



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



DOKTORA TEZİ

**PREEKLAMPSİDE ANJİYOGENEZ FAKTÖRLERİ ile PLAZMA
PROTEOMU ARASINDAKİ İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Vildan YAMAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA

II. DANIŞMAN

Prof. Dr. Ali BENİAN

Aralık, 2021

İSTANBUL

Bu çalışma, 17.12.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Ahmet Süha YALÇIN
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Tuba GÜNEL
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Evren ÖNAY UÇAR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Fen Edebiyat 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 abonesi 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 22922 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

Vildan Yaman, Ali Benian, Nazlı Arda, 2019, Angiogenesis-related proteins sFlt-1 and PlGF in preeclampsia, *Turk J Biol.*, 43(5 Suppl), 84.

ÖNSÖZ

Birlikte yürüttüğümüz tez çalışması sırasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve her türlü desteğini sunan saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Nazlı ARDA'ya özel teşekkürü borç bilirim.

Çalışmanın klinik aşamalarının gerçekleşmesini sağlayan, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, İÜC Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyelerinden saygıdeğer eş danışmanım Prof. Dr. Ali BENİAN'a teşekkür ederim. Ayrıca Kadın Hastalıkları ve Doğum uzmanı Prof. Dr. Kılıç AYDINLI'ya verdiği katkılardan ötürü teşekkürlerimi sunarım. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yürüttüğüm proteomik çalışmalar sırasında desteklerini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Murat KASAP'a ve Araş. Gör. Mehmet SARIHAN'a çok teşekkür ederim. Tez izleme sürecinde bana yol gösteren ve her zaman cesaret veren saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Tuba GÜNEL ve Prof. Dr. Ahmet Süha YALÇIN'a teşekkürü bir borç bilirim.

İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Proteomik Laboratuvarı Doktora öğrencilerinden MSc Yunus AKSÜT ve MSc Aslıhan ŞENGELİN ile tüm proteomik ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Sevgili arkadaşım değerli akademisyen Dr. Öğr. Üyesi Asuman DEVECİ ÖZKAN'a desteklerinden dolayı minnettarım.

Tezi maddi olarak destekleyen İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimine teşekkür ederim. Ayrıca doktora eğitimim boyunca kişisel ve akademik gelişimime katkı sağlayan tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmam süresince manevi desteklerini her zaman hissettiğim aileme şükranlarımı sunuyorum. Doktora tezimi yine bu süreçte kaybettiğim ve tüm hayatını biz çocuklarına adayan sevgili babam Kemal YILDIZ'a ve babamı örnek alarak yetiştirdiğim çocuklarıma adıyorum.

Aralık 2021

Vildan YAMAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xvi
SUMMARY	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1 PREEKLAMPSİ	4
2.2 PREEKLAMPSİNİN TANISI.....	5
2.3 PREEKLAMPSİNİN ETİYOLOJİSİ VE PATOGENEZİ.....	6
2.3.1 Plasentada Vaskülogenez ve Anjiyogenez	7
2.3.2 Vasküler Fonksiyon Bozukluğunun Moleküler Mekanizması	7
2.3.3 Anjiyogenik Faktörler	11
<i>Plasental Büyüme Faktörü (PlGF)</i>	12
2.3.3 Antianjiyogenik Faktörler: Soluble fms-benzeri tirozin kinaz-1 (sFlt-1).....	13
2.3.4 İnflamasyonun Preeklampsinin Patogeneze Etkisi.....	14
2.3.5 Akut Faz Proteinlerinin Preeklampsinin Patogeneze Etkisi	15
2.4 PREEKLAMPSİ VE PROTEOMİK	17
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	20
3.1 KAN ÖRNEKLERİNİN ALINMASI	20
3.2 İNSAN ÇÖZÜNÜR VASKULAR ENDOTELYAL FAKTÖR RESEPTÖRÜ 1 (SFLT-1) ÖLÇÜMÜ	20
3.3 İNSAN PLASENTA BÜYÜME FAKTÖRÜ (PLGF) ÖLÇÜMÜ.....	22
3.4 PROTEOMİK ANALİZLER İÇİN PLAZMA ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI.....	24
3.4.1 Plazma Örneklerinin Havuz Yapılarak Birleştirilmesi.....	24
3.4.2 HiTrap G Protein Kolon Kromatografisi ile Plazmadan IgG Uzaklaştırma	25

3.4.3	Albümin Uzaklaştırma İşlemi.....	26
3.4.4	Amicon® Karıştırılmalı Hücre Aparatı ile Tampon Değişimi	26
3.4.5	Protein Çöktürme İşlemi.....	27
3.4.6	Protein Konsantrasyonunun Hesaplanması	28
3.5	ELEKTROFORETİK ANALİZLER.....	29
3.5.1	Tek Boyutlu Denatüre Jel Elektroforezi (1D SDS-PAGE)	29
3.5.1	2 Boyutlu Denatüre Jel Elektroforezi (2D SDS-PAGE)	29
3.5.1.1	<i>Birinci Boyut İzoelektrik Odaklama</i>	29
3.5.2.2	<i>İkinci Boyut SDS-PAGE</i>	31
3.5.3	Jellerin Coomassie Boyama Yöntemi ile Boyanması.....	32
3.6	SPOT ANALİZİ VE SPOT KESİMİ	32
3.7	TRİPSİN İLE JEL İÇİNDEKİ PROTEİNLERİN KESİMİ (IN-GEL DIGESTION)	34
3.8	PEPTİD ÖRNEKLERİNİN MALDI-TOF/TOF ANALİZİ İÇİN HAZIRLANMASI.....	34
3.9	MALDI-TOF/TOF KÜTLE SPEKTROMETRİSİ.....	35
3.10	WESTERN BLOTLAMA	36
3.11	İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	38
3.12	BİYOİNFORMATİK ANALİZLER	39
4.	BULGULAR.....	40
4.1	PREEKLAMPSİ HASTALARINA VE KONTROL GRUBU GEBELERE AİT DEMOGRAFİK BİLGİLER	40
4.2	PLAZMADA SFLT-1 VE PLGF DÜZEYLERİ.....	42
4.3	IGG VE ALBÜMİN UZAKLAŞTIRILMIŞ PLAZMA ÖRNEKLERİ	44
4.4	İKİ BOYUTLU SDS-PAGE BULGULARI	47
4.5	MALDI-TOF/TOF KÜTLE SPEKTROMETRİSİ İLE PROTEİNLERİN TANIMLANMASI.....	49
4.6	BİYOİNFORMATİK ANALİZLER.....	54
4.7	WESTERN BLOT VERİLERİ.....	57
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	59
	KAYNAKLAR.....	67
	EKLER	78
	EK-1: Etik Kurul Karar Belgesi	78
	ÖZGEÇMİŞ	79

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Vaskülogenez ve anjiyogenezde önerilen FGF, VEGF, PlGF ve anjiyopoietin mekanizmaları ve bunların villöz gelişim ve varsayılan parakrin kontrolündeki dağılımı (kırmızı). (Wang ve Zhao, 2010).	9
Şekil 2.2: Dolaşım ve endotelyumdan türevlenen faktörler tarafından etkilenen vasküler sürecin basitçe şematik sunumu. Kısaltmalar: AA: araşidonik asit, PGI ₂ : prostasiklin, PGHS: prostaglandin endoperoksit sentaz, bET-1: büyük ET-1, eNOS: endotelyal NOS, ETB: ET reseptörü B (Gouloupoulou ve Davidge 2015).	11
Şekil 2.3: VEGF ailesi üyelerinin reseptörleri ile etkileşimi ve sonuçları (Wang ve Zhao 2010).	12
Şekil 2.4: Preeklampside vasküler koruma ve fonksiyon bozukluğunun şematik gösterimi (Ahmed, 2011).	14
Şekil 3.1: sFlt-1 (sVEGFR-1) Standart grafiği.	22
Şekil 3.2: PlGF Standart grafiği.	23
Şekil 3.3: Proteomik araştırmalar için uygulanan deneylerin akış şeması.	24
Şekil 3.4: NGC Kromatografi Cihazı (Bio-Rad).	25
Şekil 3.5: Model 491 Prep Cell Cihazı (Bio-Rad, ABD).	26
Şekil 3.6: Amicon® ultrafiltrasyon sistemi.	27
Şekil 3.7: Bradford standart grafiği.	29
Şekil 3.8: EXQest spot kesim cihazı (Bio-RAD).	33
Şekil 4.1: Sistolik kan basıncı ve albümin düzeyi arasındaki Poisson eğrisi.	44
Şekil 4.2: Havuz yapılmış plazma örneklerinden kolon kromatografisi ile IgG'nin uzaklaştırılması öncesinde ve sonrasında IgG bantlarının SDS-PAGE jelindeki görüntüsü (Kh: Kontrol havuzu, Ph: Preeklampsi havuzu, KR1: IgG'nin 1. kromatografik ayırımından sonra elde edilen kontrol örneği, PR1: IgG'nin 1. kromatografik ayırımından sonra elde edilen P örneği, IgGE: IgG elüsyonu).	45
Şekil 4.3: Rastgele seçilen plazma örneklerinde albümin bantlarının SDS-PAGE jelindeki görüntüsü (M: Markır; K: Kontrol grubu; P: Preeklampsi grubu; farklı bireylere ait K ve P örnekleri farklı numaralarla gösterilmiştir).	45

Şekil 4.4: Kontrol grubu plazma havuz örneğinden PrepCell ile albümin uzaklaştırması sırasında elde edilen 160-240. fraksiyonların SDS-PAGE jelindeki görüntüsü (MA: Molekül ağırlığı; M: Markır).....	46
Şekil 4.5: Kontrol grubu plazma havuz örneğinden PrepCell ile albümin uzaklaştırması sırasında elde edilen 170-178. fraksiyonların SDS-PAGE jelindeki görüntüsü. (MA: Molekül ağırlığı; M: Markır.).....	46
Şekil 4.6: Preeklampsi grubu plazma havuz örneğinden PrepCell ile albümin uzaklaştırması sırasında elde edilen 160-240. fraksiyonların SDS-PAGE jelindeki görüntüsü (MA: Molekül ağırlığı; M: Markır).	47
Şekil 4.7: Preeklampsi grubu plazma havuz örneğinden PrepCell ile albümin uzaklaştırması sırasında elde edilen 176-184. fraksiyonların SDS-PAGE jelindeki görüntüsü (MA: Molekül ağırlığı; M: Markır).	47
Şekil 4.8: Kontrol grubunun 2D SDS-PAGE jel görüntüsü (M: Markır).	48
Şekil 4.9: Preeklampsi grubunun 2D SDS-PAGE jel görüntüsü (M: Markır).	48
Şekil 4.10: Preeklampsi ve kontrol gruplarında ekspresyonu farklı olan proteinleri içeren ve MALDI-TOF MS analizi için kesilen 2D SDS-PAGE'deki spotlar. Kırmızı numaralara karşılık gelen olası proteinlerin AC no. (Accession numaraları) Tablo 4.5'te görülmektedir.	49
Şekil 4.11: MALDI sonuçlarına göre ekspresyonu değişen proteinlerin KEGG yolak analizi.	54
Şekil 4.12: MALDI sonuçlarına göre ekspresyonu değişen proteinlerin KEGG veri tabanında Seviye 1 ve Seviye 2 (sistem/hastalıklarla ilişki) analizi.	55
Şekil 4.13: MALDI sonuçlarına göre ekspresyonu değişen proteinlerin hücre bileşeni olarak rolleri (GO).	56
Şekil 4.14: MALDI sonuçlarına göre ekspresyonu değişen proteinlerin moleküler fonksiyonları (GO).	56
Şekil 4.15: MALDI sonuçlarına göre ekspresyonu değişen proteinlerin biyolojik süreçlerdeki rolleri (GO).	57
Şekil 4.16: Preeklampsi grubunda fibrinojen β ekspresyonundaki azalışın Western blotlama ile validasyonu.	58
Şekil 4.17: Preeklampsi grubunda haptoglobin ekspresyonundaki artışın Western blotlama ile validasyonu.	58

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Preeklampside Tanı Kriterleri (ACOG 2013).	6
Tablo 2.2: İnsanda bulunan akut faz proteinleri (Gabay ve Kushner, 1999).	16
Tablo 2.3: Preeklampside kan örnekleri ile yapılan çalışmalarda 3. Trimesterde ekspresyon düzeyi değişen proteinler.	19
Tablo 3.1: sFlt-1 Standart solüsyonun seyreltilmesi.	21
Tablo 3.2: PlGF Standart solüsyonun seyreltilmesi.	22
Tablo 3.3: Hazırlanan jellerin içerikleri.	30
Tablo 3.4: İzoelektrik odaklamada işlem basamakları.	31
Tablo 3.5: Dengeleme tamponlarının içerikleri.	31
Tablo 3.6: Gümüş Boyamada kullanılan çözeltilerin miktarları.	33
Tablo 3.7: In gel Tripsin kesimde kullanılan kimyasalların hazırlanışı.	35
Tablo 3.8: Western blotlamada kullanılan tamponlar.	37
Tablo 3.9: Western blotlamada kullanılan birincil ve ikincil antikorlar, elde edildikleri organizmalar ve dilüsyonları.	38
Tablo 4.1: Grupların demografik özellikleri ve biyokimya verileri.	41
Tablo 4.2: Plazmada sFlt-1 ve PlGF düzeyleri.	42
Tablo 4.3: Klinik faktörler ile preeklampsiye etki eden parametreler arasındaki korelasyonlar.	43
Tablo 4.4: Albumin düzeylerinin Poisson kestirimi.	43
Tablo 4.5: Preeklampsi ve kontrol gruplarında farklı düzeyde ekspresyonu yapılmış proteinlerin MALDI TOF/TOF sonuçları. AC No: Accession numarası; MA: Molekül ağırlığı; EP: Eşleşen peptid; pI: İzoelektrik nokta; DE: Dizi eşleşmesi; PED: Protein ekspresyonu değişimi; yukarı ok artışı, aşağı ok azalışı, okların yanındaki rakamlar kat değişimi göstermektedir.	50

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
α	: Alfa
β	: Beta
%	: Yüzde
$\times g$	: Göreceli santrifüj kuvveti (gravite kuvveti)
μA	: Mikroamper
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
χ^2	: Ki kare
cm	: Santimetre
Da	: Dalton
dL	: Desilitre
g	: Gram
H ₂ O	: Su
H ₂ S	: Hidrojen sülfür
HCl	: Hidroklorik asit
kDa	: Kilodalton
kg	: Kilogram
L	: Litre
M	: Molar
m/z	: Kütle/yük
mA	: Miliamper
mg	: Miligram

mL	: Mililitre
mm³	: Milimetre küp
mm Hg	: Milimetre cıva
mM	: Milimolar
n	: Kişi sayısı
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
NO	: Nitrik oksit
°C	: Santigrat derece
pH	: Hidrojen gücü
ppm	: Milyonda bir birim
psi	: İnçkare başına libre (basınç birimi)
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
V	: Volt
v/v	: hacim/hacim
w/v	: Ağırlık/hacim

Kısaltmalar	Açıklama
2D-DIGE	: İki boyutlu floresans ayrımlı jel elektroforezi
2D-SDS PAGE	: İki boyutlu sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi
AA	: Araşidonik asit
AAT	: Alfa-1 antitripsin
ACN	: Asetonitril
ACOG	: Amerikan Obstetrik ve Jinekoloji Koleji
ADMA	: Asimetrik dimetil arjinin
AFP	: Akut faz proteinleri
ALT	: Alanin aminotransferaz
Ambic	: Amonyum bikarbonat
Ang	: Anjiyotensin
ANG	: Anjiyopoietin
apoE3	: Apolipoprotein E3
APOA1	: Apolipoprotein A-1
AST	: Aspartat aminotransferaz
AT1R AA	: Anjiyotensin I reseptörü otoantikorları
AT1R	: Anjiyotensin I reseptörü
bET-1	: Büyük endotelin-1
BMI	: Vücut kitle endeksi
cAMP	: Siklik adenzin monofosfat
cfDNA	: Hücre dışı serbest DNA
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
CHAPS	: 3-((3-Kolamidopropil) dimetilamonyo)-1-propansülfonat
CO3	: Kompleman C3
CSE	: Sistasyonin-g-liyaz

dd H₂O	: Çift distile (“double-distilled”) su
DM	: Diabetes mellitus
DOC	: Sodyum deoksikolat
DTT	: Ditiyotreitöl
EDCF	: Endotelyumdan türevlenen kasılma faktörü
EDH	: Endotel kaynaklı aşırı kutuplanma
EDRF	: Endotelyumdan türevlenen gevşeme faktörü
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
ELISA	: Enzim bağılı immünosorbent deneyi
eNOS	: Endotelial nitrik oksit sentaz
ET-1	: Endotelin-1
ETA	: Endotelin reseptörü A
ETB	: Endotelin reseptörü B
F	: Fraksiyon
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
Flk1	: Fetal karaciğer kinaz 1
Flt-1	: Fms-benzeri tirozin kinaz 1
GO	: Gen ontolojisi
Hb	: Hemoglobin
Hp	: Haptoglobin
HRP	: Yaban turpu peroksidazı
IAA	: 3-İndolasetik asit
IEF	: İzoelektrik odaklama
IgG	: İmmüoglobulin G
IK_{Ca}	: Orta iletkenlikli kalsiyumla aktiveşen potasyum kanalları
IL-18	: İnterlökin-18

