneği ile sağlıklı gruba ait plasenta ve periferik kan örneği olarak 28 örnekle çalışılmıştır.

Preeklampsi patogenezinde etkili olduğu düşünülen ve tez kapsamında anlatım analizleri MKH'lerde gerçekleştirilen “Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü A” (VEGF(A), “Metalloproteinaz İnhibitör 1 “(TIMP-1), “Efrin A3” (EFNA3), “Trombospondin Tip 1 7A” (THSD7A) genleri Gunel ve diğ., (2011), Gunel ve diğ., (2020) mikrodizin çalışmaları sonucunda aday olarak belirlenmeleri üzerine seçilmiştir.

Preeklampsi ve kontrol grubuna ait örnekler İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndan uzman doktorlarca elde edildikten sonra aynı gün, Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi Translasyonel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi (KUTTAM)'a transfer edilerek hücre kültürü çalışması başlatılmıştır. Kültürleme işlemi 4-5

pasaj sonunda kültürde gereken hücre yoğunluğuna ulaştıktan sonra saf MKH'lerin ayırt edilmesi için akım sitometrisi aşamasına geçilmiştir. MKH'lere özgü floresan işaretli hücre yüzey belirteçleri kullanılmıştır (APC CD45(-) / PE CD34(-), PerCP CD105(+) / FITC CD73(+). Ayırımı yapılan MKH'lerden total RNA ve cDNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Kalite ve uygunluğu yeterli görülen RNA'lar ile anlatım analizleri belirlenmek üzere VEGF(A), TIMP-1, EFNA3, THSD7A genlerinin ddPZR ile miktarları ölçülmüştür.

Plasenta desidua dokusunda yapılan ddPZR sonuçlarının analizi için “*Graphpad Prism Version 8.3.0*” kullanılmıştır ve parametrik olmayan “*Mann Whitney Test*” ile sonuçlarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı analiz edilmiştir. Özgüllük ve duyarlılık için ROC (“*Reciever Operating Characteristic*”) analiz yöntemi kullanılmıştır. Analizler doğrultusunda VEGF(A) ($p=0,38$, AUC=0,65), TIMP-1 ($p=0,38$, AUC=0,65), EFNA3 ($p>0,99$, AUC=0,51) ve THSD7A ($p>0,99$, AUC= 0,51) istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Periferik kan kökenli MKH'lerin akım sitometrisi aşamasında yaşanan aksaklıklardan ötürü 2 PE hastası ile 1 sağlıklı gebenin örnekleri çalışılamamıştır. Aynı istatistiksel analizler periferik kan örnekleri için de uygulanmıştır. Analizlerin sonucunda TIMP-1 ($p>0,99$, AUC=0,50), EFNA3 ($p=0,79$, AUC= 0,56) ve THSD7A ($p=0,93$, AUC= 0,53) istatistiksel olarak anlamlı bulunmamışken VEGF(A) ($p=0,019$, AUC: 0,95,) anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

İnsan VEGF(A) geni 6.kromozomun 6p12-p21.1 bölgesinde konumlanmıştır (Mattei ve diğ., 1996). VEGF(A) endotel hücrelerde birçok fonksiyona aracılık eder. Anjiyogenezi teşvik eder, vasküler endotel hücrelerin büyümesini indükler, PI3-kinaz / Akt sinyal iletim yolu boyunca Flk1 reseptörü aracılığıyla apoptozu azaltır ve vasküler geçirgenliği artırır (Dvorak ve diğ., 1995; Gerber ve diğ., 1998). VEGF(A), endotel türevi nitrik oksit yoluyla vazodilatasyonu teşvik eder. (Semenza, 2002). Hipoksik koşullar altında HIF-1 ve HIF-2 gibi hipoksiyle indüklenir faktörlerin ortama (HIF) salınması, VEGF(A)'nın anlatımı için güçlü bir uyarıcıdır.

VEGF(A) anlatımını uyarıcı potansiyel düzenleyicileri belirlemek amacıyla insan keratinosit hücrelerinde yapılan bir çalışmada fibroblast büyüme faktörü (FGF), transformatör büyüme faktörleri ($TGF-\alpha$ ve $TGF-\beta$), keratinosit büyüme faktörü (KGF), insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1, trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) gibi çeşitli büyüme faktörleri ve

enflamatuvar sitokinler, interlökin-1 α (IL-1 α) ve IL-6'nın VEGF(A) anlatımını arttırdığını göstermişlerdir (Ferrara ve Davis-Smyth, 1997).

Normal bir gebelik boyunca, vasküler sağlık VEGF-A ve TGF- β 1'in endotelial hücrelerdeki ilgili membran reseptörlerine bağlanmasıyla korunur. PE'de VEGF-A ve TGF- β 1 yolları, çözünür proteinler olan sFlt1 ve sEng ile antagonize edilir. Bu anti-anjiyojenik çözünür faktörler plasental aşırı salgılamının bir ürünüdür ve lokal ve sistemik endotelial disfonksiyona neden olur (Ali, Khaliq, Zaki, Ahmad, & Lone, 2019). Sağlıklı bir hamilelikte plasental sitotrofoblast hücreleri uterus duvarını istila eder ve yüksek dirençli uterus spiral arterleri ve arteriollerini düşük dirençli bir vasküler yatak oluşturur. Bu anjiyogenik yeniden şekillenme preeklampsili kadınlarda anormaldir ve plasental iskemi gelişir. Oluşan hipoksik ortam VEGF(A)'nın anlatımını indükler (Demir ve diğ., 2007).

VEGF(A)'nın plazma veya serum konsantrasyonunun tahmini ve hipertansif bozukluklarla komplike olan gebeliklerin plasenta dokusundaki anlatımı, olası terapötik sonuçları nedeniyle son dönemde aktif bir araştırmanın konusu olmuştur. Fakat sonuçlar çelişkili ve tartışmaya açık kalmaktadır (Agarwal ve diğ., 2019b).

Plasenta dokusundan, preeklampsisi dahil olmak üzere gebeliğe özgü rahatsızlıkları olan hasta grupları ile kontrol grubu arasında VEGF(A), Flt1 gen anlatım analizi çalışması yapılmıştır. Preeklampstik hastaların plasentasında kontrole kıyasla VEGF(A) (p=0.006) ve Flt1(p=0.02) anlatım seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı azalma bulmuşlardır. (Andraweera ve diğ., 2012).

Zhao ve diğ. (2014) 5 preeklampsisi hastası ve 5 sağlıklı kontrol grubu arasında plasenta desidua mezenkimal kök hücrelerinde miRNA anlatım profillerini incelemiştir. Analizler sonucunda anjiyogenez ve hücre proliferasyonu ile ilişkili yollarda düzenleyici olarak buldukları miRNA'ların olası hedef genleri arasında VEGF(A) genini doğrulamışlardır. Bu miRNA'ların preeklampsisi patofizyolojisinde anahtar rolü olan VEGF(A) geninin anlatımını baskılayarak hipoksi oluşumunu tetiklediğini göstermişlerdir. Preeklampstik desidua MKH'lerinde VEGF(A) anlatımında azalma olduğunu bildirmişlerdir. (G. Zhao ve diğ., 2014).

Gunel ve diğ. (2020) maternal plazma ve plasentada, preeklampsideki etkili genlerin düzenlemeleri ile ilgili miRNA anlatım analizi çalışması gerçekleştirmişlerdir. Mir-195'in preeklampside bozulmuş hücresel proliferasyon, kusurlu spiral arter yeniden şekillenmesine neden olan yetersiz trofoblastik invazyon ve apoptoz gibi anormal plasental büyüme mekanizmaları ile ilişkisini vurgulamış ve biyoinformatik veri tabanlarındaki analizler sonucunda VEGF(A)'yı hedef gen olarak göstermişlerdir. MiR-195 anlatımındaki düzensizliğin, trofoblastik hücrelerde hedeflenen genlerin fizyolojik rolünü yok ederek trofoblast proliferasyonunu azalttığını ve preeklampsi oluşumunda etkili olduğunu bildirmişlerdir (Gunel ve diğ., 2020).

Cooper ve diğ. (1996) PE hastaları ile sağlıklı gebelerin plasenta biyopsilerini elde etmiş ve PE kadınlarında VEGF(A)mRNA düzeylerinin kontrol kadınlarına göre anlamlı derecede düşük olduğunu bulmuşlardır ($p < 0,023$) (Cooper ve diğ., 1996).