IL-1β	: İnterlökin-1 β
IPG	: İmmobilize pH gradiyenti
KB	: Kan basıncı
KDR	: Kinaz insert alt ünitesi reseptörü
KEGG	: Kyoto encyclopedia of genes and genomes
LC-MS	: Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi
LOX-1	: Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör-1
MALDI-TOF/TOF	: Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu uçuş zamanı uçuş zamanı
MEGJ	: Miyoendotelyal boşluk bağlantıları
MMP	: Matriks metalloproteinaz
MS	: Kütle spektrometresi
NK	: Doğal öldürücü
NOS	: Nitrik oksit sentaz
OD	: Optik yoğunluk
oxLDL	: Oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein
PDE	: Fosfodiesteraz
PE	: Preeklampsi
PGHS	: Prostaglandin endoperoksit sentaz
PGI₂	: Prostatiklin
PIGF	: Plasental büyüme faktörü
PVDF	: Polivinilidın diflorür
sEng	: Çözünebilir endoglin
SERPINA1	: Serpin ailesi A, 1 üyesi
sFlt-1	: Çözünebilir fms-benzeri tirozin kinaz-1 ("soluble fms-like tyrosine kinase-1")

sGC	: Çözünebilir guanilil siklaz, nitrik oksit reseptörü
SK_{Ca}	: Küçük iletkenlikli kalsiyumla aktiveleşen potasyum kanalları
STBM	: Sinsityotrofoblasttan türevlenmiş mikroparçacıklar
TBP	: Tribütil fosfat
TBST	: Tris tamponlu tuz çözeltisi Tween 20 ilaveli (“Tris Buffered Saline, with Tween 20”)
TCA	: Trikloroasetik asit
TCEP	: Tris(2-karboksietil)fosfin
TEMED	: Tetrametiletildiamin
TGF-β	: Dönüştürücü büyüme faktörü beta
Th1	: T Yardımcı hücresi 1
TxA₂	: Tromboksan A ₂
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
VEGFR	: Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü

ÖZET

PREEKLAMPSİDE ANJİYOGENEZ FAKTÖRLERİ ile PLAZMA PROTEOMU ARASINDAKİ İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Vildan YAMAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA

II. Danışman: Prof. Dr. Ali BENİAN

Preeklampsia (gebelik zehirlenmesi) anne ve bebeğin yaşamını tehdit eden ve zorunlu erken doğumla sonuçlanan bir gebelik komplikasyonudur. Gebeliğin ilk üç aylık periyodunda (birinci trimester) plasenta oluşumu sırasında meydana gelen vaskülogenez ve anjiyogenez süreçlerindeki aksaklıklar nedeniyle ortaya çıktığı düşünülse de, patofizyolojisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bu çalışmanın amacı, preeklampsia gelişen gebeler ile sağlıklı gebelerde anjiyogenez ve anti-anjiyogenez faktörlerinin düzeyini ve plazma proteomunu araştırmak, protein ekspresyonu değişen proteinleri saptamak ve anjiyogenezle ilişkisini inceleyerek hastalığın moleküler mekanizmasına dair yeni bilgilere ulaşmaktır.

Çalışmanın ilk aşamasında preeklampsia tanısı almış gebeler (deney grubu) ve sağlıklı gebelerden (kontrol grubu) antikoagülan içeren tüplere tam kan örnekleri alındı ve santrifüjleyle plazma örnekleri ayrıldı. Preeklampsia ve kontrol gruplarının plazma sFlt-1 (çözünabilir fms-benzeri tirozin kinaz-1, anti-anjiyogenik faktör) ve PlGF (plasenta büyüme faktörü, anjiyogenik faktör) düzeyleri ELISA yöntemiyle belirlenerek kıyaslandı.

İkinci aşamada preeklampsi ve kontrol gruplarının plazma örnekleri havuz yapıldı ve iki boyutlu sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (2D SDS-PAGE) ile analiz edildi. İki grup arasında farklı eksprese edilen proteinlere karşılık gelen spotlar jelden kesilerek MALDI-TOF/ TOF MS ile analiz edildi. Protein miktarında artış ve azalış gösteren iki protein Western blotlama ile doğrulandı.

Preeklampsi grubunda birim protein başına sFlt-1 miktarı (0.83 ± 0.063 ng/mg protein) kontrole (0.067 ± 0.010 ng/mg protein) kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu. PlGF düzeyi, preeklampsi grubunda 0.0026 ± 0.0005 ng/mg protein, kontrol grubunda 0.0023 ± 0.0004 ng/mg protein olarak belirlendi, dolayısıyla bu faktör bakımından iki grup arasında anlamlı bir fark yoktu. PE grubundaki sFlt-1/PlGF oranı (0.20 ± 0.02), kontrol grubuna (0.13 ± 0.006) göre anlamlı derecede yüksekti.

Yapılan proteomik analizler sonucunda 17 spotta regülasyonun farklı olduğu bulundu. Preeklampsi grubunda haptoglobin (6.8 kat), kompleman C3 (5.34 kat), apolipoprotein A-I (3.07 kat), keratin tip 1 hücre iskeleti 10 (9.71 kat) up-regüle iken albümin (1.3 kat), fibrinojen beta zinciri (2.59 kat), α -1-antitripsin (4.83 kat) ve fibrinojen alfa zinciri (68.88 kat) down-regüle durumdaydı.

Çalışmanın son aşamasında iki proteinin ekspresyonundaki değişim (haptoglobindeki artış ve fibrinojen β 'daki azalış) Western blotlama ile valide edildi.

Akut faz proteinlerinden olan haptoglobin, inflamasyon, oksidatif stres ve enfeksiyon ile ilişkilidir. Bu protein endotel fonksiyon bozukluğuna, damarlarda hasara ve inflamasyona neden olan serbest hemoglobine bağlanarak iş gördüğünden, preeklampside artan sFlt-1 düzeyine bağlı anti-anjiyogenezi geri döndürmeye çalışan olası faktörlerden biri olabilir. Preeklampsi hastalarında fibrinojen β 'daki down-regülasyonun gebelik evresi ve hastalığın şiddeti ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Literatürde bu pıhtılaşma faktörüyle ilgili farklı bulgulara rastlandığından, anjiyogenezdeki rolüne ilişkin bir yorum yapabilmek için diğer faktörlerle birlikte ele alınması ve gen düzeyinde incelenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışma preeklampside anjiyojenik faktörler ile plazma proteomu arasındaki ilişki hakkında önemli ipuçları sağlamıştır. Bununla birlikte, preeklampsinin moleküler mekanizmasını aydınlatmak için örnekleme prosedürlerinin ve proteomik yöntemlerin standardize edilmesi ve gen düzeyinde araştırmalar yapılması gerektiği açıktır.

Aralık 2021, 99 sayfa.

Anahtar kelimeler: Preeklampsi, proteomik, anjiyogenez faktörleri, sFlt-1, PlGF, haptoglobin

SUMMARY

ASSESSMENT of the RELATION BETWEEN ANGIOGENESIS FACTORS and PLASMA PROTEOME in PREECLAMPSIA

Ph.D. THESIS

Vildan YAMAN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA

Co-Supervisor: Prof. Dr. Ali BENİAN

Preeclampsia (pregnancy toxemia) is a pregnancy complication that threatens the life of mother and baby and results in compulsory preterm delivery. Although it is thought to occur due to the disruptions in the vasculogenesis and angiogenesis processes that occur during the formation of the placenta in the first trimester of pregnancy, its pathophysiology has not yet been fully elucidated.

The aim of this study is to investigate the level of angiogenesis and anti-angiogenesis factors and plasma proteome in pregnant women with preeclampsia and in healthy pregnant women, to detect proteins with altered protein expression and to obtain new information on the molecular mechanism of the disease by examining their relationship with angiogenesis.

In the first stage of the study, whole blood samples were taken from pregnant women diagnosed with preeclampsia (experimental group) and healthy ones (control group) into tubes containing anticoagulants, and plasma samples were separated by centrifugation. Plasma

PlGF (placental growth factor, angiogenic factor) and sFlt-1 (soluble fms-like tyrosine kinase-1, anti-angiogenic factor) levels of preeclampsia and control groups were determined by ELISA method and compared.

In the second stage, plasma samples of preeclampsia and control groups were pooled and analyzed by two-dimensional sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (2D SDS-PAGE). Spots corresponding to differentially expressed proteins between the two groups were cut from the gel and analyzed by MALDI-TOF/TOF MS. Two proteins with increase and decrease in protein amount were confirmed by Western blotting.

The amount of sFlt-1 per unit protein (0.83 ± 0.063 ng/mg protein) in the preeclampsia group was significantly higher than the control (0.067 ± 0.010 ng/mg protein). PlGF level was determined as 0.0026 ± 0.0005 ng/mg protein in the preeclampsia group and 0.0023 ± 0.0004 ng/mg protein in the control group, so there was no significant difference between the two groups in terms of this factor. The sFlt-1/PlGF ratio in the PE group (0.20 ± 0.02) was significantly higher than the control group (0.13 ± 0.006).

As a result of the proteomic analyzes, it was found that the regulation was different in 17 spots. In the preeclampsia group, haptoglobin (6.8-fold), complement C3 (5.34-fold), apolipoprotein A-1 (1.82-fold), keratin type 1 cytoskeleton 10 (9.71-fold) were up-regulated while albumin (1.3 fold), fibrinogen beta chain (2.59 fold), α -1-antitrypsin (4.83 fold), and fibrinogen alpha chain (68.88 fold) were down-regulated.

In the final stage of the study, the change in expression of the two proteins (increase in haptoglobin and decrease in fibrinogen β) was validated by Western blotting.

Haptoglobin, one of the acute phase proteins, is associated with inflammation, oxidative stress and infection. Since this protein functions by binding to free hemoglobin causing endothelial dysfunction, vascular damage and inflammation, it may be one of the possible factors trying to reverse the anti-angiogenesis associated with increased sFlt-1 level in preeclampsia. It is thought that down-regulation of fibrinogen β in patients with preeclampsia is related to the stage of pregnancy and the severity of the disease. Since there are different findings related to this coagulation factor in the literature, it has been concluded that in order to make a comment on its role in angiogenesis, it should be considered together with other factors and examined at the gene level.

In conclusion, this study provided important clues about the relationship between angiogenic factors and plasma proteome in preeclampsia. However, it is clear that sampling procedures and proteomic methods are need to be standardized, and research at the gene level are required in order to elucidate the molecular mechanism of preeclampsia.

December 2021, 99 pages.

Keywords: Preeclampsia, proteomic, angiogenesis factors, sFlt-1, PlGF, haptoglobin

1. GİRİŞ

Preeklamps (PE) ya da halk arasında bilinen adıyla gebelik zehirlenmesi, 32. gebelik haftasından önce gelişen ve anne ile bebeğin yaşamını tehdit eden ciddi bir gebelik komplikasyonudur. Preeklampsinin tanısı gebeliğin 20. haftasından sonra yeni ortaya çıkan hipertansiyon ve proteinüri ile konulmaktadır.

Preeklampsinin yol açtığı en önemli sağlık sorunları erken doğum ve yenidoğanda büyüme geriliğidir (Atkinson ve diğ., 2009). Hastalık, hafif semptomlarla seyrettiği durumda bile bir anda hızla şiddetini artırabilir. Son yıllarda yürütülen geniş kapsamlı araştırmalara rağmen preeklampsinin gelişim mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (Law ve diğ., 2015). Hakkında az şey bilinen preeklamps sendromunu önceden tahmin eden bazı biyokimyasal belirteçler ve semptomlar daha sonra tanı kriteri olarak yorumlanmakla birlikte, bu durum süregelen tartışmalara yol açmakta, dolayısıyla ortak bir karara varmak için daha detaylı araştırmalara ve periyodik güncellemelere gereksinim duyulmaktadır (Vidaeff ve diğ., 2020).

Preeklamps gelişiminde etkili faktörlerden biri plasenta oluşumu sırasında meydana gelen anjiyogenezdeki aksamalardır (Levine ve diğ., 2004; Rana ve diğ., 2012; March ve diğ., 2015). Anjiyogenez ile kısa sürede anne ile bebek arasında gaz alışverişi ile madde taşınımını sağlayan özelleşmiş kan damarları ve destekleyici yapılar oluşur. Bu süreçte ters giden olaylar sonucu preeklamps gibi hastalıklar gelişebilir (Dechend ve Luft, 2008).

Anjiyogenezin yanı sıra, annedeki hormonal denge ve genetik faktörler de hastalığın gelişiminde rol oynayabilir (Karumanchi ve Cerderia, 2012). Ancak günümüzde preeklampsinin tam olarak neden olduğu hala bilinmemektedir ve gebeliğin erken döneminde tanısı mümkün değildir.

Preeklampsde incelenen parametrelerden biri, kısaca sFlt-1 ya da sVEGFR-1 olarak bilinen çözünebilir fms-benzeri tirozin kinaz-1'dir. sFlt-1, kan damarlarının büyümesini sağlayan proteinleri etkisiz hale getiren bir tirozin kinazdır. Normal gebelikte sFlt-1'in serum konsantrasyonu gebeliğin 8-12 haftasından 16-20. haftasına kadar düşüktür, daha sonra (26-30. haftalar arasında) dereceli olarak artarken gebeliğin 35-39. haftalarında hızlıca yükselir ve doğumdan sonra normal düzeyine döner. Preeklampitik gebelerde sFlt-1 düzeyi normal

gebelerden oldukça yüksektir (Laganà ve diğ., 2016). Maynard ve diğ. (2003) yaptıkları çalışmada sFlt-1'in PE vakalarında up-regüle olduğunu ortaya koymuşlardır. Yine bu çalışmada gebe ratlara sFlt-1 uygulanmasının preeklampsi semptomlarının gelişmesine yol açtığı gözlenmiştir. Levine ve diğ. (2004) sFlt-1 düzeyindeki artışın PE'nin klinik olarak ortaya çıkışından 5 hafta önce algılanabileceğini göstermişlerdir. Widmer ve diğ. (2007) PE gelişen gebelerde sFlt-1 artışını 25. haftada saptamışlardır. Moore ve diğ. (2007) 34. haftada PE gelişen gebelerde, gebeliğin 22-26. haftalarında özel bir algoritma kullanılarak PE gelişiminin tahmin edilebileceğini öne sürmüşlerdir.

sFlt1, Flt1'in alternatif kırılması ile oluşur, VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) ve PlGF (plasental büyüme faktörü) için endotelial reseptördür (Maynard ve Karumanchi, 2011). sFlt-1 plasentada üretilip anne dolaşımına salgılanan anti-anjiyogenik bir proteindir. sFlt-1 gebelik boyunca anjiyogenik dengenin düzenlenmesinde kilit rol oynar (Herraiz ve diğ., 2015). sFlt1'in in vitro etkileri vazokonstriksiyon ve endotelial fonksiyon bozukluğudur. Preeklampside sFlt1'in plasental ekspresyonu artmıştır ve anne dolaşımında sFlt1 düzeyindeki belirgin artış ile karakterizedir (Maynard ve Karumanchi, 2011). PlGF ise pro-anjiyogenez faktörlerinden biridir. Plasental yetersizlik sonucu anjiyogenez düzenleyici faktörlerde dengesizlik oluşur. Preeklampside sFlt-1 düzeyinde artış meydana gelirken PlGF'de azalma görülür (Herraiz ve diğ., 2015). Son zamanlarda sFlt1/PlGF oranının preeklampsi gelişebileceğinin tahmin edilmesinde kullanılması gündeme gelmiştir.

PlGF de VEGF ailesinin bir üyesidir. PlGF, VEGFR-1 ve VEGFR-2'ye bağlanabilir ve anjiyogenezi uyarır: PlGF'nin reseptörü ile etkileşimi sFlt-1 tarafından engellenebilir ve bu durum endotelial fonksiyon bozukluğuna neden olur. Normal gebelikte PlGF serum konsantrasyonu 8-12. haftalarda artmaya başlar ve 29-32. haftalarda en yüksek değerine ulaşır ve 33-40. haftalarda düşer (Laganà ve diğ., 2016). PE boyunca PlGF düzeyleri kontrole kıyasla oldukça düşüktür (Polsani ve diğ., 2013). Maynard ve diğ. (2003) PE hastalarında anne dolaşımında PlGF düzeylerinin azaldığını ortaya koymuşlardır. Bir derlemede PE gelişen gebelerde 2. ve 3. trimesterde PlGF düzeylerinde azalma olduğunu ve bunun hastalığın şiddeti ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Widmer ve diğ., 2007). Birçok araştırmacı serum PlGF ve sFlt-1 verilerinin birleştirilmesi ile PE gelişiminin tahmin edilebileceğini ileri sürmektedir (Levine ve diğ., 2004; Moore Simas ve diğ., 2007; Stepan ve diğ., 2015; Herraiz

ve diğ., 2015). Erken tanıda sFlt-1/PlGF oranındaki artış esas alınmaktadır (Ohkuchi ve diğ., 2010; Schoofs ve diğ., 2014).

Proteomik teknolojisi birçok hastalığın etiyolojisi ve patofizyolojisine açıklık getirmiştir. Proteomik uygulamalar birçok hastalığın mekanizmasının anlaşılmasına, tanı ve tedavinin geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır (Hernandez-Nunez ve Valdes-Yong, 2015). Preeklampsinin proteomik yöntemlerle araştırılması çok da eski olmayan bir yaklaşımdır. Buhimschi ve diğ., (2008) idrarda yaptıkları proteomik çalışmada SERPINA1 ve albümini biyomarkır olarak önermişlerdir. Atkinson ve diğ., (2009) yaptıkları çalışmada PE ile kardiyovasküler hastalıklar arasındaki bağlantıya çekmişlerdir. Bu araştırmacılar, plazma ve serum örneklerinde 2D-DIGE yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada apoE3 glikoizofom düzeyinde azalma tespit etmişlerdir. Ancak çalışma 36-38. haftalarında olan gebelerle yapıldığı için erken tanıda kullanılabilirliği tartışmalıdır. Blumenstein ve diğ., (2009) 2D-DIGE kullanarak yaptıkları proteomik çalışmada plazmada fibrinojen γ zinciri ve α -1-antikimotripsin ekspresyonlarının fazla olduğunu bulmuşlardır.

Preeklampsinin erken dönemde öngörülmesi hastanın yakın gözetim altında tutulmasını ve hastalıktan koruyucu önlemlerin alınmasını sağlar. Preeklampside plasenta perfüzyonu, vasküler direnç, plasenta ürünleri, renal ve endotelyal fonksiyon bozukluğu, oksidatif stres ve fetüs tarafından üretilen ürünlere ilişkin birçok test geliştirilmiştir (Steeegers ve diğ., 2010). İlgili literatür incelendiğinde, plazmada anjiyogenez ve anti-anjiyogenez faktörlerinin erken tanı amacıyla kullanımının tartışmalı olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada, PE gelişen gebeler ile sağlıklı gebelerden elde edilen plazma örneklerinde proteomik çalışma yapılarak, iki grup arasında ekspresyon düzeyleri farklı bulunan proteinlerin anjiyogenez (PlGF) ve anti-anjiyogenez (sFlt-1) faktörleriyle ilişkisinin araştırılması, böylece hastalığın patogenezinin aydınlatılmasına katkı sağlanması hedeflenmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1 PREEKLAMPSİ

Kadınların %10'u gebeliği boyunca yüksek tansiyon ile karşılaşırken, gebelerin %2-8'inde preeklampsi (PE) gelişir. Gebelik sırasında annede aniden ortaya çıkan hipertansiyon ve idrarda protein atılımı ile karakterize bu hastalık karaciğer, böbrekler, beyin ve pıhtılaşma sisteminde problemlere yol açabilir (Atkinson ve diğ., 2009). Anne karnındaki bebekte gelişme geriliğine ve prematüre doğumlara neden olur.

Preeklampsinin farklı sistemlerde oluşturabileceği komplikasyonlar şunlardır (Duley, 2009):

- Merkezi sinir sistemi
 - Eklampsi (bilinç kaybı)
 - Serebral hemoraji (inme)
 - Serebral ödem
 - Kortikal körlük
 - Retinal ödem
 - Retinal körlük
- Renal Sistem
 - Renal kortikal nekroz
 - Renal tübüler nekroz
- Solunum Sistemi
 - Pulmoner ödem
 - Laringeal ödem
- Karaciğer
 - Sarılık
 - HELLP sendrom
 - Hepatik rüptür
- Koagülasyon Mekanizması
 - Yaygın damar içi pıhtılaşma
 - Mikroanjiyopatik hemolitik anemi

- Plazenta
 - Plazental enfarktüs
 - Plazental abrupsiyon
- Bebek
 - Ölüm
 - İntrauterin gelişme geriliği
 - Erken doğum

Anne ölümlerinin %10-15'i preeklampsi ve eklampsi ile ilişkilidir (Duley, 2009). Preeklampsi ve eklampsi hala maternal ve perinatal (gebeliğin 20. haftasından sonraki dönem) mortalitenin ve morbiditenin önemli nedenleri arasında sayılmaktadır. Preeklampsinin engellenmesinde tek müdahale antitrombosit ajan kullanımı, düşük doz aspirin ve kalsiyum takviyesi olarak görülmektedir. Yani preeklampsinin tedavisi semptomların giderilmesine yöneliktir (Duley, 2009).

2.2 PREEKLAMPSİNİN TANISI

Preeklampsinin klasik tanısı 20. gebelik haftasından sonra gelişen hipertansiyona eşlik eden proteinüridir (Gezginç ve diğ., 2013). Preeklampsinin tanısı ile ilgili standartlar ACOG (Amerikan Obstetrik ve Jinekoloji Koleji) tarafından belirlenmiştir (Tablo 2.1).

ACOG (2013)'a göre gebelikte hipertansiyon 4 kategoride incelenmektedir:

1. Preeklampsi-eklampsi,
2. Kronik hipertansiyon (herhangi bir nedenle oluşan),
3. Süperimpoze preeklampsi ile kronik hipertansiyon,
4. Gestasyonel hipertansiyon.

Proteinüri yoksa, hipertansiyon yanında trombositopeni (platelet sayısının 100.000/ μ L'den az olması), karaciğer fonksiyonunda bozulma (karaciğer transaminazlarının normalin 2 katına yükselmesi), yeni gelişen böbrek yetmezliği (serum kreatinin değerlerinin 1.1 mg/dL'den yüksek olması ya da böbrek hastalığı yoksa serum kreatinin değerinin iki katına çıkması), pulmoner ödem ya da yeni gelişen serebral ya da görsel bozukluklar ile preeklampsi tanısı konur (ACOG, 2013). Preeklampsinin tanısında geçerli kriterler Tablo 2.1'de detaylı olarak verilmiştir.

Tablo 2.1: Preeklampside Tanı Kriterleri (ACOG 2013).

Kan Basıncı	Daha önce normal kan basıncına sahip kadının 20. gebelik haftasından sonra 4 saat ara ile en az 2 kez alınan ölçümde Sistol ≥ 140 mm Hg, diastol ≥ 90 mm Hg ise, Sistol ≥ 160 mm Hg ya da diastol ≥ 110 mm Hg olduğunda, antihipertansif tedavinin zamanında başlatılmasını kolaylaştırmak için hipertansiyon tanısı kısa sürede (birkaç dakika) konulabilir.
Proteinüri	24 saatlik idrar biriktirmede ≥ 300 mg (ya da bu oran belirli saatte toplanarak değer hesaplanabilir) Ya da Protein/kreatinin ≥ 0.3 (mg/dL) İdrar ölçüm stribinde +1 okuma (sadece diğer yöntemler yoksa uygulanır)
Ya da proteinüri yoksa, yeni teşhis edilen hipertansiyon ile birlikte aşağıdakilerden herhangi birisinin yeni teşhisi	
Trombositopeni	Platelet sayısı $< 100.000/\mu\text{L}$
Böbrek yetmezliği	Serum kreatinin konsantrasyonu > 1.1 mg/dL ya da diğer böbrek hastalıkları yoksa serum kreatinin konsantrasyonu normalin iki katı ise
Karaciğer fonksiyon bozukluğu	Kan karaciğer transaminaz konsantrasyonlarının normal konsantrasyonunun iki katına çıkması
Pulmoner ödem	Şiddetli preeklampsia durumunda gelişebilir
Serebral ya da görsel bozukluklar	Şiddetli preeklampsia durumunda gelişebilir

2.3 PREEKLAMPSİNİN ETİYOLOJİSİ VE PATOGENEZİ

Preeklampsinin etiyolojisi hala bilinmemektedir. Etiyopatogenezi konusunda hala yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Gezginç ve diğ., 2013). Preeklampsinin nedenini açıklamak için çok sayıda mekanizma önerilmiştir. Bunlardan önemli olan bazıları şunlardır:

1. Uterus damarlarının anormal trofoblastik invazyonu ile plasental implantasyon
2. Maternal, paternal (plasental) ve fetal dokular arasındaki immünolojik toleransta uyumsuzluk
3. Normal gebeliğin kardiyovasküler veya inflamatuvar değişikliklerine annenin uyumsuzluğu
4. Kalıtsal yatkınlık oluşturan genler ve epigenetik etkiler dahil olmak üzere genetik faktörler (Cunningham ve diğ., 2018).

Anjiyogenik faktörler, kardiyovasküler maladaptasyon ve vazokonstriksiyon, anormal plasenta yerleşimi, genetik yatkınlık, fetoplasental ve anne dokuları arasında immünolojik tolerans, trombosit aktivasyonu, vasküler endotelial hasar ve fonksiyon bozukluğu preeklampsinin patogenezeine ilişkin başlıca faktörler olarak önerilmektedir (Leeman ve Fontaine, 2008).

Öne sürülen teorilerden ve önemli faktörlerden bu tezin konusuyla ilgili olanlar, aşağıdaki başlıklarda ayrı ayrı ele alınmakta ve moleküler boyutta irdelenmektedir.

2.3.1 Plasentada Vaskülogenez ve Anjiyogenez

İnsan plasentasında vaskülogenez ve anjiyogenez kan damarlarının oluşumu boyunca art arda gelen süreçlerdir. Kan damarlarının oluşumu olan vaskülogenez, pluripotent mezenkimal hücrelerin hemanjiyogenik kök hücrelere farklılaşması ile sağlanır. Peşinden gelen anjiyogenez evresi ise hali hazırda bulunan damarlardan yeni damarların oluşumudur (Demir ve diğ., 2007).

Endotelial hücreler ilk önce ilkel bir vasküler ağ oluşturur. Vaskülogenez süreci üç aşamaya bölünmüştür: (1) fibroblast büyüme faktörü (FGF) aracılığıyla hemanjiyoblastların ve anjiyoblastların indüksiyonu; (2) vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) aracılık ettiği ilk damarların birleşmesi ve (3) vaskülogenezden anjiyogenez'e geçişi indüklemek için karşılık gelen reseptörlerin (FGF ve VEGF) aktivasyonu (Şekil 2.1) (Wang ve Zhao, 2010).

Plasenta gelişiminin erken evrelerinde sitotrofoblastlar vaskülogenez ve anjiyogenezi tetikler. Gebelik ilerledikçe Hofbauer ve stromal hücreler kan damarı gelişim görevini devralır. Bu aşamada VEGF ailesi ve bunların Tie-1, Tie-2 gibi reseptörleri önemli rol oynar (Demir ve diğ., 2007). Şekil 2.1 plasental vasküler gelişim boyunca vaskülogenez ve anjiyogenez ile ilişkili VEGF, FGF ve anjiyopoietinin (Ang) fonksiyonlarını resmetmektedir (Wang ve Zhao, 2010).

2.3.2 Vasküler Fonksiyon Bozukluğunun Moleküler Mekanizması

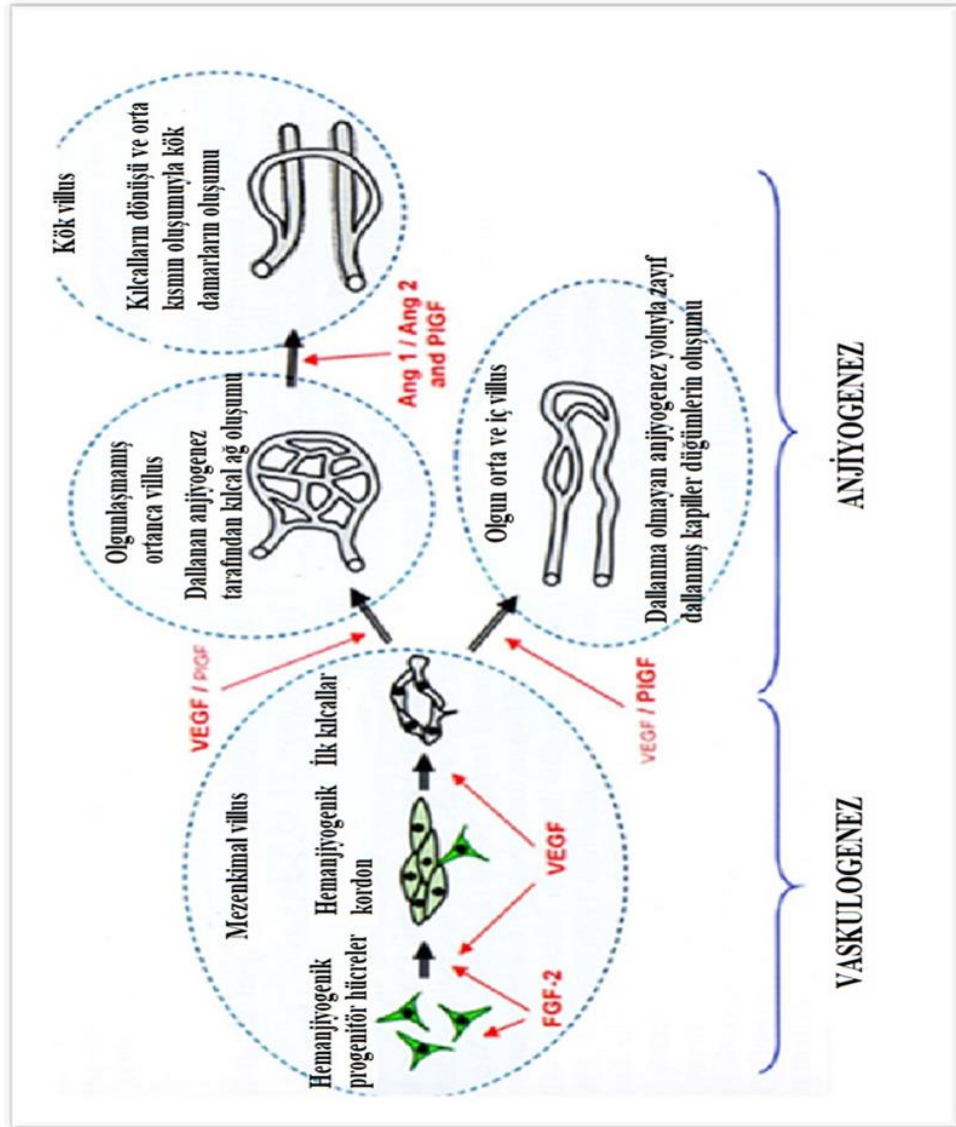
Vasküler endotel, damar sistemi içerisinde yer alan, tek katlı yassı epitelyum yapısında olan ve birçok düzenleyici etkiye sahip hücreler topluluğudur (Günel ve diğ., 2020). Endotel, damar sistemi içerisinde yer alan, tek katlı yassı epitelyum yapısında olan ve birçok

düzenleyici etkiye sahip hücrelerdir. Endotelin temel görevi kanın akışkanlığının sağlanması, trombosit agregasyonu ve damar tonüsünün ayarlanmasıdır (Feletou, 2011). Temel fonksiyonlarda bir düzensizlik meydana geldiğinde vücut için olumsuz sonuçlar doğuracak patolojik süreçlerden de endotel sorumlu olmaktadır. Endotel bu gibi işlevleri bazı mediatörler (nitrik oksit, endotelinler, prostaglandinler, anjiyotensin 2 gibi) aracılığıyla yapmaktadır (Yaylalı ve Küçükaslan, 2011).

Preeklamps, gebelik boyunca ve sonrasında ciddi kardiyovasküler risklere yol açan, anneye ait vasküler fonksiyon bozukluğu ile ilişkilidir. Anneye ait sendromun bir parçası olan endotelyal fonksiyon bozukluğu periferel direncin artmasıyla sonuçlanır. Preeklampsinin asıl nedeni bilinmezken plasenta iskemisi de plasenta oluşumunda yetersizliğe neden olur. Plasantanın bu kusurlu gelişimi, çok sayıda pro- ve anti-anjiyogenik faktörlerin ve inflamasyon aktivatörlerinin anne dolaşımına salınmasını uyarır. Bu faktörler vasküler fonksiyonu ve endotelyumu belirgin şekilde etkileyen (endotelyal oksidatif stresin artması gibi) kritik düzenleyicilerdir (Brennan ve diğ., 2014).

Dolaşımdaki bu faktörler kısmen plasentadan kökenlenir, plasentada ve annede vasküler fonksiyon bozukluğuna yol açar (Redman ve Sargent, 2003). Plasantanın alınmasıyla klinik semptomlar geçse de annenin yaşamının ilerleyen zamanlarında kardiyovasküler hastalıklara yakalanma riski yüksektir (Fraser ve diğ., 2012). Vasküler fonksiyon bozukluğu ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıkların erken belirticidir ve bu sendromdan etkilenen ve preeklamps gelişen bir gebelikten yıllar sonra da devam eden preeklampsili gebeliklerin ortak özelliğidir (Ramsay ve diğ., 2003).

Sistemik endotel fonksiyon bozukluğu preeklampsinin patofizyolojisinde merkezi rol oynar ve artan vasküler direnç ile hipertansiyonun altında yatan mekanizmadır (Brennan, Morton ve Davidge, 2014). Mekanik ve kimyasal uyarılara yanıt olarak endotelyal hücreler, vasküler düz kas gevşemesini [endotelyumdan türevlenen gevşeme faktörleri (EDRF'ler)] ya da kasılmasını [endotelyumdan türevlenen kasılma faktörleri (EDCF'ler)] teşvik eden vasoaktif moleküller salar. Böylece kas tonusunu ayarlar (Feletou, 2011). Anneye ait sistemik dolaşımda artan damar daralması ve azalan damar genişlemesi ile karakterize olan EDRF ve EDCF biyoyararlanımı arasındaki dengesizlik ve vasküler düz kas tarafından bu faktörlere verilen yanıtta değişiklikler preeklampsinin hipertansif fenotipinden sorumlu olabilir (Goulopoulou ve Davidge, 2014).