Preeklampitik plasenta kökenli MKH'lerdeki anormalliklerin preeklampsi patogenezinde etkisi olup olmadığını anlamaya yönelik koryonik villöz dokudan türetilen plasental MKH'lerin sitokin anlatım profillerinde VEGF(A) ve sFlt1'i değerlendirilmiştir. 12 preeklampitik ve 12 kontrol grubu ile çalışılan bu araştırmada, plasental mezenkimal kök hücre sitokini olan VEGF(A)'nın sağlıklı gruptaki gen anlatımının normal koşullarda proanjiyogenik etkisini tanımlamışlardır. Preeklampitik koşulda ise plasenta MKH'lerinde sFlt1'in anlatımında artış olduğunu bildirmişlerdir. Preeklampsi oluşumundan kaynaklanan hipoksik ortamın indüklediği VEGF(A) plasental mRNA anlatımındaki artışın, oksidatif stres ile birlikte dolaşıma salınan antianjiyogenik faktör olan sFlt-1'in aşırı ekspresyonu ile antagonize edildiği tanımı doğrulamaktadır (Rolfo ve diğ., 2013).

Bu tez çalışmasında plasenta dokusu MKH'lerinde, VEGF(A) geninin kök hücre düzeyindeki anlatımı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış olsa da hastada kontrole kıyasla 5,16 kat azalma göstermiştir. Bu sonuç, spiral arterlerin yetersiz düzenlenmesi sonucu gelişen hipoksik ortamda, anlatımı yapılan HIF-1 α 'nın VEGF(A) anlatımını indüklediğini ancak oksidatif stres artışıyla paralel olarak dolaşıma salınan antianjiyogenik faktörlerden sFlt1'in, VEGF(A)'yı bağlayarak serbest haldeki konsantrasyonunu azalttığını desteklemektedir.

Bussche ve diğ., (2014) at periferel kanından türetilmiş mezenkimal kök hücrelerin (PK-MKH'lerin) anjiyogenik uyarıcı faktörlerin varlığını incelemek ve anjiyogeneze bağlı endotelial hücre üzerindeki “in vitro” etkilerini, proliferasyonunu ve damar oluşumunu değerlendirmek için bir çalışma yapmıştır. At PK-MKH'lerden salınan parakrin anjiyogenik faktörler (ET1, IL-8, PDGF-AA, IGFBP2, VEGF-A) endotel hücrelerin hücrel zarında bulunan reseptörlerine bağlandıktan sonra, endotel hücre VEGF-A salgılanmasını artırır. Bu anlatımı artan VEGF-A'nın, otokrin ve parakrin sinyali yoluyla anjiyogenezi daha da arttırdığı gösterilmiştir (Bussche ve diğ., 2014).

Tez kapsamında periferel kandan elde edilen MKH'lerde anlatımı yapılan VEGF(A) geninde, hastada kontrole kıyasla 4,2 kat artış gözlemlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu sonuç, MKH'lerin stres altında, preeklampsia patogeneğinde ikinci aşama olan maternal sendrom yani endotel disfonksiyon oluşumu ile birlikte hasarlı bölgeyi tamir etmek üzere daha fazla VEGF(A) gen anlatımı yapabileceği yorumunu öne çıkarır. Ancak yapılan araştırma literatüre kazandırılacak olan ilk çalışmalardan biri olduğu için MKH'lerin hemde preeklampsia moleküler mekanizmasının daha iyi anlaşılması için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

Matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9), hücre dışı matriksi parçalayabilen, trofoblast hücreleri tarafından salgılanan tek etkili hidrolazdır (Jaiswar ve diğ., 2011). Hücre dışı matriks yeniden şekillenmesi ve yapısal spiral arter transformasyonu ile plasental anjiyogeneze süreçlerinde yer almaktadır (Maged ve diğ., 2017). TIMP-1, MMP-9'a karşılık gelen bir doku inhibitör faktördür ve normal olarak MMP-9 salgılayan aynı tür hücreler tarafından salgılanır. Genellikle MMP-9'un aktif olmayan (zimojen) formu ile birleşir, böylece zimojenin aktivasyonu önlenir ve MMP-9'un kolajeni parçalamak için aktivitesi engellenir. Böylelikle MMP9/TIMP-1 dengesi sağlanır (Sun ve diğ., 2016). TIMP-1 ve MMP-9 genlerinde preeklampsia hastaları ile sağlıklı kontrol grubu arasında anlatımlarında bir farklılık olup olmadığı araştırılmıştır. MMP-9 anlatımının azaldığı ancak doku inhibitör TIMP-1'in karşılık gelen bir değişikliği olmadığı ve ikisi arasındaki denge durumunun değiştiği gözlenmiştir. MMP-9 ve TIMP-1'in ifadesi ve oranı preeklampsinin ortaya çıkışı ve hastalığın gelişimi ile ilgili olduğu varsayılmaktadır. Bu da hücrelerin aşındırıcı fonksiyonunu etkileyip devamında plasentalın sık implantasyonuna ve ardından plasental iskemi ve hipoksi ile sonuçlanabileceği düşünülmüştür (Zhang ve diğ., 2019).

MMP'ler ile TIMP'ler (doğal doku inhibitörleri) arasındaki dengenin, sağlıklı gebelik sırasında normal yapısal uterus değişikliklerinde önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir. MMP'ler ve TIMP'ler arasındaki dengenin bozulmasının uterus yapısında patolojik değişikliklere neden olabileceğini ve preeklampside umut verici bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği Nikolov ve diğ., (2020) tarafından açıklanmıştır.

Preeklampsinin patogenezinde yer alan 47 biyobelirteci preeklampitik gebeler ile sağlıklı kontrol grubu arasında karşılaştırılmıştır. Bu biyolojik belirteçler, 5623 kadından 14 ila 16 haftalık gebelikte plazmadan ölçülmüştür. TIMP'ler dikkate alındığında preeklampitik gebelerde kontrole kıyasla daha yüksek TIMP-1 seviyeleri bildirilmiştir ($p = 0.01$) (Kenny ve diğ., 2014). Tez kapsamında TIMP-1'in plasenta desidua MKH'lerindeki gen anlatımı kontrole kıyasla 1,68 azalma göstermiştir. Matriks yıkımından sorumlu MMP'lere karşı bir doku inhibitör olan TIMP-1 plasantasyon sırasında blastosistin endometriyuma gömülmesini sınırlandıran ve uterustaki aşındırmayı olumsuz etkileyen bir faktör olarak ve MMP'ler ile birlikte daha kapsamlı çalışmaları yapılabilir ve oransal farklılıklar değerlendirilerek preeklampsisi patogenezinin katkı sağlanabilir.

Myers ve arkadaşlarının 2005'te yapılan bir çalışmada, klinik hastalığın başlangıcından önce preeklampsisi geliştirmesi beklenen kadınların plazmasında MMP-2 ve MMP-9 seviyelerini ve metalloproteinazların TIMP-1 ve TIMP-2 doku inhibitörlerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Plazma MMP-2 seviyesi preeklampsisi grubunda 22. haftada anlamlı olarak yükselmiş ($p=0.02$) ve TIMP-1 seviyesinde 26. haftada anlamlı olarak azalmıştır ($p=0.0002$). Oluşan bu oransal dengesizliğin preeklampsinin patofizyolojisinin merkezinde olan endotel disfonksiyonuna katkıda bulunabileceğini belirtmişlerdir. Tez kapsamında periferik kan kökenli MKH'lerden analizi yapılan TIMP-1 geni istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da literatüre paralel olarak hastada kontrole kıyasla 2,4 kat azalma göstermiştir (Myers ve diğ., 2005).

Zhang ve diğ., (2012), EFNA3 geninin miR-210 tarafından anlatımının düzenlendiğini ve embriyogenez sırasında gelişim, hücre göçü, vasküler yeniden modellenme gibi farklı biyolojik fonksiyonlarda yer aldığını belirtmişlerdir. EFNA3 hedef geninin PE hastalarında sağlıklı gebelere kıyasla plasental anlatımının azaldığını gösterilmişlerdir (Zhang ve diğ., 2012). Bir başka EFNA3 hedef geni çalışmasında da gösterilmiştir ki, trofoblast hücrelerinde oluşan

hipoksi, miR-210 anlatımında artışa sebep olmaktadır ve bu da proliferasyonu ve hücre göçünü baskılar. (Apicella ve diğ., 2019). Tez çalışmasında plasenta desidua MKH'lerinde anlatımı bakılan EFNA3 geni istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış olsa da literatüre paralel olarak hastada kontrole kıyasla 1,57 azalma göstermiştir. Periferal kan kökenli MKH'lerden analizi yapılan EFNA3 geninde ise hastada kontrole kıyasla 1,39 kat artış gözlemlenmiştir. Ancak literatür desteğinde eksik kaldığı için daha fazla araştırma ile daha net sonuç ve yargılara varılabilir.

THSD7A, gelişme sırasında endotel göçünü ve vasküler modellenmeyi etkilediği bilinen bir endotel proteindir. Plasenta damarlanmasında ve insan göbek kordonu veni endotel hücrelerinde anlatımı gözlemlenmiştir (C.H. Wang ve diğ., 2009). Preeklampsi hastalığının patogenezi aydınlatmaya yönelik THSD7A geni ile yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Biyoinformatik analizlere bakarak bir miRNA ve hedef gen çalışması yapılmıştır. miR-210'nun olası hedef geni olarak THSD7A gösterilmiştir. 13 preeklampsi gebe ve 22 sağlıklı gebenin plasenta dokusunda THSD7A geninin mRNA anlatım seviyeleri karşılaştırılmış olup qRT-PZR sonucu preeklampitik plasentadaki THSD7A mRNA anlatımının sağlıklı plasentadakine kıyasla daha düşük bulunmuştur (Luo ve diğ., 2016). Tez çalışmamızda plasenta desidua MKH'lerinden anlatımı bakılan THSD7A'nın hastada kontrole kıyasla 2,56 kat artış gösterdiği bulunmuştur. Plasentada elde edilen MKH'lerde tespit edilen bu artış, daha sonra gelişen preeklampside azalma olarak karşımıza çıkıyor olabilir. Periferal kandan elde edilen MKH'lerde yapılan analiz sonucunda ise hastada kontrole kıyasla 1,06 kat azalma gözlemlenmiştir. Periferal kanda elde edilen MKH'lerdeki azalma ise, maternal kaynaklı bir düzenleme ile azalma meydana getiriyor olabilir. Ek bilimsel çalışmalar ile gelecekte umut verici bir biyobelirteç olarak kullanılabilir.

Bu tezin özgünlüğü insan PK-MKH'lerinde gen anlatımı çalışmasının ilk kez yapılmış olmasıdır ve kök hücre düzeyinde genlerdeki anlatım farklılığını gözlemlemek amaçlanmıştır. Tez kapsamında alınan sonuçlar doğrultusunda preeklampitik gebeliklerdeki PK-MKH'lerinde VEGF(A) ($p=0,019$, AUC: 0,95,) preeklampsi hastalarında kontrole kıyasla 4,2 kat artış gözlemlenmiştir.

Pro-anjiogenik faktörlerden biri olan VEGF(A) hem fizyolojik hem de patolojik anjiogeneze (kansere) için önemli rol oynar. VEGF(A) fetal ve plasental gelişim için majör faktör olarak, çalışmamızda miktarının artmış olması plasental hipoksiye yanıt olarak VEGF(A) sisteminin aktive olması kaynaklıdır. Preeklampsik plasentada serbest miktardaki VEGF(A) miktarının artış gösterdiği ve endotel hücre hasarı sonucu vasküler fonksiyonun bozulduğu olası mekanizmadır.

Sonuç olarak VEGF, hem aday gen olarak PE hastalığının patofizyolojisini aydınlatılabilmek amacıyla hem de erken tanıya yönelik olası bir biyobelirteç olarak kullanılması güçlü bir gen olduğu bu çalışma ile doğrulanmıştır.



KAYNAKLAR

- Abalos, E., Cuesta, C., Grosso, A. L., Chou, D., ve Say, L., 2013, Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: A systematic review. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, Elsevier Ireland Ltd, 170(1), 1-7.
- Abumaree, M. H., Al Jumah, M. A., Kalionis, B., Jawdat, D., Al Khaldi, A., AlTalabani, A. A., ve Knawy, B. A., 2013, Phenotypic and Functional Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Chorionic Villi of Human Term Placenta. *Stem Cell Reviews and Reports*, 9(1), 16–31.
- Agarwal, R., Kumari, N., Kar, R., Chandra, N., Nimesh, A., Singh, A., ve Radhakrishnan, G., 2019, Evaluation of Placental VEGFA mRNA Expression in Preeclampsia: A Case Control Study, *Journal of Obstetrics and Gynecology of India*, 69(2), 142–148.
- Agarwal, R., Kumari, N., Kar, R., Chandra, N., Nimesh, A., Singh, A., ve Radhakrishnan, G., 2019, Evaluation of Placental VEGFA mRNA Expression in Preeclampsia: A Case Control Study, *Journal of Obstetrics and Gynecology of India*, 69(2), 142–148.
- Aggarwal, P. K., Chandel, N., Jain, V., ve Jha, V., 2012, The relationship between circulating endothelin-1, soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endoglin in preeclampsia, *Journal of Human Hypertension*, 26(4), 236–241.
- Ahmad, S., ve Ahmed, A., 2004, Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia, *Circulation Research*, 95(9), 884–891.
- Akolekar, R., Minekawa, R., Veduta, A., Romero, X. C., ve Nicolaides, K. H., 2009, Maternal plasma inhibin A at 11-13 weeks of gestation in hypertensive disorders of pregnancy, *Prenatal Diagnosis*, 29(8), 753–760.
- Akolekar, R., Syngelaki, A., Beta, J., Kocylowski, R., ve Nicolaides, K. H., 2009, Maternal serum placental protein 13 at 13 weeks of gestation in preeclampsia, *Prenatal Diagnosis*, 29(12), 1103–1108.

- Akolekar, R., Syngelaki, A., Sarquis, R., Zvanca, M., ve Nicolaides, K. H., 2011, Prediction of early, intermediate and late pre-eclampsia from maternal factors, biophysical and biochemical markers at 11–13 weeks, *Prenatal Diagnosis*, 31(1), 66–74.
- Ali, Z., Khaliq, S., Zaki, S., Ahmad, H., ve Lone, K., 2019, Altered expression of vascular endothelial growth factor, vascular endothelial growth factor receptor-1, vascular endothelial growth factor receptor-2, and Soluble Fms-like Tyrosine Kinase-1 in peripheral blood mononuclear cells from normal and preeclamptic pregnancies, *Chinese Journal of Physiology*, 62(3), 117.
- Ander, S. E., Diamond, M. S., ve Coyne, C. B., 2019, Immune responses at the maternal-fetal interface, *Science Immunology*, American Association for the Advancement of Science, 4(31).
- Anderson, U. D., Olsson, M. G., Kristensen, K. H., Åkerström, B., ve Hansson, S. R., 2012, Review: Biochemical markers to predict preeclampsia, In *Placenta* , 33, 42–47.
- Anderson, Ulrik Dolberg, Gram, M., Ranstam, J., Thilaganathan, B., Åkerström, B., ve Hansson, S. R., 2016, Fetal hemoglobin, α 1-microglobulin and hemopexin are potential predictive first trimester biomarkers for preeclampsia, *Pregnancy Hypertension*, 6(2), 103–109.
- Anderson, Ulrik Dolberg, Olsson, M. G., Rutardttr, S., Centlow, M., Kristensen, K. H., Isberg, P. E., Hansson, S. R., 2011,. Fetal hemoglobin and α 1-microglobulin as first- and early second-trimester predictive biomarkers for preeclampsia, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 204(6), 520.e1-520.e5.
- Andraweera, P. H., Dekker, G. A., Laurence, J. A., ve Roberts, C. T., 2012, Placental expression of VEGF family mRNA in adverse pregnancy outcomes. *Placenta*, 33(6), 467–472.
- Apicella, C., Ruano, C. S. M., Méhats, C., Miralles, F., ve Vaiman, D., 2019, The Role of Epigenetics in Placental Development and the Etiology of Preeclampsia, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11), 2837.