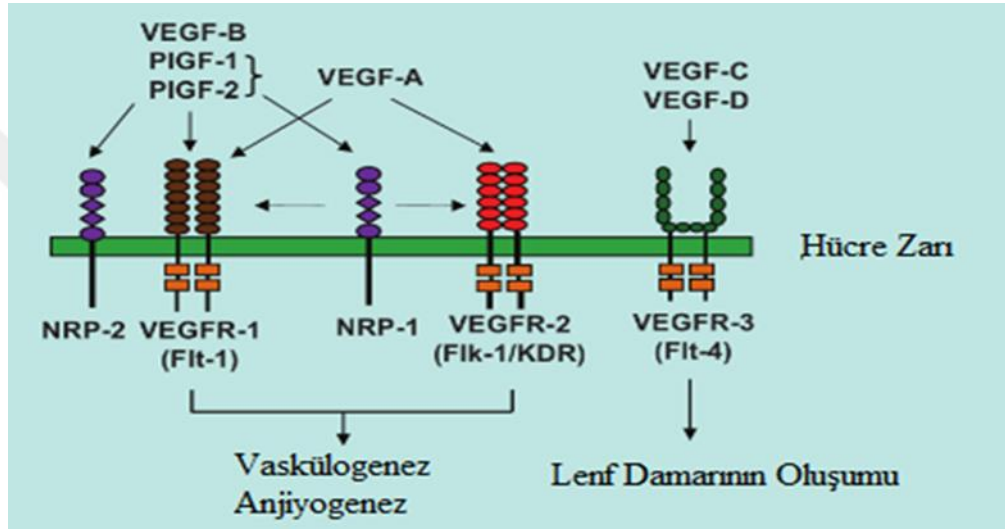
Şekil 2.1: Vaskulogenez ve anjiyogenezde önerilen FGF, VEGF, PIGF ve anjiyopoietin mekanizmaları ve bunların villöz gelişim ve varsayılan parakrin kontrolündeki dağılımı (kırmızı). (Wang ve Zhao, 2010).

Preeklampsia gelişen gebeliklerde endotelyuma bağımlı gevşemenin azalması kısmen nitrik oksit (NO) (Johal ve diğ., 2013) ve prostasiklinin (PGI₂) (Chavarria ve diğ., 2003) biyoyararlanımındaki azalmaya bağlıdır. Çözünebilir guanilil siklaz/siklik guanozin monofosfat (sGC/cGMP) bağımlı ya da bağımsız yollarla NO, vasküler düz kas gevşemesini başlatır (Pinheiro da Costa ve diğ., 2006). PGI₂, vasküler düz kas gevşemesini reseptör aracılı siklik adenosin monofosfat (cAMP) bağımlı mekanizmalar yoluyla başlatan araşidonik asit metabolizmasının ürünüdür. Preeklampside endotelial NO sentaz (eNOS) üretiminde artış

görülür (Davidge, 1995), ancak arjinaz düzeyindeki artış (NOS' un resiprokal düzenleyicisi) (Sankaralingam, Xu ve Davidge, 2010) asimetrik dimetilarjinin (ADMA) (doğal NOS inhibitörü) düzeyindeki artış (Alpoim ve diğ., 2013) ve peroksinitrit oluşumundaki (süperoksit anyonları tarafından NO'nin süpürülmesiyle oluşan) artış (Sankaralingam ve diğ., 2009) NO biyoyararlanımının azaldığını düşündürür (Şekil 2.2) (Gouloupoulou ve Davidge, 2014).

Arjinaz enzimindeki artış [nitrik oksit (NO) ve nitrik oksit sentaz (NOS) karşılıklı düzenler], doğal nitrik oksit inhibitörü olan asimetrik dimetilarjinin (ADMA) düzeyindeki ve peroksinitrit oluşumundaki (süperoksit anyonları tarafından NO' in süpürülmesi yoluyla oluşan) artış, NO biyoyararlanımının azalmasına, oksidatif stresin artmasına ve endotelyuma bağlı gevşemeye katkıda bulunur (Şekil 2.2, 1). Fosfodiesterazın (PDE) artması nedeniyle sıklık guanozin monofosfat (cGMP) seviyesinde azalma ve çözünebilir guanilil siklaz (sGC) aktivitesi vasküler düz kas gevşemesini düşürür (Şekil 2.2, 2). Miyoendotelial boşluk bağlantılarının (MEGJ'ler) fiziksel olarak bozulması, azalan sistasyonin-g-liyaz (CSE) aktivitesi nedeniyle hidrojen sülfürün (H_2S) üretiminde azalma ve küçük- (SKCa) ve orta- (IKCa) iletkenlikte kalsiyumla aktifleşen potasyum kanallarının aşağı yönde düzenlenmesi, endotel kaynaklı aşırı kutuplanmanın (EDH) azalmasına yol açar. Bu durum damar genişlemesinin daha az olmasına katkıda bulunur (Şekil 2.2, 3). Matriks metalloproteinazların (MMP'ler) ve tromboksan A2 (TxA2)'nin artan aktivitesine bağlı olarak Endotelin (ET)-1'in artan üretimi, sırasıyla ET reseptörü A (ETA) ve TxA2 reseptörü (TP)'nün aktifleşmesiyle damar büzülmesinde artış meydana gelir (Şekil 2.2, 4). Anjiyotensin (Ang) I reseptör (AT1R) sinyalinin artmasıyla damar büzücü yanıtlar etkili hale gelir. AT1R otoantikorlarının (AT1-AA'lar) dolaşımdaki seviyesi AT1R'nin sinyalini de, dolayısıyla damar büzülmesini de artırır (Şekil 2.2, 5). Oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein (oxLDL) dolaşımda artar ve endotel hücrelerinde düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör-1 (LOX-1)'e bağlanır ve onu aktifleştirir. Bu durum süperoksit ve peroksinitrit üretimine neden olur (Şekil 2.2, 6). Anti-anjiyogenik faktörlerden fms-benzeri tirozin kinaz- 1 (sFlt-1)'in ve çözünebilir endoglin (sEng)'in aşırı üretimi sırasıyla, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'nün plasenta büyüme faktörü (PlGF)'nün ve dönüştürücü büyüme faktörü beta ($TGF-\beta$)'nın damar genişletici özelliğini tersine çevirir. Mitokondriyal ve fetal DNA'yı içeren plasentadan türevlenmiş hücre dışı serbest DNA (cfDNA) ve sinsityotrofoblasttan türevlenmiş mikroparçacıklar (STBM'ler), oksidatif stres ve inflamasyonu arttırmak için endotel hücreleri, monositler ve nötrofillerle etkileşime girer (Şekil 2.2, 7) (Gouloupoulou ve Davidge 2015).

anjiyogenik süreçte dengesizliğe yol açar. Hipoksi koşullar VEGF ve VEGFR-1 (Flt-1)'i teşvik eder fakat PlGF üretimini down-regüle eder. Flt-1 ekspresyonundaki bu değişim sadece villöz damar gelişimini etkilemekle kalmaz, aynı zamanda çözünabilir formunun (sFlt-1) anne dolaşımına fazla miktarda salıverilmesine neden olur. Trofoblastlardan salınan sFlt-1 düzeyindeki artış preeklampsinin gelişiminde kritik patojenik faktörlerden biridir. sFlt-1'in geni preeklampatik plasentada up-regüledir. Kan dolaşımında aşırı sFlt-1 azalan serbest VEGF ve PlGF ile ilişkilidir (Wang ve Zhao, 2010).



Şekil 2.3: VEGF ailesi üyelerinin reseptörleri ile etkileşimi ve sonuçları (Wang ve Zhao, 2010).

2.3.3.1 Plasental Büyüme Faktörü (PlGF)

PlGF, VEGF ailesine üye anjiyogenik bir faktördür (Wang ve Zhao, 2010). PlGF trofoblast büyümesi ve farklılaşmasını kontrol eder. PlGF'nin 4 farklı alternatif kırpılmış formu vardır. Böbrek hasarı olmadığı durumlarda idrardan filtre edilebilen küçük bir proteindir. PlGF, VEGFR-1 ve VEGFR-2'ye bağlanarak anjiyogenezi uyarır. PlGF'nin reseptörü ile etkileşimi sFlt-1 tarafından engellenebilir; bu durum endotelial fonksiyon bozukluğuna neden olur. PlGF villöz sitotrofoblastlarda ve sinsityotrofoblastlarda eksprese olur ve plasentanın oluşumunda anahtar rol oynar. PlGF endotelial hücrelerde, doğal öldürücü (NK) hücrelerde, kemik iliği hücrelerinde ve keratinositlerde tanımlanmıştır (Lagana ve diğ., 2016).

2.3.4 Antianjiyogenik Faktörler: Soluble fms-benzeri tirozin kinaz-1 (sFlt-1)

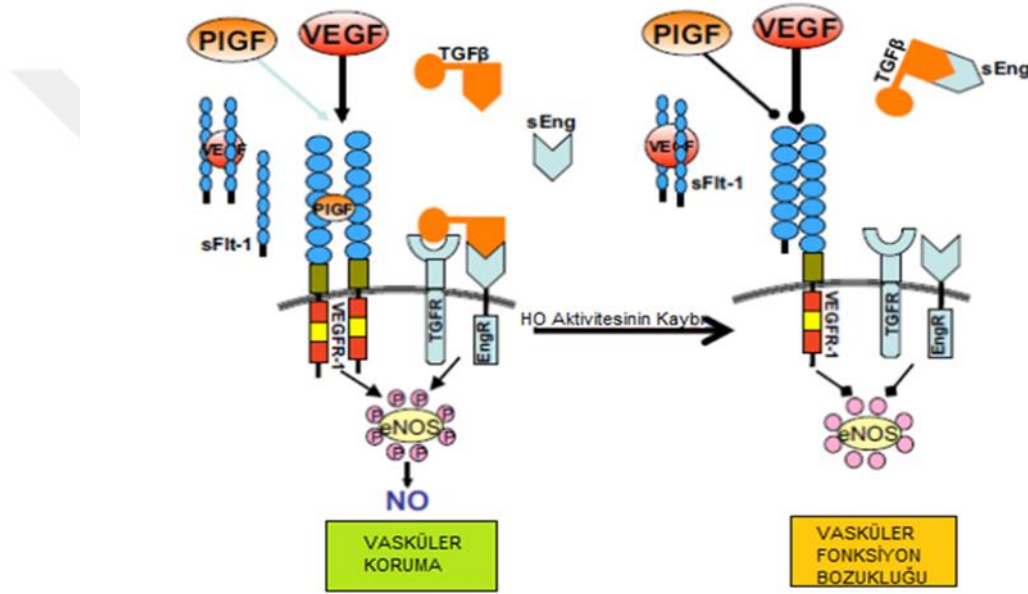
Çözünebilir Flt-1 (sFlt-1) ya da sVEGFR-1, kan damarlarının büyümesini sağlayan proteinleri etkisiz hale getiren bir tirozin kinazdır. sFlt-1, çeşitli dokulardan üretilen VEGF reseptör 1 (Flt-1)'in farklı kırılması ile oluşur. Bu proteinler, potansiyel anjiyogenik büyüme faktörü VEGF'nin reseptörü olarak rol oynar. VEGF ailesinde anjiyogeneze dahil olan iki transmembran reseptör vardır: VEGFR-1 (Flt-1) ve VEGFR-2, fetal karaciğer kinaz 1 (Flk1) ya da kinaz insert alt ünitesi reseptörü (KDR) tarafından kodlanır. Mononükleer hücrelerin fonksiyonunu etkilemeden bile VEGFR-1 embriyogenez sırasında zarar verici rol oynar. VEGFR-1 ve sFlt-1'in VEGF-A (vasküler endotelial büyüme faktörü A)'ya bağlanma afinitesi VEGFR-2'den oldukça yüksektir. Bu durum dolaşımda aşırı miktarda bulunan sFlt-1'in, VEGFR-1 ve VEGFR-2 ile etkileşimini engelleyerek plasental büyüme faktörü (PlGF)'nün normal sinyalleşme yolağı VEGF'yi antagonize ettiğini açıklar. Buna ek olarak sFlt-1 inaktif VEGFR-2 ile heterodimer oluşturabilir (Lagana ve diğ., 2016).

Flt-1'in alternatif kırılmasıyla sFlt-1 oluşur. sFlt-1, Flt-1'in ekstraselüler ligand-bağlama domenini içerirken intraselüler ve transmembran sinyal domenini içermez. Bundan dolayı, VEGF ve PlGF'ye bağlandığı ve antagonize ettiği yerde dolaşıma salgılanır. sFlt-1, VEGF ve PlGF için endotelial reseptördür (Maynard ve Karumanchi, 2011). VEGF özellikle endotelial hücrelerde eksprese olur ve sFLT-1, VEGF'nin sinyalini engelleyerek endotelial fonksiyon bozukluğunu teşvik eder (Karumanchi ve Epstein, 2007).

Preeklampside sFlt-1'in plasental ekspresyonu artar ve bu durum anne dolaşımında sFlt-1 düzeylerindeki belirgin artış ile ilişkilidir (Maynard ve diğ., 2003). Klinik olarak hastalığın başlangıcından birkaç hafta önce dolaşımdaki sFlt-1 ve PlGF düzeyleri değişir ve hastalığın şiddeti ile doğru orantılıdır (Levine ve diğ., 2004; Chaiworapongsa ve diğ., 2004). Doğumdan birkaç gün sonra proteinüri ve hipertansiyonun düzelmesiyle eş zamanlı olarak sFlt-1 düzeyi de normalleşir (Maynard ve Karumanchi, 2011).

sFlt-1'in in vitro etkileri vazokonstriksiyon (damar büzülmesi) ve endotelial fonksiyon bozukluğudur. sFlt-1'in aşırı ekspresyonu plasental fonksiyon bozukluğu ile birlikte maternal endotelial fonksiyon bozukluğu ile bağlantılı anahtar mekanizmadır (Maynard ve Karumanchi, 2011).

VEGF aktivitesinin kaybı, preeklampsinin klinik belirtilerinin oluşmasından sorumludur. Çözünebilir Flt-1, bu ligandları dış etkenlerden ayırarak ve tam uzunlukta VEGF reseptörleri ile ligand reseptör dimerizasyonunu önleyerek, VEGF ve PlGF aracılı biyolojik aktivitelerin güçlü bir inhibitörü olarak işlev görür. Fonksiyonel endotelial tek katman NO'nin aktivasyonu yoluyla, normal endotelial fonksiyonunu yerine getirmek için VEGF, PlGF ve TGF β 'ya ihtiyaç duyar. Preeklampside, sFlt-1'in fazla olmasından dolayı koruyucu VEGF sinyali bloke durumdadır. Sonuçta PlGF düzeyinde düşüş ve dolaşımdaki çözünebilir Eng (sEng)'de artış meydana gelir (Şekil 2.4) (Ahmed 2011).



Şekil 2.4: Preeklampside vasküler koruma ve fonksiyon bozukluğunun şematik gösterimi (Ahmed, 2011).

2.3.5 İnflamasyonun Preeklampsinin Patogenezinin Etkisi

Preeklampsi, immün sistemin aşırı ve ilerleyici şekilde etkinleşmesiyle karakterizedir. PE'nin oluşumundan sorumlu bazı önemli faktörler; oksidatif stres, mononükleer fagositik sistemde anormal konsantrasyon ve aktivite, anjiyojenik ve antianjiyojenik faktörlerin seviyelerinde değişiklikler ve inflamazomların tetiklediği bozulmuş enflamatuvar yanıt. PE'deki enflamatuvar sürecin patofizyolojisini anlamak, büyük ölçüde yeni, hedeflenmiş anti-inflamatuvar tedavilere katkıda bulunabilir (Michalczyk. ve diğ., 2020).

İnflamazomların moleküler ağırlığı yüksektir ve doğal bağışıklık sisteminin kendi kendini organize eden çoklu polipeptid zincirlere sahip protein kompleksleridir. IL-1 β ve IL-18 salarak inflamasyon yanıtını başlatmak dışında, stres ve/veya hücrel infeksiyon durumunda, özenle kurulmuş alarm gibi, hücrel apoptoz düzenlemesinde sistemi tetikleyici ve arttırıcı rolü vardır. İnflamazom sinyalinin aktifleşmesinden sonra tehlike sinyali ve proptotik hücre ölümünü içeren inflamatuvar süreç, proinflamatuvar sitokinlerin gelişimini ve salgılanmasını kolaylaştırır. Normal gebeliklerde bağışıklık baskılanırken preeklampitik gebelerde aşırı aktiftir (Michalczyk ve diğ., 2020). Th1 hücreleri, NK hücreler, otoreaktif B hücreleri sitokinlerin aktifleşmesiyle maternal dolaşım ve uteroplasental üniteye doğal bağışıklığın aktivasyonunun ve inflamasyonun artışına neden olur. Bu bağışıklık değişiklikleri hamileliğin erken döneminde, rahim duvarına sığ trofoblast istilasına ve yetersiz spiral arter yeniden şekillenmesine neden olur (Cornelius, 2018). Rahim ve plasentanın düşük perfüzyonu (sıvı alması) plasentanın iskemisine neden olur bu durum oksidatif inflamasyon kaskadını başlatır ve antianjiyonez faktörlerin (sFlt-1, sENG) üretimini arttırır. (Helmo ve diğ., 2017).

2.3.6 Akut Faz Proteinlerinin Preeklampsinin Patogenezine Etkisi

Konağın enfeksiyon, inflamasyon ya da travma gibi çeşitli reaksiyonları akut faz yanıtı olarak bilinir ve ateş, lökositoz, hormon değişiklikleri, tamir sürecinde doku hasarını azaltmak için kas proteinlerinin tükenmesi gibi çok çeşitli patofizyolojik süreçleri kapsar (Jain ve diğ., 2011). Akut faz proteinleri (AFP), inflamasyona bağlı olarak plazmada en az %25 artan (pozitif AFP) veya azalan (negatif AFP) proteinler olarak tanımlanabilir (Tablo 2.2). AFP'lerin konsantrasyonlarındaki değişiklikler çoğunlukla hepatositler tarafından üretimindeki değişikliklere bağlıdır. İnflamasyon sürecinde sitokinler, AFP'lerin üretim sinyalini veren en önemli uyarıcıdır (Gabay ve Kushner, 1999). AFP'ler hepatositler tarafından üretildiği gibi epitel hücreler, endotel hücreler ve bağ doku tarafından da üretilir (Jain ve diğ., 2011).

Pozitif AFP'lerin opsonizasyon, mikroorganizma ve ürünlerinin yakalanması, kompleman sistemin aktifleştirilmesi, çekirdek fraksiyonu gibi hücrel atıklara bağlanması, enzimlerin nötralize edilmesi, serbest hemoglobin ve radikallerin süpürülmesi ve konak bağışık yanıtının değiştirilmesi gibi genel görevlerinin olduğu gözle bakılmaktadır (Gruys ve diğ., 2005).

Akut fazda plazmada konsantrasyonu artan ve taşıyıcı rolü olan proteinlerden olan haptoglobin hemoglobine güçlü şekilde bağlanır ve haptoglobinin anti-inflamatuvar etkisi

vardır. Lökositlerin hücre membranında başlıca reseptör olan CD11b/CD18 integrine bağlanır (Ghmati ve diğ., 1996). Ayrıca haptoglobinin anjiyogenezi uyardığı bilinmektedir (Jain ve diğ., 2011).

Fibrinojen, karaciğerden sentezlenen çözülebilir plazma glikoproteinidir. α , β , γ polipeptid zincirlerinin birbirine disülfid köprüleriyle bağlanmasından oluşur. AFP'lerden olup temel görevi trombin varlığında fibrine dönüşerek pıhtılaşmanın oluşturulmasıdır. Bunun yanında, fibrinoliz, faktör XIII aktivitesinin düzenlenmesi, büyüme faktörü bağlanması ve trombositler, lökositler, fibroblastlar ve endotelial hücreler dahil olmak üzere hücrelerle etkileşim gibi birçok biyolojik fonksiyonu vardır (Mosesson 2005).

Serin proteaz inhibitörü olan alfa-1 antitripsin (AAT) karaciğer hepatositlerinden dolaşıma salınır. Ayrıca AAT bir iltihaplanma, kortizol ve hipoksi yanıtı olarak salınır.

Tablo 2.2: İnsanda bulunan akut faz proteinleri (Gabay ve Kushner, 1999).

PLAZMADA KONSANTRASYONU ARTAN PROTEİNLER
Kompleman Sistem: C3, C4, C9, Faktör B, C1 inhibitörü, C4b-bağlayıcı protein, Mannoza bağlayıcı lektin
Koagülasyon ve fibrinolitik sistem: Fibrinojen, plazminojen, doku plazminojen aktifleştirici, ürokinaz, protein S, vitronektin, plazminojen-aktifleştirici inhibitör 1
Antiproteazlar: α_1 -proteaz inhibitörü veya α_1 -antitripsin, α_1 -antikimotripsin, pankreatik salgılayıcı tripsin inhibitörü, inter- α -tripsin inhibitörü
Taşıyıcı proteinler: Serüloplazmin, haptoglobin, hemopeksin
İnflamasyon yanıtının katılımcıları: salgılanan fosfolipaz A2, lipopolisakkarit bağlayıcı protein, interleükin-1-reseptör antagonisti, granülosit koloni-uyarıcı faktör
Diğerleri: C-reaktif protein, serum amiloid A, α_1 -asit glikoprotein, fibronektin, ferritin, anjiyotensinojen
PLAZMADA KONSANTRASYONU DÜŞEN PROTEİNLER
Albümin, transferrin, transtiretin, α_2 -HS glikoprotein, alfa-fetoprotein, tiroksin-bağlayıcı globülin, insülin-benzeri büyüme faktörü I, Faktör XII

2.4 PREEKLAMPSİ VE PROTEOMİK

Kütle spektrometrisi temelli proteomik çalışmalar, biyobelirteçlerin keşfi yoluyla karmaşık insan hastalıklarının patofizyolojisinin aydınlatılması için gerekli tüm özelliklere sahiptir. Gebelik ile ilişkili komplikasyonların protein biyobelirteçlerini ve biyolojik mekanizmalarını açıklığa kavuşturmak için, lazer kütle spektrometrisi, kütle spektrometresine bağlı sıvı kromatografisi veya kapiler elektroforez ile yukarıdan aşağıya proteomik ve peptidomik profillemeye ve sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS) ile aşağıdan yukarıya kantitatif proteomik ve hedeflenmiş proteomik uygulanmıştır. Bu çalışmalarda serum, plazma, idrar, amniyotik sıvı, servikovajinal sıvı, plasenta dokusu ve sitotrofoblastik hücreler gibi materyaller kullanılmıştır. Sağlıklı gebelikleri karmaşık gebeliklerden ayırabilmek için çok sayıda biyobelirteç veya biyobelirteç adayı önerilmiştir. Ancak preeklampsisi ve erken doğum ile ilgili olarak soru işaretleri devam etmektedir (Law ve diğ., 2015).

Bu amaçla yapılan proteomik çalışmalar incelendiğinde, Atkinson ve diğ. (2009), daha önce gebeliği olmamış ve preeklampsisi gelişen kadınların serum ve plazma örneklerinde yaptıkları çalışmada dolaşımdaki Apolipoprotein E (apoE) izoformlarındaki belirgin değişikliklerin preeklampsisi ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Pecks ve diğ. (2010), erken başlangıçlı preeklampsisi ile sağlıklı gebeler arasında serum proteinlerini kıyaslamışlar ve kütle spektrometrisi analizleri sonucunda transtiretin düzeylerinin preeklampsisi hastalarında kontrole kıyasla düşük olduğunu bulmuşlardır. Blankley ve diğ. (2013), kontrolle kıyasladıklarında erken başlangıçlı preeklampsisi için gebeliğe özgü glikoproteinleri biyobelirteç olarak önermişlerdir. Myers ve diğ. (2013) ise daha önce gebeliği olmayan sağlıklı bireylerde preeklampsinin gelişebileceğini öngören biyomarkır olarak insülin benzeri büyüme faktörü asit değişken alt ünitesini önermişlerdir.

Jung ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada serum ve idrar örneklerinde ELISA yöntemiyle nefrin proteininin markır olarak kullanılabileceğini önermektedir. Kolialexi ve diğ. (2017) gebeliğin birinci trimesterinde alınan kan örneklerinde proteomik analizler yapmışlar, kontrol grubuna kıyasla erken dönemde preeklampsisi gelişen hastalarda 12 proteinin ekspresyonunda farklılık olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca, bunlardan beta-2-glikoprotein-1, vitronektin ve haptoglobinin ELISA ile preeklampside düşük olduğunu doğrulamışlar, ekspresyon düzeyi değişen proteinlerin potansiyel biyomarkır olabileceğini, ancak daha ileri çalışmalara gerek olduğunu vurgulamışlardır. Nguyen ve diğ. (2019), yaptıkları araştırmada 1336 makaleyi

inceleyerek preeklampside proteomik verileri değerlendirmişlerdir. 710 proteinin miktarında değişim olduğunu, 13 ortak dolaşım proteininin bulunduğunu (alfa 1 antitripsin, klasterin, fibrinojen gama zinciri, fibronectin 1, seruloplazmin, histidine zengin glikoprotein, hemoglobin beta alt ünitesi, fibrinojen alfa zinciri, fibrinojen beta zinciri, hemopeksin, serum albümin, gebelik zonu proteini, gelsolin) ve bunlardan bazılarının daha önce preeklampsisi için olası biyomarkır olarak değerlendirilmediğini rapor etmişlerdir. Çarpıcı bir şekilde 3. trimesterde 9 ortak proteinin (alfa 1 antitripsin, klasterin, fibrinojen gama zinciri, fibronectin 1, seruloplazmin, histidine zengin glikoprotein, hemoglobin beta alt ünitesi, fibrinojen alfa zinciri, fibrinojen beta zinciri) preeklampsisi çalışmalarında birbirinden bağımsız şekilde potansiyel biyomarkır olarak değerlendirildiği saptanmıştır. Navajas ve diğ. (2021), PubMed’de 2004-2020 yılları arasında yayımlanan 69 çalışmayı incelemişlerdir. Bu çalışmalardan 32 tanesi serum ve plazma örnekleri ile yapılmıştır. Birbirinden bağımsız 4 çalışmada saptanan proteinler ortak proteinler olarak belirlenmiştir. Sonuçta serum/plazmada ekspresyon düzeyi değişen 29 protein saptanmıştır. Bunlardan Nguyen ve diğ. (2019)’nin yaptığı çalışma ile ortak olanları: α -1-antitripsin, fibrinojen gama zinciri, fibronectin, histidine zengin glikoprotein, klasterin, gebelik zonu proteindir. Preeklampside biyolojik materyal olarak kan örnekleri kullanılan çalışmalarda gebeliğin 3. trimesterinde ekspresyonları değişen proteinlerin listesi Tablo 2.3’te verilmiştir. Bu tabloda proteomik yöntemler dışında biyokimyasal yöntemlerle (ELISA, immünotürbidimetrik gibi) veri elde eden yayınlara da yer verilmiştir.

Tablo 2.3: Preeklampside kan örnekleri ile yapılan çalışmalarda 3. Trimesterde ekspresyon düzeyi değişen proteinler.

Ekspresyon düzeyi değişen proteinler (değişim şekli)	Biyokimyasal çalışmaların referansları	Proteomik çalışmaların referansları
Alfa 1 antitripsin (artma)	Catarino ve diğ., 2012; Espana ve diğ., 1991	Kolialexi ve diğ., 2017; Auer ve diğ., 2010
Seruloplazmin (artma)	Nicolic ve diğ., 2016; Guller ve diğ., 2008; Engin-Üstün ve diğ., 2005; Vitoratos ve diğ., 1999; Griffin, 1983; Fattah ve diğ., 1976;	Kim ve diğ., 2016; Liu ve diğ., 2011
Klasterin (artma)		Kolla ve diğ., 2012; Liu ve diğ., 2011; Bluemenstein ve diğ., 2009
Fibrinojen alfa zinciri (artma)		Dai ve diğ., 2017; Liu ve diğ., 2011; Bluemenstein ve diğ., 2009
Fibrinojen beta zinciri (artma)		Liu ve diğ., 2011; Bluemenstein ve diğ., 2009; Atkinson 2009
Fibrinojen gama zinciri (artma)		Kolla ve diğ., 2012; Liu ve diğ., 2011; Bluemenstein ve diğ., 2009,
Fibronektin 1 (artma)	Doğan ve diğ., 2014; Powers ve diğ., 2008, Aydın ve diğ., 2004; Ostlund ve diğ., 2001; Shaarawy ve diğ., 1998; Paternoster ve diğ., 1996,	Mary ve diğ., 2017; Kolla ve diğ., 2012; Liu ve diğ., 2011; Rasanen ve diğ., 2010
Hemoglobin beta alt ünitesi (artma)		Auer ve diğ., 2010
Histidine zengin glikoprotein (artma)		Auer ve diğ., 2010; Rasanen ve diğ., 2010
Hemopeksin (azalma)	Anderson ve diğ., 2018; Gram ve diğ., 2015; Bakker ve diğ., 2007	Mary ve diğ., 2017; Auer ve diğ., 2010
Gelsolin (azalma)	Nadkarni ve diğ., 2016	Kim ve diğ., 2016; Auer ve diğ., 2010; Bluemenstein ve diğ., 2009
Gebelik bölgesi proteini (azalma)		Kim ve diğ., 2016; Liu ve diğ., 2011; Rasanen ve diğ., 2010; Auer ve diğ., 2010
Serum albümin (azalma)	Dai ve diğ., 2017	Auer ve diğ., 2010

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 KAN ÖRNEKLERİNİN ALINMASI

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından alınan 14/06/2016 Tarih ve 216203 Sayılı etik kurul onayı ile hasta ve kontrol grubu kan örnekleri Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Doğum Anabilim Dalı'ndan elde edildi (Ek-1). Hastaların sözlü ve yazılı onamları alındı.

Preeklampsi tanısı konulan hastalardan ve sağlıklı gebelerden (31.-33. haftada) içeren 2 mL'lik iğne tüpe kan örneği alındı. Alınan tüpler +4°C'de, 3500×g'de, 15 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüjleme sonrası kanın plazma kısmı (üst faz) pipetle alınarak 200 µL olacak şekilde ependorflara bölündü. Plazma örnekleri deneyler yapılncaya kadar -80°C'de saklandı.

Hastalara ait demografik veriler ile biyokimya test sonuçları (AST, ALT, Hematokrit, Hemoglobin, Üre, Kreatinin, Lökosit, İdrarda Albümin) Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Doğum Anabilim Dalı arşivinden alındı.

3.2 İNSAN ÇÖZÜNÜR VASKULAR ENDOTELYAL FAKTÖR RESEPTÖRÜ 1 (SFLT-1) ÖLÇÜMÜ

İnsan çözünür vaskular endotelyel faktör reseptörü 1 (sFlt-1)'in plazmadaki düzeyinin ölçülmesinde BT-Lab (Cat. No E0227Hu) sFlt-1 ELISA Kiti kullanıldı. Standart solüsyonlar kitin protokolüne göre hazırlandı. Standart solüsyonlarının hazırlanmasında izlenen dilüsyon işlemleri Tablo 3.1'de verildi. 30X konsantre yıkama tamponunun 20 mL'si distile su ile 500 mL'ye seyreltilerek 1X yıkama tamponu hazırlandı.

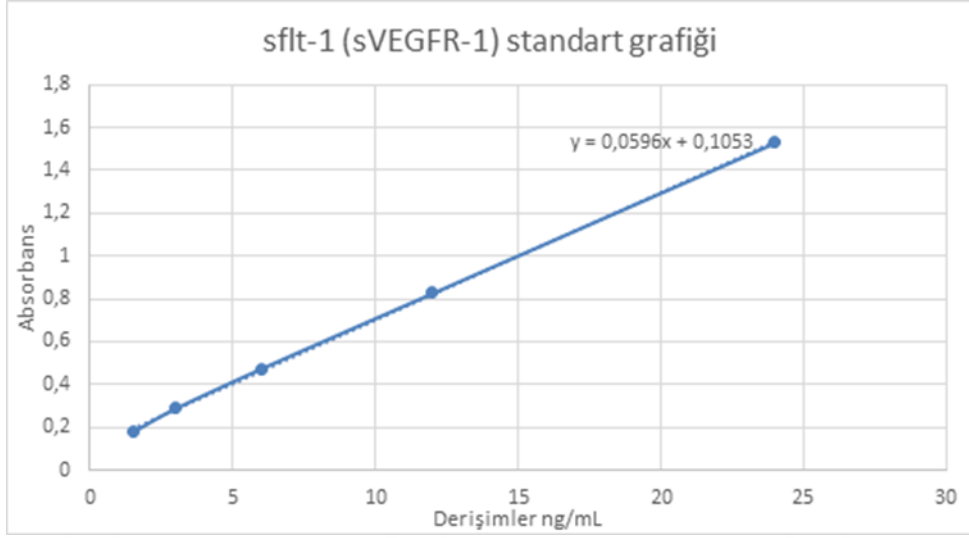
Deney Prosedürü:

1. Bütün reaktifler, standart solüsyonlar ve örnekler hazırlandı. Kullanmadan önce bütün reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Test oda sıcaklığında gerçekleştirildi.
2. Deney için gerekli strip sayısı belirlendi. Kullanmak için stripler çerçeveye eklendi.