- Arvanitis, D. N., ve Davy, A., 2012, Regulation and misregulation of Eph/ephrin expression, *Cell Adhesion and Migration*, Taylor and Francis Inc, 6(2), 131-137.
- Ayoubi., 2011, Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management, *Vascular Health and Risk Management*, 7, 467.
- Barlow, S., Brooke, G., Chatterjee, K., Price, G., Pelekanos, R., Rossetti, T., Atkinson, K., 2008, Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells, *Stem Cells and Development*, 17(6), 1095–1107.
- Barton, J. R., ve Sibai, B. M., 2008, Prediction and prevention of recurrent preeclampsia, *Obstetrics and Gynecology*, Obstet Gynecol, 112(2), 359- 372.
- Beattie, G. M., Otonkoski, T., Lopez, A. D., ve Alberto, H., 1997, Functional β -Cell Mass After Transplantation of Human Fetal Pancreatic Cells: Differentiation or Proliferation?, *Diabetes*, 46(2), 244–248.
- Benirschke, K., 1973, The human placenta, J. D. Boyd and W. J. Hamilton. Heffer, Cambridge, 365, 1970, *Teratology*, 8(1), 77–78.
- Blanpain, C., Lowry, W. E., Geoghegan, A., Polak, L., ve Fuchs, E., 2004, Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche, *Cell*, 118(5), 635–648.
- Braunthal, S., ve Brateanu, A., 2019, Hypertension in pregnancy: Pathophysiology and treatment, *SAGE Open Medicine*, 7, 205031211984370.
- Brosens, I., 1964, A Study Of The Spiral Arteries Of The Decidua Basalis In Normotensive And Hypertensive Pregnancies, *Bjog: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 71(2), 222–230.
- Brown, M. A., Hague, W. M., Higgins, J., Lowe, S., McCowan, L., Oats, J., Walters, B. N. J., 2000, The detection, investigation and management of hypertension in pregnancy: Full consensus statement, *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, Aust N Z J Obstet Gynaecol, 40(2), 139-155.

- Burton, G. J., Redman, C. W., Roberts, J. M., ve Moffett, A., 2019, Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications, *The BMJ*. BMJ Publishing Group, 366.
- Bussche, L., ve Van de Walle, G. R., 2014, Peripheral Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells Promote Angiogenesis via Paracrine Stimulation of Vascular Endothelial Growth Factor Secretion in the Equine Model, *STEM CELLS Translational Medicine*, 3(12), 1514–1525.
- Caplan, A. I., 1991, Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 9(5), 641–650.
- Castrechini, N. M., Murthi, P., Gude, N. M., Erwich, J. J. H. M., Gronthos, S., Zannettino, A., Kalionis, B., 2010, Mesenchymal stem cells in human placental chorionic villi reside in a vascular Niche, *Placenta*, 31(3), 203–212.
- Castrechini, N. M., Murthi, P., Qin, S., Kusuma, G. D., Wilton, L., Abumaree, M., Kalionis, B., 2012, Decidua parietalis-derived mesenchymal stromal cells reside in a vascular niche within the choriodecidua, *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 19(12), 1302–1314.
- Centlow, M., Carninci, P., Nemeth, K., Mezey, E., Brownstein, M., ve Hansson, S. R., 2008, Placental expression profiling in preeclampsia: local overproduction of hemoglobin may drive pathological changes, *Fertility and Sterility*, 90(5), 1834–1843.
- Chaiworapongsa, T., Romero, R., Espinoza, J., Bujold, E., Mee Kim, Y., Gonçalves, L. F., Edwin, S., 2004, Evidence supporting a role for blockade of the vascular endothelial growth factor system in the pathophysiology of preeclampsia, Young Investigator Award., In *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 190, 1541–1547.
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., ve Middleton, J., 2007, Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing, *Stem Cells*, 25(11), 2739–2749.
- Chappell, S., ve Morgan, L., 2006, Searching for genetic clues to the causes of pre-eclampsia, *Clinical Science*. Portland Press, 110(4), 443- 458.

- Chen, C.-Y., Liu, S.-H., Chen, C.-Y., Chen, P.-C., ve Chen, C.-P., 2015, Human Placenta-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Involved in Placental Angiogenesis via the PDGF-BB and STAT3 Pathways¹, *Biology of Reproduction*, 93(4).
- Choudhery, M. S., Badowski, M., Muise, A., Pierce, J., ve Harris, D. T., 2014, Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation, *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 1–14.
- Clark, D. E., Smith, S. K., He, Y., Day, K. A., Licence, D. R., Corps, A. N., Charnock-Jones, D. S., 1998, A Vascular Endothelial Growth Factor Antagonist Is Produced by the Human Placenta and Released into the Maternal Circulation¹, *Biology of Reproduction*, 59(6), 1540–1548.
- Cooper, J. C., Sharkey, A. M., Charnock-Jones, D. S., Palmer, C. R., ve Smith, S. K., 1996, VEGF mRNA levels in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia, *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 103(12), 1191–1196.
- Cross, J. C., Werb, Z., ve Fisher, S. J., 1994, Implantation and the placenta: Key pieces of the development puzzle, *Science*, American Association for the Advancement of Science, 1508- 1518.
- da Silva Meirelles, Lindolfo, ve diğ., 2009, "Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells", *Cytokine & growth factor reviews* 20.5-6 419-427.
- de la Torre, P., Jesús Pérez-Lorenzo, M., ve I. Flores, A., 2019, Human Placenta-Derived Mesenchymal Stromal Cells: A Review from Basic Research to Clinical Applications, In *Stromal Cells - Structure, Function, and Therapeutic Implications*. IntechOpen.
- Demir, R., Kaufmann, P., Castellucci, M., Erbeni, T., ve Kotowski, A., 1989, Fetal Vasculogenesis and Angiogenesis in Human Placental Villi. *Cells Tissues Organs*, 136(3), 190–203.
- Demir, Ramazan, Seval, Y., ve Huppertz, B., 2007, Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta, *Acta Histochemica*. Elsevier GmbH, 109(4), 257-265.

- Deng, Z.-L., Sharff, K. A., Tang, N., Song, W.-X., Luo, J., Luo, X., He, T.-C., 2001, *Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development*, *Frontiers in Bioscience*, 13(1), 2001-2021.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Horwitz, E. M., 2006, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells, The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, 8(4), 315–317.
- Duckitt, K., ve Harrington, D., 2005, Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: Systematic review of controlled studies, *British Medical Journal*, BMJ, 565.
- Duley, L., 2009, The Global Impact of Pre-eclampsia and Eclampsia, *Seminars in Perinatology*, Semin Perinatol, 33(3), 130-137.
- Dvorak, H. F., Brown, L. F., Detmar, M., ve Dvorak, A. M., 1995, Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis, *American Journal of Pathology*, American Society for Investigative Pathology, 146(5), 1029.
- Egusa, H., Sonoyama, W., Nishimura, M., Atsuta, I., ve Akiyama, K., 2012, Stem cells in dentistry – Part I: Stem cell sources, *Journal of Prosthodontic Research*, 56(3), 151–165.
- Enquobahrie, D. A., Meller, M., Rice, K., Psaty, B. M., Siscovick, D. S., ve Williams, M. A., 2008, Differential placental gene expression in preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 199(5), 566.e1-566.e11.
- Ferrara, N., ve Davis-Smyth, T., 1997, The biology of vascular endothelial growth factor, *Endocrine Reviews*, 18(1), 4–25.
- Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., ve Gerasimov, U. V., 1987, Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers, *Cell Proliferation*, 20(3), 263–272.

- Fu, W. L., Zhou, C. Y., ve Yu, J. K., 2014, A new source of mesenchymal stem cells for articular cartilage repair: MSCs derived from mobilized peripheral blood share similar biological characteristics in vitro and chondrogenesis in vivo as MSCs from bone marrow in a rabbit model, *American Journal of Sports Medicine*, 42(3), 592–601.
- Fuchi, N., Miura, K., Doi, H., Li, T. S., ve Masuzaki, H., 2017, Feasibility of placenta-derived mesenchymal stem cells as a tool for studying pregnancy-related disorders, *Scientific Reports*, 7(1), 1–11.
- Gang, E. J., Hong, S. H., Jeong, J. A., Hwang, S. H., Kim, S. W., Yang, I. H., Kim, H., 2004, In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 321(1), 102–108.
- Gao, X., Song, L., Shen, K., Wang, H., Niu, W., ve Qin, X., 2008, Transplantation of bone marrow derived cells promotes pancreatic islet repair in diabetic mice, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371(1), 132–137.
- Gerber, H. P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B. A., Dixit, V., ve Ferrara, N., 1998, Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway: Requirement for Flk-1/KDR activation, *Journal of Biological Chemistry*, 273(46), 30336–30343.
- Gimble, J. M., Katz, A. J., ve Bunnell, B. A., 2007, Adipose-derived stem cells for regenerative medicine, *Circulation Research*, Lippincott Williams ve Wilkins, 100(9), 1249-1260.
- Gonen, R., Shahar, R., Grimpel, Y., Chefetz, I., Sammar, M., Meiri, H., ve Gibor, Y., 2008, Placental protein 13 as an early marker for pre-eclampsia: a prospective longitudinal study, *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 115(12), 1465–1472.
- Grill, S., Rusterholz, C., Zanetti-Dällenbach, R., Tercanli, S., Holzgreve, W., Hahn, S., ve Lapaire, O., 2009, Potential markers of preeclampsia - A review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, BioMed Central, 7(1), 1-14.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., ve Shi, S., 2000, Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13625–13630.