3. Standart kuyularına 50'şer μL standartlar (S1-S5) eklendi.
4. Örnek kuyularına her bir örnekten 40'ar μL eklendi.
5. Üzerlerine önce 10'ar μL anti-sFlt-1/sVEGFR1, sonra 50'şer μL streptavidin-HRP eklendi ve iyice karıştırıldı. Mikrolaka, kit içeriğindeki kapatıcı bantlarla kaplandı ve 60 dakika 37°C 'de inkübe edildi.
6. Kapatıcı bantlar uzaklaştırıldı ve kuyular yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
7. Mikrolaka Whatman kâğıdı üzerinde kurutuldu.
8. Her bir kuyuya önce 50 μL substrat solüsyonu A, sonra 50 μL substrat solüsyonu B eklendi. Yeni bir bant ile kaplı mikrolaka 37°C 'de karanlıkta 10 dakika boyunca inkübe edildi.
9. Her bir kuyuya 50 μL durdurucu solüsyon A eklendi, mavi renk hızlıca sarıya dönüştü.
10. Durdurucu solüsyon eklendikten sonra 30 dakika içinde çoklu plaka okuyucu spektrofotometrede, 450 nm'de her bir kuyudaki karışımın optik yoğunluğu (OD değeri) ölçüldü.
11. Standart grafikten (Şekil 3.1) yararlanılarak her bir örneğin sFlt-1 içeriği hesaplandı.

Tablo 3.1: sFlt-1 Standart solüsyonun seyreltilmesi.

Standart Konsantrasyonu	Standart Adı	Hazırlanışı
48 ng/mL	Stok Standart	Kit içinde hazır bulunmaktadır.
24 ng/mL	Standart No.5 (S5)	120 μL Stok standart + 120 μL standart seyreltici
12 ng/mL	Standart No.4 (S4)	120 μL Standart No.5 + 120 μL standart seyreltici
6 ng/mL	Standart No.3 (S3)	120 μL Standart No.4 + 120 μL standart seyreltici
3 ng/mL	Standart No.2 (S2)	120 μL Standart No.3 + 120 μL standart seyreltici
1.5 ng/mL	Standart No.1 (S1)	120 μL Standart No.2 + 120 μL standart seyreltici



Şekil 3.1: sFlt-1 (sVEGFR-1) Standart grafiğı.

3.3 İNSAN PLASENTA BÜYÜME FAKTÖRÜ (PLGF) ÖLÇÜMÜ

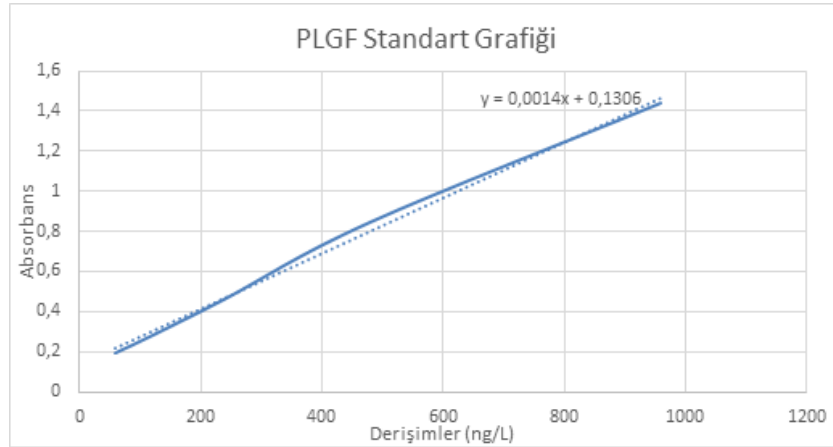
İnsan plasenta büyüme faktörü (PLGF)'nün plazmadaki düzeyinin ölçülmesinde BT Lab (Cat. No: E0138Hu), PLGF ELISA Kiti kullanıldı. Standart solüsyonlar kitin protokolüne göre hazırlandı. Standart solüsyonların hazırlanmasında izlenen dilüsyon işlemleri Tablo 3.2'de verildi. 30X konsantre yıkama tamponunun 20 mL'si distile su ile 500 mL'ye seyreltilerek 1X yıkama tamponu hazırlandı.

Tablo 3.2: PLGF Standart solüsyonun seyreltilmesi.

Standart Konsantrasyonu	Standart Adı	Hazırlanışı
1920 ng/L	Stok Standart	Kit içinde hazır bulunmaktadır.
960 ng/L	Standart (S5)	No.5 120 µL Stok standart + 120µL standart seyreltici
480 ng/L	Standart (S4)	No.4 120 µL Standart No.5 + 120µL standart seyreltici
240 ng/L	Standart (S3)	No.3 120 µL Standart No.4 + 120µL standart seyreltici
120 ng/L	Standart (S2)	No.2 120 µL Standart No.3 + 120µL standart seyreltici
60 ng/L	Standart No.1(S1)	120 µL Standart No.2 + 120µL standart seyreltici

Deney Prosedürü:

1. Bütün reaktifler, standart solüsyonlar ve örnekler hazırlandı. Kullanmadan önce bütün reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Test oda sıcaklığında gerçekleştirildi.
2. Deney için gerekli strip sayısı belirlendi. Kullanmak için stripler çerçeveye eklendi.
3. Standart kuyularına 50'şer μL standartlar (S1-S5) eklendi.
4. Örnek kuyularına her bir örnekten 40'ar μL eklendi.
5. Üzerlerine önce 10'ar μL anti-PLGF antikoru, sonra 50'şer μL streptavidin-HRP eklendi ve iyice karıştırıldı. Mikroplaka kit içeriğindeki kapatıcı bantlarla kaplandı ve 60 dakika 37°C 'de inkübe edildi.
6. Kapatıcı bantlar uzaklaştırıldı ve kuyular yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
7. Mikroplaka Whatman kağıdı üzerinde kurutuldu.
8. Her bir kuyuya önce 50 μL substrat solüsyonu A, sonra 50 μL substrat solüsyonu B eklendi. Yeni bir bant ile kaplanan mikroplaka 37°C 'de karanlıkta 10 dakika boyunca inkübe edildi.
9. Her bir kuyuya 50 μL durdurucu solüsyon A eklendi, mavi renk hızlıca sarıya dönüştü.
10. Durdurucu solüsyon eklendikten sonra 30 dakika içinde çoklu plaka okuyucu spektrofotometrede, 450 nm'de her bir kuyudaki karışımın optik yoğunluğu (OD değeri) ölçüldü.
11. Standart grafikten (Şekil 3.2) yararlanılarak her bir örneğin PLGF içeriği hesaplandı.



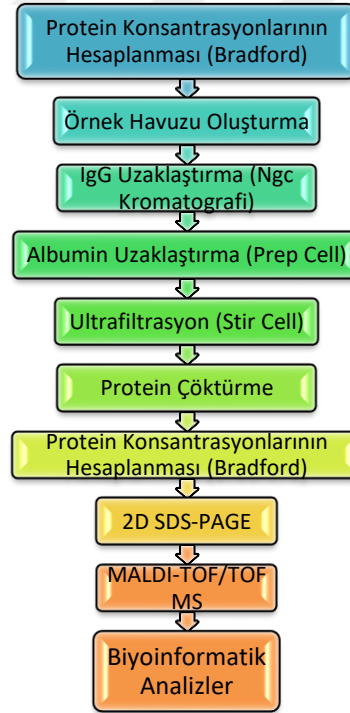
Şekil 3.2: PLGF Standart grafiği.

3.4 PROTEOMİK ANALİZLER İÇİN PLAZMA ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI

İnsan plazma örnekleri ile yapılan proteomik çalışmalar sırasında plazmada yoğun olarak bulunan proteinler daha az bulunan proteinleri maskeleymektedir. Bu nedenle plazma örneklerinin doğrudan proteomik analizleri yerine önce plazmada bol bulunan proteinlerin depleksiyon işlemine tabi tutulması gerekir (Björhall ve diğ., 2005). Yapılan tüm işlemler Şekil 3.3'te şematik olarak gösterildi.

3.4.1 Plazma Örneklerinin Havuz Yapılarak Birleştirilmesi

Preeklampsi ve kontrol grubundaki bireylere ait plazma örnekleri protein konsantrasyonları tek tek belirlendikten sonra proteomik analizler için havuz yapılarak birleştirildi ve iki toplu örnek (Preeklampsi ve Kontrol) halinde çalışıldı.



Şekil 3.3: Proteomik araştırmalar için uygulanan deneylerin akış şeması.

3.4.2 HiTrap G Protein Kolon Kromatografisi ile Plazmadan IgG Uzaklaştırma

HiTrap Protein G HP (GE Healthcare, UK) kolonu kullanılarak NGC Kromatografi Cihazı (Bio-Rad, ABD)'nda (Şekil 3.4) IgG'ler uzaklaştırıldı. Kolon polipropilenden yapılmış, biyoyumlu ve biyomoleküllerle etkileşime girmeme özelliği ile plazmadan monoklonal ve poliklonal IgG'lerin saflaştırılması ve izolasyonu için uygun ortam özelliğine sahiptir. İnsanda IgG1, IgG2, IgG3, IgG4'e bağlanır. G proteininin doğal albümin bağlama bölgesi, (albümin ile çapraz reaksiyonları engellemek için) genetik olarak silinmiştir. Dolayısıyla plazma örneği protein G kolondan geçirildikten sonra albümin içerir, ancak IgG içermez.

Kolon cihaza yerleştirildikten sonra 0.1 M glisin-HCl (pH 2.7) ile dengeleme işlemi yapıldı. Her iki grup için de 30 mg/mL protein konsantrasyonuna sahip plazma örneği 1 mL bağlayıcı tamponda (20 mM Sodyum fosfat, pH 7.0) çözündürüldü ve enjeksiyonla cihaza yüklendi. Örnekler Hi Trap protein G kolondan optimize koşullarda (akış hızı 1.0 mL/dak., basınç 44 psi) geçirilerek fraksiyonlar toplandı. Yıkama (1 M Tris-HCl, pH 9.0), elüsyon (0.1 M glisin-HCl (pH 2.7) ve yeniden yıkama (1 M Tris-HCl, pH 9.0) işlemleri sonunda IgG uzaklaştırma işlemi tamamlandı. İşlem sırasında toplanan fraksiyonlar SDS-PAGE ile analiz edildi ve IgG'nin örnekten uzaklaştırıldığı gösterilerek bir sonraki adıma (albümin uzaklaştırma) geçildi.



Şekil 3.4: NGC Kromatografi Cihazı (Bio-Rad).

3.4.3 Albümin Uzaklaştırma İşlemi

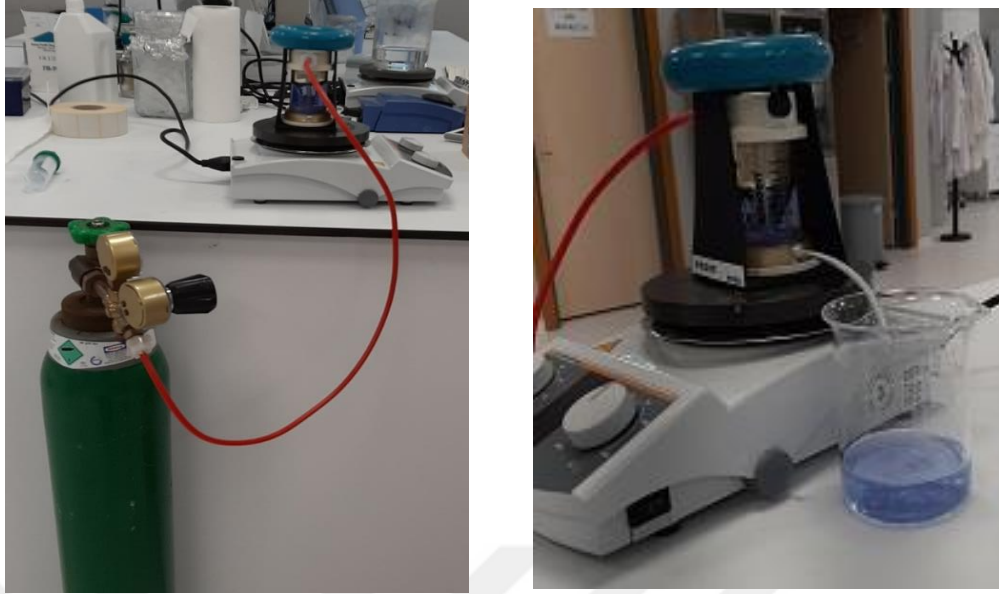
Bu işlem Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Proteomik Laboratuvarından hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Albümin uzaklaştırma işlemi Model 491 Prep Cell (Bio Rad, ABD) cihazı ile jelde fraksiyonlama yapılmıştır (Şekil 3.5). Örnek jeli geçtikten sonra ilk 240 fraksiyon (4 saat boyunca) toplanmıştır. Toplanan fraksiyonlar tek boyutlu SDS-PAGE ile (bkz. 3.5.1) analiz edilmiş ve albümin içerip içermedikleri kontrol edilmiştir. Albümin olan fraksiyonlar ayrılmış ve albümin olmayan fraksiyonlar birleştirilerek ultrafiltrasyon aşamasına geçilmiştir.



Şekil 3.5: Model 491 Prep Cell Cihazı (Bio-Rad, ABD).

3.4.4 Amicon® Karıştırılmalı Hücre Aparatı ile Tampon Değişimi

Amicon® (Merck) karıştırılmalı hücre aparatı ile (Şekil 3.6), azot gazı basıncı altında 5 kDa'lık membran filtre kullanılarak ultrafiltrasyon yapıldı. Prep Cell sonrası fraksiyonların tamponu 2D Rehidrasyon Tamponu ile değiştirildi. Örnekler mikrotüpe alınarak protein çöktürme işlemine geçildi.



Şekil 3.6: Amicon® ultrafiltrasyon sistemi.

3.4.5 Protein Çöktürme İşlemi

1. 500 µg'a kadar protein örneği 1.5 mL'lik santrifüj tüpüne alındı. Üzerine hacminin %10'u kadar DOC (Sodyumdeoksikolat) çözeltisi eklendi, vortekslendi ve buz üzerinde 15 dakika bekletildi.
2. Hacmin %10'u kadar %72'lik TCA (Trikloroasetik asit) çözeltisi eklendi ve buz üzerinde 15 dakika bekletildi.
3. 15 dakika sonra protein çözeltisi 15000 rpm'de +4°C' de 10 dakika santrifüjlendi.
4. Santrifüj sonrasında tüpün içerisindeki sıvı kısım boşaltıldı ve tüp tekrar santrifüjle kısa süre çevrildi. Az miktarda üst sıvı pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
5. Çöken pellet üzerine -20°C' de bekletilmiş 1 mL %100 aseton eklendi ve vortekslendi. Pelletin dağılması için vorteksleme işlemi tekrarlandı. Karışım derin dondurucuda (-20°C) gece boyunca bekletildi.
6. Örnekler 12000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında sıvı kısmı uzaklaştırıldı. Tüp yeniden santrifüje yerleştirilip kısa süre ile çevrildi ve çok az kalan üst sıvı uzaklaştırıldı.
7. Çöken pellet oda sıcaklığında yaklaşık 5 dakika (pelletin rengi opak halden saydam hale dönüşene kadar) kurutuldu.

8. Kuruyan pellet üzerine 2D rehidrasyon tamponu eklenerek çözünmesi sağlandı. Bradford yöntemi ile protein konsantrasyonu ölçüldü (Bradford, 1976).

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması:

%10'luk DOC (Sodyumdeoksikolat) çözeltisinden %0.2 stok çözelti hazırlandı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

%100 (w/v) TCA çözeltisinin hazırlanması için; 55 g TCA tartıldı, son hacim 25 mL olacak şekilde distile suda çözündürüldü. Buzdolabında +4° C' de karanlıkta muhafaza edildi.

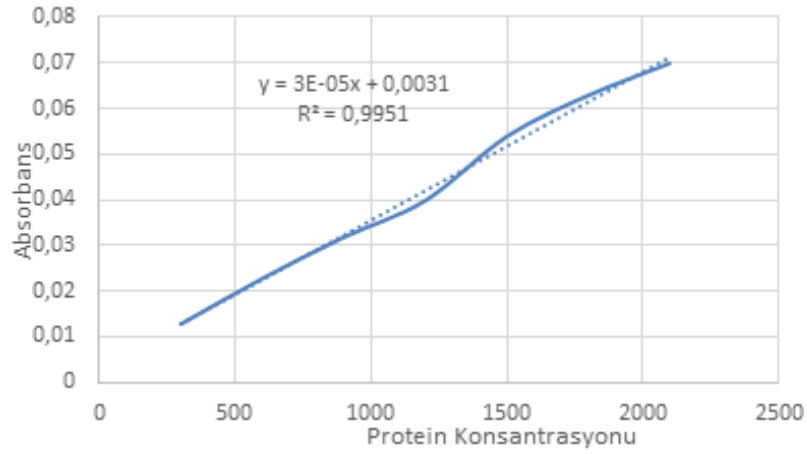
%72 TCA çözeltisinin hazırlanması için %100 TCA'dan 36 mL alındı ve son hacim 50 mL'ye tamamlandı (14 mL distile su eklenerek seyreltilti). Buzdolabında +4° C'de karanlıkta muhafaza edildi.

%100 aseton -20°C'de muhafaza edildi.

3.4.6 Protein Konsantrasyonunun Hesaplanması

Plazma örneklerinin protein konsantrasyonunun hesaplanmasında kolorimetrik bir yöntem olan mikro hacim spektrofotometre kullanıldı (Desjardins ve diğ., 2009). 20 µL standart (1-7) 1 mL 1X Bradford boyası ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Nano-Drop 1000 cihazı kullanılarak 595 nm'de absorbans ölçümü yapıldı ve standart grafik oluşturuldu (Şekil 3.7).

Örneğin protein konsantrasyonunun ölçülmesi için, 1 µL örnek 20 µL 2D rehidrasyon tamponu ile karıştırılarak seyreltilti ve üzerine 1 mL 1X boya çözeltisi eklendi. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Nano-Drop 1000 cihazı kullanılarak 595 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Standart grafiğin eğri denkleminde yararlanılarak örneğin protein konsantrasyonu hesaplandı.



Şekil 3.7: Bradford standart grafiği.

3.5 ELEKTROFORETİK ANALİZLER

3.5.1 Tek Boyutlu Denatüre Jel Elektroföresi (1D SDS-PAGE)

Plazma örneklerine yapılan her işlem sonrasında (IgG ve albümin uzaklaştırma, protein çöktürme) protein örneklerinin molekül ağırlığına göre ayrılması amacıyla tek boyutlu denatüre jel elektroföresi uygulandı. Jeller %4 yükleme jeli ve %12 ayırma jeli olarak hazırlandı (Tablo 3.3). Örnekler uygun miktarda alındı ve boya solüsyonu ile karıştırılarak 1 2 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Jele yüklenen örnekler 180 Voltta yaklaşık 45 dakika yürütüldü. Albumin bantlarının görüntüleneceği jellerde MALDI uyumlu gümüş boyama uygulandı (Jin ve diğ., 2006). Diğer jeller Coomassie boyama yöntemi ile boyandı (Brunelle ve Green, 2014).

3.5.2 2 Boyutlu Denatüre Jel Elektroföresi (2D SDS-PAGE)

3.5.2.1 Birinci Boyut İzoelektrik Odaklama

İzoelektrik odaklama aşamasında 11 cm IPG Ready Strip (Bio-Rad) (pH 3-10) kullanıldı. İlk aşamada protein örneklerinin IPG (Immobilize pH gradiyenti) striplere emdirilmesi için 16 saat boyunca rehidrasyon işlemi uygulandı. Strip başına 500 µg ve toplam 250 µL hacimde protein örneği yüklendi. Kontrol grubu, 47 µL örnek üzerine 2.5 µL TBP (Tribütil fosfat), 2.5 µL amfolit (pH 3-10) ve 198 µL 2D Rehidrasyon tamponu (50 mL dd H₂O'da 24.04 g üre, 7.612 g tioüre, 2 g CHAPS, 385.62 mg DTT ve eser miktarda bromofenol mavisi içerir)

eklenerek hazırlandı. Preeklampsi grubu 32 μ L örnek üzerine 2.5 μ L TBP, 2.5 μ L amfolit (pH 3-10) ve 213 μ L 2D Rehidrasyon tamponu eklenerek hazırlandı. Örnekler rehidrasyon için odaklama tepsisine yerleştirildi. Odaklama tepsiyi PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad) cihazına yerleştirildi ve 50 μ A/IPG strip akım ile 16 saat boyunca 20°C’de aktif rehidrasyona tabi tutuldu.

Tablo 3.3: Hazırlanan jellerin içerikleri.

Yükleme Jel Yüzdesi (%)	4	Ayırma Jel Yüzdesi (%)	12	15
%30 Poliakrilamid (mL)	1.7	%30 Poliakrilamid (mL)	4	5
1 M Tris (pH 6.8) (mL)	1.25	1.5 M Tris (pH 8.8) (mL)	2.5	2.5
%10 Amonyum Persülfat (μ L)	100	%10 Amonyum Persülfat (μ L)	100	100
%10 SDS (μ L)	100	%10 SDS (μ L)	100	100
TEMED (μ L)	10	TEMED (μ L)	4	4
H ₂ O (mL)	6.8	H ₂ O (mL)	3.3	2.3
Toplam Hacim (mL)	~10	Toplam Hacim (mL)	~10	~10

Rehidrasyon başladıktan bir saat sonra, örneğin buharlaşmasını engellemek için her bir stripin üzerine 2-3 mL mineral yağ eklendi.

Rehidrasyon aşamasından sonra stripler fazla mineral yağdan arındırıldı. IPG stripleri temiz bir tepsiye alındı. Anot (+) ve katot (-) uçlara fitil kâğıdı yerleştirildi ve üzeri ultra saf su ile ıslatıldı. Striplerin üzeri yeniden mineral yağ ile kapatıldı. Bu aşamada striplerin üzerinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. İzoelektrik odaklama işlemi Tablo 3.4’de gösterildiği gibi gerçekleştirildi. İkinci boyut aşamasına geçene kadar stripler -80°C’ de saklandı.

Tablo 3.4: İzoelektrik odaklamada işlem basamakları.

1. adım	Linear (↗), 250 V, 20 dak.
2. adım	Slow (↘), 8000 V, 2saat 30 dak
3. adım	Rapid (↘), 8000 V-30000 V ulaşana kadar

3.5.2.2 İkinci Boyut SDS-PAGE

Stripler 30 dakika dengeleme tamponu 1 (Tablo 3.5) ile ve sonrasında 30 dakika dengeleme tamponu 2 (Tablo 3.5) ile yıkandı. Strip uzunluğuna uygun %15' lik (Tablo 3.3) 11 cm jeller hazır kaset içerisine döküldü. Jellerin polimerizasyonu tamamlanınca stripler yatay şekilde jel üzerine yerleştirildi. Elektrod fitiline önceden boyanmış markırdan ("prestained marker") 1-2 µL emdirilerek strip sonuna yerleştirildi. Striplerin üzeri, alttaki jel ile tam temas etmesi ve hava almaması için, kaplama çözeltisi (%0.5 Agaroz, 25 mM Tris, 192 mM Glisin, %0.1 SDS, eser miktarda bromofenol mavisi içerir) ile kaplandı. Jeller Criterion Dodeca Cell (Bio-Rad) sisteminde 180 V'da 70 dakika yürütüldü. Jeller gece boyunca Coommasie boyamaya uygun fiksatif çözeltisine (%40 metanol, %10 asetik asit) alındı.

Tablo 3.5: Dengeleme tamponlarının içerikleri.

	Dengeleme Tamponu 1	Dengeleme Tamponu 2
6 M Üre	90.1 g	90.1 g
0.375 M Tris HCl (pH 8.8)	62.5 mL (1.5 M pH 8.8 stok çözeltiden)	62.5 mL (1.5 M pH 8.8 stok çözeltiden)
%2 (w/v) SDS	5 g	5 g
%20 (v/v) Gliserol	50 mL	50 mL
%2 DTT (w/v)	5 g	-----
%2.5 Iodoasetamit (w/v)	-----	6.25 g
dd H ₂ O	250 mL'ye tamamlanır	250 'ye tamamlanır

3.5.3 Jellerin Coomassie Boyama Yöntemi ile Boyanması

Jeller gece boyunca fiksatif çözeltide (%40 metanol, %10 asetik asit) bekletildikten sonra bir gün boyunca boyama çözeltisinde (%50 metanol, %0.1 (w/v) Coomassie brilliant blue R-250, %10 asetik asit) bekletildi. Sonrasında jeller yıkama çözeltisine (%5 metanol, %7 asetik asit) alındı (Brunelle ve Green, 2014). Görüntü alma işlemi VersaDoc 4000 MP (Bio-Rad, ABD) cihazında gerçekleştirildi.

MALDI ile uyumlu gümüş boyamada (Jin ve diğ., 2006) kullanılan çözeltiler Tablo 3.6’da verildi.

1. Jeller yürütme sonrasında gece boyunca fiksatif çözeltisine alındı.
2. Fiksatif çözeltisi uzaklaştırıldı.
3. Jeller yıkama solüsyonunda 20 dakika boyunca yıkandı.
4. Yıkama solüsyonu uzaklaştırıldı ve hassaslaştırma (“sensitizing”) çözeltisinde 2 dakika bekletildi.
5. Jeller saf su ile 20 saniye boyunca yıkandı. İşlem 2 kez tekrarlandı.
6. Jeller boyama çözeltisinde 20 dakika bekletildi.
7. Boyama çözeltisi uzaklaştırıldı ve jeller 20 saniye boyunca saf su ile yıkandı. İşlem 2 kez tekrar edildi.
8. Jeller renk geliştirme (“developing”) çözeltisinde spotlar düzgün şekilde görünene kadar (yaklaşık 5 dakika) bekletildi.
9. Renk geliştirme çözeltisi uzaklaştırıldı ve reaksiyonu durdurmak için durdurucu çözelti 1 eklendi.
10. Jeller analiz yapılana kadar durdurucu çözelti 2’de +4°C’de saklandı.
11. Görüntü alma işlemi VersaDoc 4000 MP (Bio-Rad, ABD) ile gerçekleştirildi.

3.6 SPOT ANALİZİ VE SPOT KESİMİ

Jellerin görüntüleri QuantityOne (Bio Rad) yazılımı ile spot analizine uygun hale getirildi. Kontrol ve preeklampsi grubu için yürütülen 2 tekrarlı jeller kendi grupları içerisinde karşılaştırıldı. PDQuest Advance (Bio Rad) yazılımı ile gruplar arasındaki farklı spotların belirlenmesi sağlandı. Anlamlı artış ve azalış gösteren spotlar jelden ExQuest Spot Cutter (Bio Rad) (Şekil 3.8) cihazı yardımı ile otomatize yöntem ile kesildi. Jelde koordinatları belirlenen spotlar 96’lık mikropalakaya aktarıldı.



Şekil 3.8: EXQuest spot kesim cihazı (Bio-RAD).

Tablo 3.6: Gümüş Boyamada kullanılan çözeltilerin miktarları.

Fiksatif Çözeltisi	
Asetik asit	12 mL
%70 Etanol	50 mL
Formaldehit	50 µL
Yıkama Çözeltisi	
%70 Etanol	20 mL
Hassaslaştırma (“Sensitizing”) Çözeltisi	
Sodyumtiyosülfat.5H ₂ O	31.4 mg
Boyama Çözeltisi	
Gümüş Nitrat	0.2 g
Formaldehit	76 µL
Renk Geliştirme (“Developing”) Çözeltisi	
Sodyumtiyosülfat.5H ₂ O	0.63 mg
Sodyumkarbonat	6 g
Formaldehit	50 µL
Durdurucu Çözelti 1	
Asetik asit	12 mL
Durdurucu Çözelti 2	
Asetik Asit	2 mL
100 mL için (Kalan miktar saf su ile tamamlanır)	

3.7 TRİPSİN İLE JEL İÇİNDEKİ PROTEİNLERİN KESİMİ (IN-GEL DIGESTION)

Jel spotlarında bulunan proteinlerin Tripsin ile proteolitik kesime uğratarak peptidlerin elde edilmesi In Gel Tripsin Digestion Kit (Thermo Scientific™) ile sağlandı. In-gel Tripsin kesiminde kullanılan kimyasalların hazırlanışı Tablo 3.7’de verildi. Jellerden kesilen spotlar mikropalakadan mikrotüplere alındı. Üzerine 100 µL amonyum bikarbonat (ambic) ve 100 µL Asetonitril (ACN) eklenerek gece boyunca 37°C’de yıkandı. Çözelti mikropipet yardımıyla atıldı ve jel başına 30 µL indirgeyici tampon (disülfid bağlarını kırmak için) eklendi, 10 dakika 60°C’de inkübe edildi. Çözelti mikropipet yardımıyla atıldı ve jel başına 30 µL alkileyici tampon eklendi. Karanlıkta oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Böylece indirgenmiş olan sistein yan zincirlerinin metillenmesi (alkilasyon) sağlandı. Tüp içindeki tampon atıldı ve 200 µL yıkama solüsyonu eklenerek 37°C’de 15 dakika, iki kez yıkandı. Yıkama solüsyonu atıldı ve jellerin büzüşmesi ve kuruması amacıyla 50 µL asetonitril eklendi ve 25 dakika bekletildi. Asetonitril uzaklaştırıldı ve jeller 5-10 dakika kurumaya bırakıldı. Aktifleşmiş tripsin hazırlandı. Tüpteki her bir örneğin üzerine 10 µL aktifleşmiş tripsin eklendi, 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından 25 µL kesim tamponu eklenerek 30°C’de gece boyunca bekletildi. Daha sonra kesim solüsyonu temiz tüpe alındı. 10 µL %1 TCEP eklenerek 5 dakika bekletildi. Bu adım Tripsini inaktifleştirdi ve peptid geri kazanımı sağladı ve Zip Tip aşamasına geçildi.

3.8 PEPTİD ÖRNEKLERİNİN MALDI-TOF/TOF ANALİZİ İÇİN HAZIRLANMASI

Örneklerin Zip-Tip (Milipore C18 pipet ucu) temizlenmesi için önce uçlar 10 µL ACN ile 3 kez yıkanarak ıslatıldı. Daha sonra 10 µL %0.1 Triflorik asit 3 kez geçirilerek C18 kolon dengelendi. Peptidlerin kolona bağlanması için 15-20 defa pipetlendikten sonra bağlanmayan peptidlerin uzaklaştırılması için 10 µL %0.1 Triflorik asit ile kolon 3 kez aspire edildi. Bağlanan peptidler 1.4 µL matriks (α -Siyano-4hidroksi sinnamik asit) solüsyonu ile muamele edildi ve MALDI plaka üzerine uygulandı.

Tablo 3.7: In gel Tripsin kesimde kullanılan kimyasalların hazırlanışı.

Kullanılan Kimyasal	Hazırlanışı
Tripsin Stoğu	20 µg Tripsin 20 µL tripsin saklama solüsyonunda (enzimin kendini parçalamasını engeller) sulandırılır. Dondurma-çözme döngüsünü en aza indirmek için çözelti ~5 µL 4 tüp şeklinde saklandı.
Tripsin Çalışma Solüsyonu	5 µL Tripsin stok solüsyonu 45µL ultrapure saf su ile buz üzerinde seyreltildi.
Yıkama Solüsyonu	80 mg amonyum bikarbonat 20 mL asetonitril ile karıştırıldı ve 20 mL ultrapure saf su eklendi.
Parçalayıcı Tampon	10 mg Ambic 5 mL ultra saf su ile karıştırıldı.
İndirgeyici Tampon	Kullanmadan önce hazırlandı.. 3.3 µL TCEP 30 µL parçalayıcı tampon ile karıştırıldı.
Alkilleyici Tampon	Kullanmadan önce hazırlandı. Işık ile teması önlendi. 7 mg IAA 70 µL suda 5X stok solüsyon hazırlamak üzere çözündürüldü.. 5X stok solüsyonun 7 µL' si 28 µL parçalayıcı tampon ile seyreltilerek hazırlandı.
Aktifleşmiş Tripsin	Kullanmadan önce hazırlandı. 1 µL tripsin çalışma solüsyonu 9 µL Parçalayıcı tampon ile karıştırıldı.

3.9 MALDI-TOF/TOF KÜTLE SPEKTROMETRİSİ

Kütle spektrometrik analizler Ab Sciex 5800 MALDI-TOF/TOF MS cihazında (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) gerçekleştirildi. Zip-Tip uygulamasından sonra MALDI Plate cihaza yerleştirildi. Cihazdan elde edilen verilere göre; MASCOT veri bankasından PROTEIN PILOT programı kullanılarak örneklerin hangi proteine ait oldukları belirlendi.

MALDI kalibrasyonu internal ve eksternal standart kullanılarak yapıldı; her bir spektrum için ortalama 200 lazer vuruşu kullanıldı. Elde edilen tüm spektrumlar (m/z), arama parametreleri; bir hatalı kesim bölgesi, sabit modifikasyon olarak karbamidometil (sistein), değişken modifikasyon olarak Met oksidasyonu, peptid yükü +1, monoizotopik kütle değerleri, peptid kütle toleransı ± 50 ppm, fragment kütle toleransı ± 0.25 Da olarak belirlendi ve MASCOT veri bankasında analiz edildi.

3.10 WESTERN BLOTLAMA

%10 SDS-PAGE jelde moleköl ağırlığına göre ayrılan plazma proteinleri ıslak blotlama yöntemi ile polivinilidin diflorür (PVDF) membrana aktarıldı. Aktarımda Mini Trans Blot Cell sistemi (Bio-Rad) kullanıldı. Western Blotlama yönteminde kullanılan tamponlar ve hazırlanışları Tablo 3.8’de verildi. Bu deneyde kullanılan birincil ve ikincil antikorlar ile elde edildikleri organizmalar ve dilüsyon miktarları Tablo 3.9’da verildi.