- Gude, N. M., Roberts, C. T., Kalionis, B., ve King, R. G., 2004, Growth and function of the normal human placenta, *Thrombosis Research*, 114(5-6), 397–407.
- Gunel, T., Zeybek, Y. G., Akçakaya, P., Kalelioğlu, I., Benian, A., Ermis, H., ve Aydınli, K., 2011, Serum microRNA expression in pregnancies with preeclampsia, *Genetics and Molecular Research*, 10(4), 4034–4040.
- Gunel, Tuba, Kamali, N., Hosseini, M. K., Gumusoglu, E., Benian, A., & Aydinli, K., 2020, Regulatory effect of miR-195 in the placental dysfunction of preeclampsia, *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 33(6), 901–908.
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., ve Jacobs, R., 2011, Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC, *Cell Communication and Signaling*, BioMed Central.
- Hertig, A. T., Rock, J., ve Adams, E. C., 1956, A description of 34 human ova within the first 17 days of development, *American Journal of Anatomy*, 98(3), 435–493.
- Hitzerd, E., Broekhuizen, M., Neuman, R. I., Colafella, K. M. M., Merkus, D., Schoenmakers, S., Danser, A. H. J., 2019, Human Placental Vascular Reactivity in Health and Disease: Implications for the Treatment of Pre-eclampsia, *Current Pharmaceutical Design*, 25(5), 505–527.
- Huang, Y. C., Yang, Z. M., Chen, X. H., Tan, M. Y., Wang, J., Li, X. Q., Deng, L., 2009, Isolation of Mesenchymal stem cells from human placental decidua basalis and resistance to hypoxia and serum deprivation, *Stem Cell Reviews and Reports*, 5(3), 247–255.
- Huppertz, B., 2008, Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis, *Hypertension*, 51(4), 970–975.
- Hwang, J. H., Lee, M. J., Seok, O. S., Paek, Y. C., Cho, G. J., Seol, H. J., Oh, M. J., 2010, Cytokine expression in placenta-derived mesenchymal stem cells in patients with pre-eclampsia and normal pregnancies, *Cytokine*, 49(1), 95–101.
- Imitola, J., 2007, Prospects for Neural Stem Cell-Based Therapies for Neurological Diseases, *Neurotherapeutics*, 4(4), 701–714.

- in 't Anker, P. S., Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., de Groot-Swings, G. M. J. S., Claas, F. H. J., Fibbe, W. E., ve Kanhai, H. H. H, 2004, Isolation of Mesenchymal Stem Cells of Fetal or Maternal Origin from Human Placenta, *Stem Cells*, 22(7), 1338–1345.
- Jaiswar, S. P., Amrit, G., Rekha, S., Natsu, S. N., ve Mohan, S., 2011, Lactic dehydrogenase: A biochemical marker for preeclampsia-eclampsia, *Journal of Obstetrics and Gynecology of India*, 61(6), 645–648.
- Johnson, M. P., Brennecke, S. P., East, C. E., Göring, H. H. H., Kent, J. W., Dyer, T. D., Moses, E. K., 2012, Genome-wide association scan identifies a risk locus for preeclampsia on 2q14, near the inhibin, beta B gene. *PLoS ONE*, 7(3).
- Jones, E. A., Kinsey, S. E., English, A., Jones, R. A., Straszynski, L., Meredith, D. M., McGonagle, D., 2002, Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells, *Arthritis and Rheumatism*, 46(12), 3349–3360.
- Julian, C. G., 2011, High Altitude During Pregnancy, *Clinics in Chest Medicine*, Clin Chest Med, 31(1), 21-31.
- Kaijomaa, M., Ulander, V.-M., Hämäläinen, E., Alfthan, H., Markkanen, H., Heinonen, S., ve Stefanovic, V., 2016, The risk of adverse pregnancy outcome among pregnancies with extremely low maternal PAPP-A, *Prenatal Diagnosis*, 36(12), 1115–1120.
- Kalousová, M., Muravská, A., ve Zima, T., 2014, Pregnancy-associated plasma protein a (papp-a) and preeclampsia, In *Advances in Clinical Chemistry*, 63, 169–209.
- Karumanchi, S. A., 2016, Angiogenic factors in preeclampsia: From diagnosis to therapy, *Hypertension*, 67(6), 1072–1079. 1
- Kassis, I., Zangi, L., Rivkin, R., Levdansky, L., Samuel, S., Marx, G., ve Gorodetsky, R., 2006, Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads, *Bone Marrow Transplantation*, 37(10), 967–976.

- Kaufmann, P., Black, S., ve Huppertz, B., 2003, Endovascular Trophoblast Invasion: Implications for the Pathogenesis of Intrauterine Growth Retardation and Preeclampsia, *Biology of Reproduction*, 69(1), 1–7.
- Kenny, L. C., Black, M. A., Poston, L., Taylor, R., Myers, J. E., Baker, P. N., North, R. A., 2014, Early pregnancy prediction of preeclampsia in nulliparous women, combining clinical risk and biomarkers: The Screening for Pregnancy Endpoints (SCOPE) international cohort study, *Hypertension*, 64(3), 644–652.
- Khalil, A., Cowans, N. J., Spencer, K., Goichman, S., Meiri, H., ve Harrington, K., 2010, First trimester markers for the prediction of pre-eclampsia in women with a priori high risk, *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 35(6).
- Kim, H. J., Kim, U. J., Vunjak-Novakovic, G., Min, B. H., ve Kaplan, D. L., 2005, Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells, *Biomaterials*, 26(21), 4442–4452.
- Klimanskaya, I., Chung, Y., Becker, S., Lu, S. J., ve Lanza, R., 2006, Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres, *Nature*, 444(7118), 481–485.
- Koike, C., Zhou, K., Takeda, Y., Fathy, M., Okabe, M., Yoshida, T., Nikaido, T., 2014, Characterization of Amniotic Stem Cells, *Cellular Reprogramming*, 16(4), 298–305.
- Kumar, S., ve Bandyopadhyay, U., 2005, Free heme toxicity and its detoxification systems in human, *Toxicology Letters*, Elsevier, 157(3), 175–188.
- Kusuma, G. D., Manuelpillai, U., Abumaree, M. H., Pertile, M. D., Brennecke, S. P., ve Kalionis, B., 2015, Mesenchymal stem cells reside in a vascular niche in the decidua basalis and are absent in remodelled spiral arterioles, *Placenta*, 36(3), 312–321.
- Leaños-Miranda, A., Navarro-Romero, C. S., Sillas-Pardo, L. J., Ramírez-Valenzuela, K. L., Isordia-Salas, I., ve Jiménez-Trejo, L. M., 2019, Soluble Endoglin As a Marker for Preeclampsia, Its Severity, and the Occurrence of Adverse Outcomes, *Hypertension*, 74(4), 991–997.

- Lerou, P., 2011, Embryonic stem cell derivation from human embryos, *Methods in Molecular Biology*, 767, 31–35.
- Levine, R. J., Lam, C., Qian, C., Yu, K. F., Maynard, S. E., Sachs, B. P., Karumanchi, S. A., 2006, Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia, *New England Journal of Medicine*, 355(10), 992–1005.
- Levine, R. J., Maynard, S. E., Qian, C., Lim, K.-H., England, L. J., Yu, K. F., contributed, K., 2004, Circulating Angiogenic Factors and the Risk of Preeclampsia, *N Engl J Med*.12, 350(7), 672-683.
- Li, G., Zhang, X., Wang, H., Wang, X., Meng, C., Chan, C., Kung, H., 2009, Comparative proteomic analysis of mesenchymal stem cells derived from human bone marrow, umbilical cord, and placenta: Implication in the migration, *PROTEOMICS*, 9(1), 20–30.
- Luo, R., Wang, Y., Xu, P., Cao, G., Zhao, Y., Shao, X., Wang, Y. L., 2016, Hypoxia-inducible miR-210 contributes to preeclampsia via targeting thrombospondin type I domain containing 7A, *Scientific Reports*, 6, 6(1), 1-11.
- Luria, E. A., Panasyuk, A. F., ve Friedenstien, A. Y., 1971, Fibroblast Colony Formation from Monolayer Cultures of Blood Cells, *Transfusion*, 11(6), 345–349.
- M, P., ve B, B., 2018, Clinical Presentation of Preeclampsia and the Diagnostic Value of Proteins and Their Methylation Products as Biomarkers in Pregnant Women With Preeclampsia and Their Newborns, *Journal of Pregnancy*, 2018.
- MacIas, M. I., Grande, J., Moreno, A., Domnguez, I., Bornstein, R., ve Flores, A. I., 2010, Isolation and characterization of true mesenchymal stem cells derived from human term decidua capable of multilineage differentiation into all 3 embryonic layers, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 203(5), 495.e9-495.e23.
- Maged, A. M., Aid, G., Bassiouny, N., Eldin, D. S., Dahab, S., ve Ghamry, N. K., 2017, Association of biochemical markers with the severity of pre-eclampsia, *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 136(2), 138–144.