SDS-PAGE sonrasında jel 10 dakika transfer tamponunda bekletildi. Sırasıyla aşağıdan yukarı doğru gelecek şekilde; sünger, filtre kağıdı, jel, PVDF membran (30 sn. metanol ile aktiveleştirildi), filtre kağıdı ve sünger kapatılarak sandviç hazırlandı. Sisteme soğutucu bağlanarak 100 V’da 45 dakikada membrana aktarım gerçekleştirildi. PVDF membran transfer sonrasında, boş alanların kapatılması amacıyla 1 saat boyunca bloklama tamponunda çalkalayıcıda bekletildi. Bloklamanın ardından birincil antikor (Anti-Fibrinojen β antikor veya Anti-Haptoglobulin antikor) çözeltisine alınarak +4°C’de silindirik karıştırıcıda (roller), gece boyunca bekletildi. Membran fazla antikorun uzaklaştırılması amacıyla TBST tamponu ile 5 dakika boyunca 5 kez yıkandı. Membran ikincil antikor çözeltisine [fibrinojen β için keçi anti-fare IgG F(ab')₂, HRP işaretli; haptoglobulin için keçi anti-tavşan IgG F(ab')₂, HRP işaretli] alındı ve oda sıcaklığında 2 saat boyunca bekletildi. Membran fazla antikorun uzaklaştırılması amacıyla TBST tamponu ile 5 dakika boyunca 5 kez yıkandı. Spesifik protein bantlarının görüntülenmesi amacıyla “ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham RPN2133)” kullanıldı. Kit içerisindeki A ve B solüsyonları 1:1 (v/v) oranında karıştırıldı ve membran karanlıkta 1 dakika boyunca bekletildi. Görüntüleme işlemleri ChemiDoc MP (Bio-Rad) cihazında gerçekleştirildi. Membrandan elde edilen görüntü ImageLab 5.2.1 yazılımı kullanılarak analiz edildi.

Tablo 3.8: Western blotlamada kullanılan tamponlar.

Transfer Tamponu (1X)	Trizma-baz	3.03 g
	Glisin	14.4 g
		Son hacim ddH ₂ O ile 1 litreye tamamlandı.
Bloklama Tamponu (%5)	Yağsız Süt Tozu	5 g
		Son hacim yıkama solüsyonu ile 100 mililitreye tamamlandı.
Yıkama Tamponu (1X PBS-Tween-20)	PBS	9.6 g
	Tween 20	500 µL
		Son hacim ddH ₂ O ile 1 litreye tamamlandı.
Antikor Sıyırma (“Stripping”) Tamponu	%10 SDS	20 mL
	0.5 M Tris HCl (pH 6.8)	12.5 mL
	Ultra saf su	67.5 mL
	β-mercaptoetanol	0.8 mL
TBST Tamponu	Trizma-Baz (20 mM, pH: 7.5)	2.42 g
	NaCl (150 mM)	8.77 g
	Tween-20 (%0.1)	Son hacim dd H ₂ O ile son hacim 1 Litreye tamamlandı.

Analizi yapılan membranların normalizasyonu için membran, antikor sıyırma (“stripping”) tamponunda (40 dk. boyunca 60°C’de ısıtılmış) 30 dakika boyunca 60°C’de ısıtıldı. Sonra membran sırasıyla ultra saf su ve TBST tamponu ile beşer kez beşer dakika boyunca yıkandı. Bu işlemde sonra membran (primer antikor) β-aktin antikoruna ile +4°C’de gece boyunca bekletildi. Daha sonra membran yıkama tamponu ile 5 kez beşer dakika boyunca düşük devirde çalkalayıcıda yıkandı. İkincil antikor uygulamasından sonra ECL kiti kullanılarak görüntüleme adımı gerçekleştirildi. Elde edilen görüntü ImageLab 5.2.1 yazılımı kullanılarak analiz edildi ve normalizasyonda kullanıldı.

Tablo 3.9: Western blotlamada kullanılan birincil ve ikincil antikorlar, elde edildikleri organizmalar ve dilüsyonları.

Birincil Antikor	Mono/Poliklonal	Firma ve Kod	Elde Edilen Organizma	Dilüsyon
Anti-Fibrinojen β Antikoru	Monoklonal	Santa Cruz (sc-271035)	Fare	1:2500
Anti-Haptoglobin Antikoru	Poliklonal	Boster (PB9219)	Tavşan	1:500
β -Aktin Antikoru	Monoklonal	Novus Bio (NB 600-501)	Fare	1:2500
İkincil Antikor	Mono/Poliklonal	Firma ve Kod	Elde Edilen Organizma	Dilüsyon
Keçi anti-fare IgG F(ab') ₂ , HRP işaretli (Fibrinojen β için ve β -aktin için)	Poliklonal	Boster (BA1050)	Keçi	1:2500
Keçi anti-tavşan IgG F(ab') ₂ , HRP işaretli (Haptoglobin için)	Poliklonal	Boster (BA1054)	Keçi	1:2500

3.11 İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel grafikler ve Shapiro-Wilks'in normallik testi kullanılarak incelenmiştir. Kategorik değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri frekans ve yüzde değerleri ile normal dağılımlı sürekli değişkenlerin ortalama ve standart sapma, kesikli ve normal dağılmayan değişkenlerin ise tanımlayıcı istatistikleri ortanca ve çeyrek sapma yardımıyla özetlendi. Kategorik değişkenlerin gruplar arası farklılıklarını analiz etmede Pearson ve kesin (Fisher' Exact test) χ^2 testleri kullanıldı. Kontrol ve hasta grupları arasında sayısal biyokimya verilerinin karşılaştırılmasında normal dağılımlı olanlar için t testi, normal dağılım göstermeyen değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmalarında Mann Whitney U testi kullanıldı. Biyokimya verileri ve preeklampsiye etki eden parametreler arası ilişkilere Spearman Rank korelasyon katsayısı ile bakıldı. Kesikli sayısal veri tipinde olmaları ve özellikle Albumin'in çok sayıda sıfırı içeren veri yapısından dolayı birim proteindeki sFlt-1/PLGF ve Albumin düzeylerinin tahmini için Poisson regresyon analizi dikkate alınmıştır.

Verilerin istatistiksel değerlendirmesinde IBM SPSS Statistics for Windows software (versiyon 20.0. Armonk, NY: IBM Corp) ile GraphPad Prism 7.00 ve R Studio istatistiksel programlama dili kullanıldı. $P < 0.05$ olan p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.12 BİYOİNFORMATİK ANALİZLER

Tespit edilen proteinlerin biyolojik süreçlerdeki rolleri, hücre bileşeni olarak bulundukları yerler ve moleküler fonksiyolarının analizleri gene ontology (<http://www.geneontology.org>)’ de gerçekleştirildi. Tespit edilen proteinlerin hangi hücresel yollaklarda yer aldığıın analizi KEGG Pathway veri tabanı <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) ile yapıldı.



4. BULGULAR

4.1 PREEKLAMPSİ HASTALARINA VE KONTROL GRUBU GEBELERE AİT DEMOGRAFİK BİLGİLER

Kontrol grubu gebelerde; gebelik haftası 31-34 hafta olanlar, sigara ve alkol kullanmayanlar, kan sulandırıcı, gebeliğin rutin vitaminleri ile tiroid ilacı dışında ilaç kullanmayanlar, gebelik öncesinde diyabet öyküsü olmayanlar ile hipertansiyon öyküsü olmayan sağlıklı birey özellikleri arandı.

Preeklampsi hastalarının tanısı ACOG 2013' a göre belirlenen kriterler (Tablo 2.1'de açıklandı) doğrultusunda kondu. Preeklampsi hastaları alkol ve sigara kullanmayan bireylerdi. Hastaların demografik ve biyokimya verileri istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Kontrol ve preeklampsi gruplarına ilişkin demografik özellikler ve biyokimya verileri Tablo 4. 1'de karşılaştırmalı olarak verildi.

Bulgulara göre kontrol ve preeklampsi grupları arasında kilo, sistolik ve diastolik kan basıncı (veya hipertansiyon durumu), lökosit düzeyi, toplam protein konsantrasyonu, ve idrardaki albumin miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ($p < 0.05$). Gruplar arasında ortalama yaş ve gebelik haftası açısından anlamlı fark bulunmadı ($p \geq 0.05$). Preeklampsi grubunun kilo ortalaması (83.8 ± 16.9 kg) kontrol grubuna göre (64.4 ± 22.0 kg) önemli derecede yüksek bulundu ($p < 0.05$). Aynı zamanda vücut kitle endeksi preeklampsi grubunda (31.28 ± 1.67 kg/m²) kontrol grubuna kıyasla (27.27 ± 0.66 kg/m²) anlamlı derecede ($p < 0.05$) yüksek bulundu. Bunun yanı sıra, sistolik kan basıncı (130.1 ± 19.1 mmHg) ve diastolik kan basıncı da (83.1 ± 10.1 mmHg) kontrol grubuna kıyasla (108.5 ± 9.0 ve 68.2 ± 8.9 mmHg) daha yüksektir. Benzer şekilde preeklampsi grubunun lökosit düzeyi de (10.8 ± 2.6 (10^3 (mm³))) kontrol grubunununkinden (7.2 ± 5.1 (10^3 (mm³))) daha yüksek elde edildi ($p < 0.05$). Kontrol grubunun toplam protein konsantrasyonu (233.7 ± 7.747 mg/mL) preeklampsi grubundan (154.8 ± 8.33 mg/mL) yüksektir (< 0.0001). Kontrol grubunda idrarda albumin görülmez iken PE grubunda idrarda saptanan albümin değeri ($2.0\text{--}2.5$ mg/dL) bulundu. Klinik tanımlar incelendiğinde; iki grup arasında DM ve alerji açısından fark bulunmaz iken ($p \geq 0.05$)

Tablo 4.1: Grupların demografik özellikleri ve biyokimya verileri.

Demografik Özellikler	Kontrol (n=21)	Preeklampsi (n=25)	p-Değeri
Yaş	32.1±4.8	32.4±6.6	0.884
Gebelik Haftası	32.7±0.69	31.0±4.2	0.067
Gebelik Sayısı	2–1.5	1–1.5	0.719
Boy (cm)	146.5±49.0	163.8±7.1	0.125
Kilo (kg)	64.4±22.0	83.8±16.9	0.007
BMI (kg/m ²)	27.27±0.66	31.28±1.67	0.038
Sistolik KB (mmHg)	108.5±9.0	130.1±19.1	<0.001
Diastolik KB (mmHg)	68.2±8.9	83.1±10.1	<0.001
Biyokimya verileri			
ALT (IU/L)	8.6±3.6	17.6±14.0	0.171
AST (IU/L)	14.4±7.6	18.9±7.0	0.206
Htc (%)	32.2±3.5	34.6±4.1	0.071
Hgb (g/dL)	11.0±1.3	11.7±1.4	0.156
Lökosit (10 ³ mm ³)	7.2±5.1	10.8±2.6	0.008
Toplam Protein Derişimi (mg/mL)	233.7 ± 7.747	154.8 ± 8.33	<0.0001
İdrarda Albumin (+)	0.0–0.0	2.0–2.5	<0.001
Klinik Tanılar			
Hipertansiyon			
Yok	21	10	
Var	0	15	
DM			
Yok	19	21	
Var	2	4	
Alerji			
Yok	19	23	
Var	2	2	

*Veriler dağılıma uygun olarak ortalama ± std. sapma, medyan–çeyrek sapma ve frekans(%) olarak özetlenmiştir. KB: Kan Basıncı, DM: Diabetes mellitus

preeklampsisi grubunun tamamında hipertansiyon sorunu görülmektedir ($p < 0.05$). İki grubun gebelik sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p \geq 0.05$).

4.2 PLAZMADA SFLT-1 VE PLGF DÜZEYLERİ

Plazmada sFlt-1 düzeyi kontrol ve preeklampsisi gruplarında sırasıyla, 13.68 ± 2.02 ng/mL ve 9.64 ± 0.72 ng/mL, yani PE grubunda düşük bulundu (Tablo 4.2). Ancak bu değer örnekteki miligram protein miktarına göre normalize edildiğinde preeklampsisi grubunda kontrole kıyasla yüksek çıktı. PlGF düzeyleri kontrol grubunda 0.49 ± 0.08 ng/mL iken preeklampsisi grubunda 0.36 ± 0.03 ng/mL olarak bulundu, yani PE grubunda düşüktü. Normalizasyon sonucunda ise bu parametre açısından iki grup arasında fark olmadığı görüldü. sFlt-1/PlGF oranı normalizasyondan önce iki grup arasında fark göstermezken normalizasyondan sonra PE grubunda yüksek çıktı.

Tablo 4.2: Plazmada sFlt-1 ve PlGF düzeyleri.

	Kontrol	Preeklampsisi	p-değeri
sFlt-1 (ng/mL)	13.68 ± 2.02 , n=21	9.64 ± 0.72 , n=25	<0.0001
Birim protein başına sFlt-1 (ng/mg protein)	0.067 ± 0.010 , n=21	0.83 ± 0.063 , n=25	<0.0001
PlGF (ng/mL)	0.49 ± 0.08 , n=21	0.36 ± 0.03 , n=25	<0.0001
Birim protein başına PlGF (ng/mg protein)	0.0023 ± 0.0004 , n=21	0.0026 ± 0.0005 , n=25	ns
sFlt-1/PlGF	29.31 ± 1.06	27.75 ± 1.67	ns
Birim protein başına sFlt-1/PlGF (mg^{-1})	0.13 ± 0.006	0.20 ± 0.02	0.0003

Spearman Rank Korelasyon testi ile birim proteindeki sFlt1/PlGF oranı, sFlt-1/PlGF ve Albumin seviyeleri ile yaş, kilo, sistol KB, diastol KB, gebelik sayısı, lökosit ve PlGF arasında korelasyon olup olmadığı değerlendirildi. Anlamlı olan değer $p < 0.05$ olarak kabul

edildi. Albumin seviyeleri ile sistol ve diastol kan basıncı arasında korelasyon olduğu saptandı (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: Klinik faktörler ile preeklampsiye etki eden parametreler arasındaki korelasyonlar.

	Birim protein başına sflt-1/PIGF	sflt-1/PIGF	Albumin
Yaş	0.143	0.920	0.233
Kilo	0.5	0.799	0.923
Sistolik KB	0.846	0.686	0.001**
Diastolik KB	0.926	0.905	0.001**
Gebelik sayısı	0.193	0.297	0.197
Lökosit	0.724	0.970	0.389
PLGF	0.434	0.523	0.172

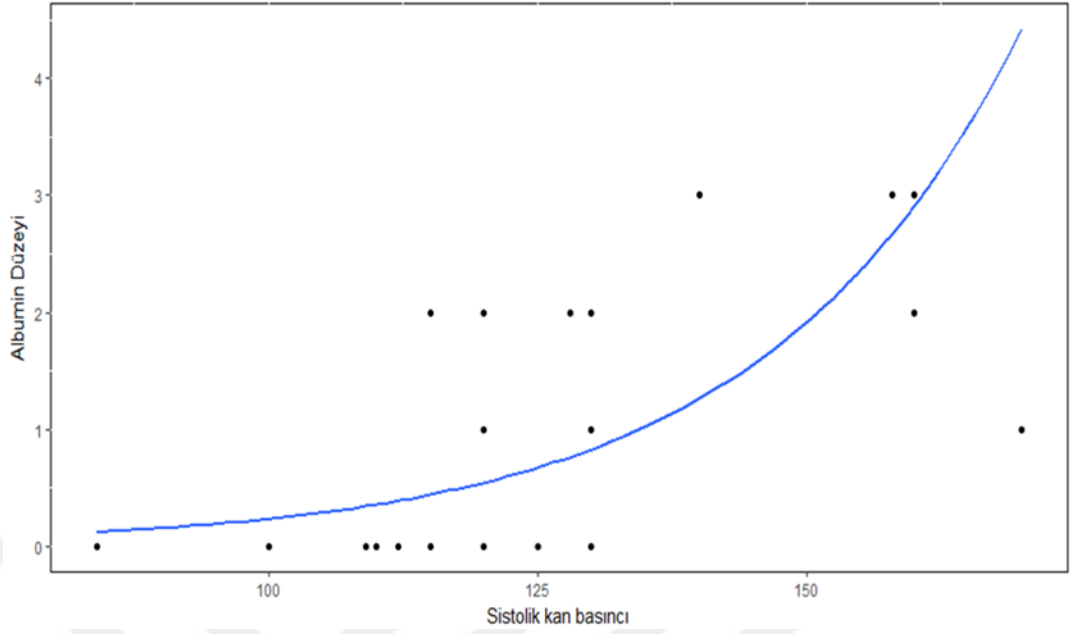
(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ düzeylerinde anlamlılığı ifade etmektedir.)

Korelasyon sonuçlarına dayalı olarak Albumin düzeyinin tahmini için Poisson regresyon modeli elde edildi. Kestirim sonuçları Tablo 4.4’ te verildi. Modele anlamlı korelasyona sahip olan sistolik ve diastolik kan basınçları dahil edildi ve model sonucunda sadece sistolik kan basıncı anlamlı bulundu. Dolayısıyla sistolik kan basıncındaki bir birimlik artış albumin düzeyinde 0.03 birimlik anlamlı sayılabilecek bir artışa neden olmaktadır ($p=0.05$). Bu modelde yer alan değişkenlerin albümin düzeyini tahmin etme başarısı %58 olarak bulunmuştur. En iyi tahmini sağlayan sistolik kan basıncı için Poisson regresyon eğrisi Şekil 4.1’ de gösterilmiştir.

Tablo 4.4: Albumin düzeylerinin Poisson kestirimi.

Bağımlı Değişken	Albumin Düzeyi, $R^2 = 0.575$		
	Regresyon Katsayısı	Standart Hata	p Değeri
Sistolik KB	0.030	0.015	0.050*
Diastolik KB	0.033	0.025	0.195

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ düzeylerinde anlamlılığı ifade etmektedir.)