- Majander, K. K., Villa, P. M., Kivinen, K., Kere, J., ve Laivuori, H., 2013, A follow-up linkage study of Finnish pre-eclampsia families identifies a new fetal susceptibility locus on chromosome 18, *European Journal of Human Genetics*, 21(9), 1024–1026.
- Mariotti, E., Mirabelli, P., Abate, G., Schiattarella, M., Martinelli, P., Fortunato, G., Vecchio, L. Del., 2008, Comparative Characteristics of Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow and Placenta: CD10, CD49d, and CD56 Make a Difference, *Stem Cells and Development*, 17(6), 1039–1042.
- Matsubara, K., 2017, Hypoxia in the pathogenesis of preeclampsia, *Hypertension Research in Pregnancy*, 5(2), 46–51.
- Mattei, M.-G., Borg, J.-P., Rosnet, O., Marmé, D., ve Birnbaum, D., 1996, Assignment of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Placenta Growth Factor (PlGF) Genes to Human Chromosome 6p12–p21 and 14q24–q31 Regions, Respectively. *Genomics*, 32(1), 168–169.
- May, K., Rosenlöf, L., Olsson, M. G., Centlow, M., Mörgelin, M., Larsson, I., Hansson, S. R., 2011, Perfusion of human placenta with hemoglobin introduces preeclampsia-like injuries that are prevented by α 1-microglobulin, *Placenta*, 32(4), 323–332.
- Maynard, S. E., Min, J. Y., Merchan, J., Lim, K. H., Li, J., Mondal, S., Karumanchi, S. A., 2003, Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction hypertension, and proteinuria in preeclampsia, *Journal of Clinical Investigation*, 111(5), 649–658.
- McGinnis, R., Steinthorsdottir, V., Williams, N. O., Thorleifsson, G., Shooter, S., Hjartardottir, S., Morgan, L., 2017, Variants in the fetal genome near FLT1 are associated with risk of preeclampsia, *Nature Genetics*, 49(8), 1255–1260.
- McKeeman, G. C., Ardill, J. E. S., Caldwell, C. M., Hunter, A. J., ve McClure, N., 2004, Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFlt-1) is increased throughout gestation in patients who have preeclampsia develop, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 191(4), 1240–1246.

- Meekins, J. W., Pijnenborg, R., Hanssens, M., MCFadyen, I. R., ve van Asshe, A., 1994, A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies, *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 101(8), 669–674.
- Miao, Z., Jin, J., Chen, L., Zhu, J., Huang, W., Zhao, J., Zhang, X., 2006, Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells, *Cell Biology International*, 30(9), 681–687.
- Mitchell, K. E., Weiss, M. L., Mitchell, B. M., Martin, P., Davis, D., Morales, L., Troyer, D., 2003, Matrix Cells from Wharton's Jelly Form Neurons and Glia, *STEM CELLS*, 21(1), 50–60.
- Moffett, A., ve Hiby, S. E., 2007, How Does the Maternal Immune System Contribute to the Development of Pre-eclampsia?, *Placenta*, 28, S51–S56.
- Murray, I. R., ve Péault, B., 2015, Q&A: Mesenchymal stem cells - where do they come from and is it important?, *BMC Biology*, 13(1), 99.
- Muttukrishna, S., Hyett, J., Paine, M., Moodley, J., Groome, N., ve Rodeck, C., 2006, Uterine vein and maternal urinary levels of activin A and inhibin A in pre-eclampsia patients, *Clinical Endocrinology*, 64(4), 469–473.
- Muttukrishna, S., Knight, P. G., Groome, N. P., Redman, C. W. G., ve Ledger, W. L., 1997, Activin A and inhibin A as possible endocrine markers for preeclampsia, *Lancet*, 349(9061), 1285–1288.
- Myers, J. E., Merchant, S. J., Macleod, M., Mires, G. J., Baker, P. N., ve Davidge, S. T., 2005, MMP-2 levels are elevated in the plasma of women who subsequently develop preeclampsia, *Hypertension in Pregnancy*, 24(2), 103–115.
- Nicolaides, K. H., Bindra, R., Turan, O. M., Chefetz, I., Sammar, M., Meiri, H., Cuckle, H. S., 2006, A novel approach to first-trimester screening for early pre-eclampsia combining serum PP-13 and Doppler ultrasound, *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 27(1), 13–17.

- Nikolov, A., Popovski, N., ve Hristova, I., 2020, Collagenases MMP-1, MMP-13, and Tissue Inhibitors TIMP-1, TIMP-2: Their Role in Healthy and Complicated Pregnancy and Potential as Preeclampsia Biomarkers—A Brief Review, *Applied Sciences*, 10(21), 7731.
- Nikuei, P., Rajaei, M., Malekzadeh, K., Nejatizadeh, A., Mohseni, F., ve Atashabparvar, A., 2017, Accuracy of soluble endoglin for diagnosis of preeclampsia and its severity, *Iranian Biomedical Journal*, 21(5), 312–320.
- Nuzzo, Anna Maria, ve diğ., 2014, "Anti-inflammatory and pro-angiogenic effects of placental mesenchymal stromal cells conditioned media on preeclamptic placental tissue.", *International Federation of Placenta Associations Meeting 2014*, 35 (9).
- Olsson, M. G., Allhorn, M., Bülow, L., Hansson, S. R., Ley, D., Olsson, M. L., Åkerström, B., 2012, Pathological conditions involving extracellular hemoglobin: Molecular mechanisms, clinical significance, and novel therapeutic opportunities for $\alpha 1$ -microglobulin, *Antioxidants and Redox Signaling*. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA , 17(5), 813-846.
- Olsson, M. G., Centlow, M., Rutardóttir, S., Stenfors, I., Larsson, J., Hosseini-Maaf, B., Åkerström, B., 2010, Increased levels of cell-free hemoglobin, oxidation markers, and the antioxidative heme scavenger $\alpha 1$ -microglobulin in preeclampsia, *Free Radical Biology and Medicine*, 48(2), 284–291.
- Pankajakshan, D., ve Agrawal, D. K., 2014, Mesenchymal Stem Cell Paracrine Factors in Vascular Repair and Regeneration, *Journal of Biomedical Technology and Research*, 1(1).
- Parekkadan, B., ve Milwid, J. M., 2010, Mesenchymal Stem Cells as Therapeutics, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 12(1), 87–117.
- Parham, P., 2004, NK cells and trophoblasts: Partners in pregnancy, *Journal of Experimental Medicine*, The Rockefeller University Press, 200(8), 951-955.
- Paul, J., 1958, Establishment of permanent cell strains from human adult peripheral blood, *Nature*, 182(4638), 808.

- Pemathilaka, R. L., Reynolds, D. E., ve Hashemi, N. N., 2019, Drug transport across the human placenta: Review of placenta-on-a-chip and previous approaches, *Interface Focus*, 9(5).
- Phipps, E. A., Thadhani, R., Benzing, T., ve Karumanchi, S. A., 2019, Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies, *Nature Reviews Nephrology*. Nature Publishing Group, 15(5), 275-289.
- Phipps, E., Prasanna, D., Brima, W., ve Jim, B., 2016, Preeclampsia: Updates in pathogenesis, definitions, and guidelines, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, American Society of Nephrology, 11(6), 1102- 1113.
- Poon, L. C. Y., Maiz, N., Valencia, C., Plasencia, W., ve Nicolaides, K. H., 2009, First-trimester maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A and pre-eclampsia, *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 33(1), 23–33.
- Reddy, A., Suri, S., Sargent, I. L., Redman, C. W. G., ve Muttukrishna, S., 2009, Maternal circulating levels of activin A, inhibin A, sFlt-1 and endoglin at parturition in normal pregnancy and pre-eclampsia, *PLoS ONE*, 4(2). e4453.
- Redman, C. W. G., Denson, K. W. E., Beilin, L. J., Bolton, F. G., ve Stirrat, G. M., 1977, Factor-Viii Consumption In Pre-Eclampsia, *The Lancet*, 310(8051), 1249–1252.
- Roberts, J. M., ve Hubel, C. A., 2009, The Two Stage Model of Preeclampsia: Variations on the Theme, *Placenta*, 30, 32–37.
- Roberts, James M., Taylor, R. N., Musci, T. J., Rodgers, G. M., Hubel, C. A., ve McLaughlin, M. K., 1989, Preeclampsia: An endothelial cell disorder, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 161(5), 1200–1204.
- Rogers, I., ve Casper, R. F., 2004, Umbilical cord blood stem cells, *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, Baillière Tindall, 18(6), 893-908.
- Rolfo, A., Giuffrida, D., Nuzzo, A. M., Pierobon, D., Cardaropoli, S., Piccoli, E., Todros, T., 2013, Pro-Inflammatory Profile of Preeclamptic Placental Mesenchymal Stromal Cells: New Insights into the Etiopathogenesis of Preeclampsia, *PLoS ONE*, 8(3), 91(4), 256-260.

- Ros, H. S., Lichtenstein, P., Lipworth, L., ve Cnattingius, S., 2000, Genetic effects on the liability of developing pre-eclampsia and gestational hypertension, *American Journal of Medical Genetics*, 91(4), 256–260.
- Segundo-Val, I. S., ve Sanz-Lozano, C. S., 2016, Introduction to the gene expression analysis, In *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc., 1434, 29–43.
- Semenza, G. L., 2002, Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1, *Biochemical Pharmacology*, 64(5–6), 993–998.
- Shembrey, M. A., ve Noble, A. D., 1995, Ail Instructive Case of Abdominal Pregnaney, *The Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 35(2), 220–221.
- Shen, J. J., Tymkow, C., ve MacMullen, N., 2005, Disparities in maternal outcomes among four ethnic populations, *Ethnicity and Disease*, 15(3), 492–497.
- Sibai, B., Dekker, G., ve Kupferminc, M., 2005, Pre-eclampsia, *The Lancet*, 365(9461), 785–799.
- Skjærven, R., Vatten, L. J., Wilcox, A. J., Rønning, T., Irgens, L. M., ve Lie, R. T., 2005, Recurrence of pre-eclampsia across generations: Exploring fetal and maternal genetic components in a population based cohort, *British Medical Journal*, 331(7521), 877–879.
- Spencer, C. A., Allen, V. M., Flowerdew, G., Dooley, K., ve Dodds, L., 2008, Low levels of maternal serum PAPP-A in early pregnancy and the risk of adverse outcomes, *Prenatal Diagnosis*, 28(11), 1029–1036.
- Spencer, K., Cowans, N. J., Chefetz, I., Tal, J., ve Meiri, H., 2007, First-trimester maternal serum PP-13, PAPP-A and second-trimester uterine artery Doppler pulsatility index as markers of pre-eclampsia, *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 29(2), 128–134.
- Staff, A. C., Benton, S. J., Von Dadelszen, P., Roberts, J. M., Taylor, R. N., Powers, R. W., Redman, C. W. G., 2013, Redefining preeclampsia using placenta-derived biomarkers, *Hypertension. Hypertension*, 61(5), 932–942.

- Sun, JiaYang, ve diğ., 2019, "The healing effects of conditioned medium derived from mesenchymal stem cells on radiation-induced skin wounds in rats.," *Cell transplantation*, 28(1),105-115.
- Sun, C., Zhang, Q., ve Zhang, K., 2016, Investigation of the association between matrix metalloproteinase-9 genetic polymorphisms and development of pre-eclampsia in Chinese pregnant women of the Creative Commons Attribution ShareAlike (CC BY-SA) 4.0 License, *Genetics and Molecular Research*, 15(3).
- Suvakov, S., Richards, C., Nikolic, V., Simic, T., McGrath, K., Krasnodembskaya, A., ve McClements, L., 2020, Emerging Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Preeclampsia, *Current Hypertension Reports*, Springer, 10(1), 49.
- Suvakov, Sonja, Cubro, H., White, W. M., Butler Tobah, Y. S., Weissgerber, T. L., Jordan, K. L., Garovic, V. D, 2019, Targeting senescence improves angiogenic potential of adipose-derived mesenchymal stem cells in patients with preeclampsia, *Biology of Sex Differences*, 10(1), 49.
- Thadhani, R., Mutter, W. P., Wolf, M., Levine, R. J., Taylor, R. N., Sukhatme, V. P., Karumanchi, S. A., 2004, First Trimester Placental Growth Factor and Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase 1 and Risk for Preeclampsia, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(2), 770–775.
- Than, N. G., Abdul Rahman, O., Magenheimer, R., Nagy, B., Fule, T., Hargitai, B., Papp, Z., 2008, Placental protein 13 (galectin-13) has decreased placental expression but increased shedding and maternal serum concentrations in patients presenting with preterm pre-eclampsia and HELLP syndrome, *Virchows Archiv*, 453(4), 387–400.
- Tondreau, T., Meuleman, N., Delforge, A., Dejeneffe, M., Leroy, R., Massy, M., Lagneaux, L., 2005, Mesenchymal Stem Cells Derived from CD133-Positive Cells in Mobilized Peripheral Blood and Cord Blood: Proliferation, Oct4 Expression, and Plasticity, *Stem Cells*, 23(8), 1105–1112.

- Tsemakhovich, V. A., Bamm, V. V., Shaklai, M., ve Shaklai, N., 2005, Vascular damage by unstable hemoglobins: The role of heme-depleted globin, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 436(2), 307–315.
- Tubbergen, P., Lachmeijer, A. M. A., Althuisius, S. M., Vlak, M. E. J., Van Geijn, H. P., ve Dekker, G. A., 1999, Change in paternity: A risk factor for preeclampsia in multiparous women? *Journal of Reproductive Immunology*, 45(1), 81–88.
- Turco, M. Y., ve Moffett, A., 2019, Development of the human placenta, *Development (Cambridge)*, Company of Biologists Ltd, 146(22).
- Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J. I., Mammoto, T., Kim, Y. M., Karumanchi, S. A., 2006, Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia, *Nature Medicine*, 12(6), 642–649.
- Wagner, W., Bork, S., Horn, P., Kronic, D., Walenda, T., Diehlmann, A., Ho, A. D., 2009, Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells, *PLoS ONE*, 4(6).
- Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Ho, A. D. 2005, Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood, *Experimental Hematology*, 33(11), 1402–1416.
- Wang, A., Rana, S., ve Karumanchi, S. A., 2009, Preeclampsia: The role of angiogenic factors in its pathogenesis, *Physiology*, American Physiological Society.
- Wang, C.-H., Su, P.-T., Du, X.-Y., Kuo, M.-W., Lin, C.-Y., Yang, C.-C., Chuang, Y.-J., 2009, Thrombospondin type I domain containing 7A (THSD7A) mediates endothelial cell migration and tube formation, *Journal of Cellular Physiology*, 222(3).
- Wathén, K.-A., Tuutti, E., Stenman, U.-H., Alfthan, H., Halmesmäki, E., Finne, P., Vuorela, P., 2006, Maternal Serum-Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 in Early Pregnancy Ending in Preeclampsia or Intrauterine Growth Retardation, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(1), 180–184.

- Wexler, S. A., Donaldson, C., Denning-Kendall, P., Rice, C., Bradley, B., ve Hows, J. M., 2003, Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal “stem” cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not, *British Journal of Haematology*, 121(2), 368–374.
- Winn, V. D., Gormley, M., ve Fisher, S. J., 2011, The impact of preeclampsia on gene expression at the maternal-fetal interface, *Pregnancy Hypertension*, Elsevier, 1(1), 100–108.
- Wu, G., Pan, M., Wang, X., Wen, J., Cao, S., Li, Z., Guo, J., 2015, Osteogenesis of peripheral blood mesenchymal stem cells in self assembling peptide nanofiber for healing critical size calvarial bony defect, *Scientific Reports*, 5(1), 1–12.
- Wu, M., Zhang, R., Zou, Q., Chen, Y., Zhou, M., Li, X., Chen, Q., 2018, Comparison of the Biological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Derived from the Human Placenta and Umbilical Cord, *Scientific Reports*, 8(1), 1–9.
- Xie, C. G., Wang, J. F., Xiang, Y., Qiu, L. Y., Jia, B. B., Wang, L. J., Huang, G. P., 2006, Cocultivation of umbilical cord blood CD34⁺ cells with retro-transduced hMSCs leads to effective amplification of long-term culture-initiating cells, *World Journal of Gastroenterology*, 12(3), 393–402.
- Yen, B. L., Huang, H.-I., Chien, C.-C., Jui, H.-Y., Ko, B.-S., Yao, M., Chen, Y.-C., 2005, Isolation of Multipotent Cells from Human Term Placenta, *Stem Cells*, 23(1), 3–9.
- Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I., ve Smith, A., 2003, BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 115(3), 281–292.
- Ying, W., Catov, J. M., ve Ouyang, P., 2018, Hypertensive disorders of pregnancy and future maternal cardiovascular risk, *Journal of the American Heart Association*, American Heart Association Inc., 7(17).
- Young, B. C., Levine, R. J., ve Karumanchi, S. A., 2010, Pathogenesis of Preeclampsia, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 5(1), 173–192.

- Zeeman, G. G., Alexander, J. M., McIntire, D. D., Byrd, W., ve Leveno, K. J., 2002, Inhibin-A levels and severity of hypertensive disorders due to pregnancy, *Obstetrics and Gynecology*, 100(1), 140–144.
- Zhang, L., ve Chan, C., 2010, Isolation and enrichment of rat mesenchymal stem cells (MSCs) and separation of single-colony derived MSCs, *Journal of Visualized Experiments*, (37), e1852.
- Zhang, X., ve Huang, J., 2010, Integrative genome-wide approaches in embryonic stem cell research, *Integrative Biology*, 2(10), 510.
- Zhang, Yi, Fei, M., Xue, G., Zhou, Q., Jia, Y., Li, L., Sun, S., 2012, Elevated levels of hypoxia-inducible microRNA-210 in pre-eclampsia: New insights into molecular mechanisms for the disease, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(2), 249–259.
- Zhang, Yuyi, Li, P., Guo, Y., Liu, X., ve Zhang, Y., 2019, MMP-9 and TIMP-1 in placenta of hypertensive disorder complicating pregnancy, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 18(1), 637–641.
- Zhao, G., Zhou, X., Chen, S., Miao, H., Fan, H., Wang, Z., Hou, Y., 2014, Differential expression of microRNAs in decidua-derived mesenchymal stem cells from patients with pre-eclampsia, *Journal of Biomedical Science*, 21(1), 1–12.
- Zhao, L., Triche, E. W., Walsh, K. M., Bracken, M. B., Saftlas, A. F., Hoh, J., ve Dewan, A. T., 2012, Genome-wide association study identifies a maternal copy-number deletion in PSG11 enriched among preeclampsia patients, *BMC Pregnancy and Childbirth*, 12(1), 1–10.
- Zhou, Y., Damsky, C. H., ve Fisher, S. J., 1997, Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype: One cause of defective endovascular invasion in this syndrome?, *Journal of Clinical Investigation*, 99(9), 2152–2164.

- Zhou, Y., Fisher, S. J., Janatpour, M., Genbacev, O., Dejana, E., Wheelock, M., ve Damsky, C. H., 1997, Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate: A strategy for successful endovascular invasion?, *Journal of Clinical Investigation*, 99(9), 2139–2151.
- Zhou, Y., McMaster, M., Woo, K., Janatpour, M., Perry, J., Karpanen, T., Fisher, S. J., 2002, Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome, *American Journal of Pathology*, 160(4), 1405–1423.



EKLER

EK1: ETİK KURUL KARAR BELGESİ

İÜC Tarih ve Sayı: 07/11/2018-49403


T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlığı


Sayı :59491012-604.01.02-
Konu :Doç.Dr.Tuba GÜNEL'in etik
kurul kararı A-16

İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi Dekanlığı

İlgi :05.10.2018 tarih, 69871371-020-299600 sayılı yazı

Fakülteniz Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim üyesi **Doç.Dr.Tuba GÜNEL'in** yürütücülüğünde **Prof.Dr.Ali BENİAN, Araş.Gör.Ece GÜMÜŞOLU ve Yüksek Lisans Öğrencisi Zeynep KUMRAL'ın** yardımcılıklarında "**Preeklampitik Gebeliklerde Plasenta ve Kandan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerde Transkriptom Analizi**" başlıklı araştırma hakkında ilgi yazınız ve ekleri **06 Kasım 2018** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup,Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Başkan

e-İmzalı
Prof. Dr. Muhlis Cem AR
Dekan a.
Dekan Yardımcısı

NOT: Yönetmelik gereği Sonuç Raporunun ve Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği onay belgesinin Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna iletilmesi gerekmektedir.

EK :
1 dosya elden teslim edilecektir.

Doğrulamak İçin:<http://dogrulama.istanbulc.edu.tr/enVision.sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BENF08PMH>

Ayrıntılı bilgi için irtibat : Güler SOYDANER Dahili : 22300
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL
Tel : 0 (212) 414 30 00 Faks : 0 (212) 632 00 33
e-posta : ctfpersonel@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbulc.edu.tr

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: A-16	Tarih: 06 KASIM 2018
	Doç.Dr.Tuba GÜNEL'in yürütücülüğünde Prof.Dr.Ali BENİAN,Arşt.Gör. Ece GUMUŞOĞLU ve Yüks.Lis. Öğr. Zeynep KUMRAL'ın yardımcılığında yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir,	

ÇALIŞMA ESASI	İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI:	Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR

ETİK KURUL ÜYELERİ									
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR (Başkan)	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	I.Ü.C.- Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Mehmet Faik ÖZÇELİK (Başkan Yard.)	Genel Cerrahi	I.Ü.C.- Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Muhtlis Cem AR (Raportör)	İç Hastalıkları Hematoloji	I.Ü.C.- Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Zeki ÖNGEN	Kardiyoloji	I.Ü.C.- Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Mahmut Reha BAYAR	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	I.Ü.C.- Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Öner SÜZER	Tıbbi Farmakoloji	I.Ü.C.- Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Nurtan Uzun ADATEPE	Nöroloji	I.Ü.C.- Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Hakkı Oktay SEYMEN	Fizyoloji	I.Ü.C.- Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Oktay DEMİRKIRAN	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	I.Ü.C.- Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Gülten DİNÇ	Tıp Tarihi ve Etik	I.Ü.C.- Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Suphi VEHİD	Halk Sağlığı	İstanbul Bilim Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Mazeretli
Doç.Dr.Zeynep Hande TURNA	İç Hastalıkları Medikal Onkoloji	I.Ü.C.- Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Mutlu NİYAZOĞLU	İç Hastalıkları End./Metb./Diabet	Haydarpaşa Eğitim Araştırma Hast.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Avukat Ayfer DİKMEN	Ticaret ve Sağlık Hukuku	Serbest Hukuk Bürosu	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Zümrüt GAMLI	Emekli Öğretmen	Sivil Üye	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

*:Toplantıda Bulunma

GİRİŞİMSSEL OLMAYAN İLAÇ DIŞI KLİNİK ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

ETİK KURULUN ADI	Istanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
AÇIK ADRES	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlık Binası, 34303 Kocamustafapaşa Fatih İstanbul
TELEFON	+90 (212) 414 32 52; 414 30 00/22300
FAKS	+90 (212) 632 00 40
E-POSTA	ctfetik@istanbul.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Preeklampitik Gebeliklerde Plasenta ve Kandan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerde Transkriptom Analizi			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Tuba GÜNEL			
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Doç. Dr. Tuba GÜNEL - Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Prof. Dr. Ali BENLİAN - Kadın Hastalıkları ve Doğum			
	KOORDİNATÖRÜN UNVANI/ADI/SOYADI				
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI				
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Istanbul Üniversitesi Cerrahpaşa-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu			
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ				
	BAŞVURULAN ETİK KURULUN ADI	Istanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu			
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	I.Ü. BAP			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	I.Ü. BAP			
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ ☐ DOKTORA TEZİ ☐ YÜKSEK LİSANS TEZİ ☒	AKADEMİK AMAÇLI ☐ YANDAL UZMANLIK TEZİ ☐		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	☐ Anket çalışması ☐ Retrospektif (geriye dönük) araştırma ☐ Girişimsel (invaziv) olmayan klinik araştırma ☒ Rutin tetkik ve tedavi işlemleri sırasında elde edilmiş materyallerle (kan, idrar, gayta, doku, görüntü gibi) yapılan çalışma ☐ Hemşirelik faaliyetlerinin sınırı içerisinde yapılan araştırma ☐ Vücut fizyolojisi çalışması ☐ Antropometrik ölçümlere dayalı çalışma ☐ Yaşam alışkanlıklarının değerlendirilmesi çalışması DİĞER ☐ Diğer ise belirtiniz:			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	DİĞER			Açıklama:

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Zeynep Kumral
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Hacettepe Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik ABD
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik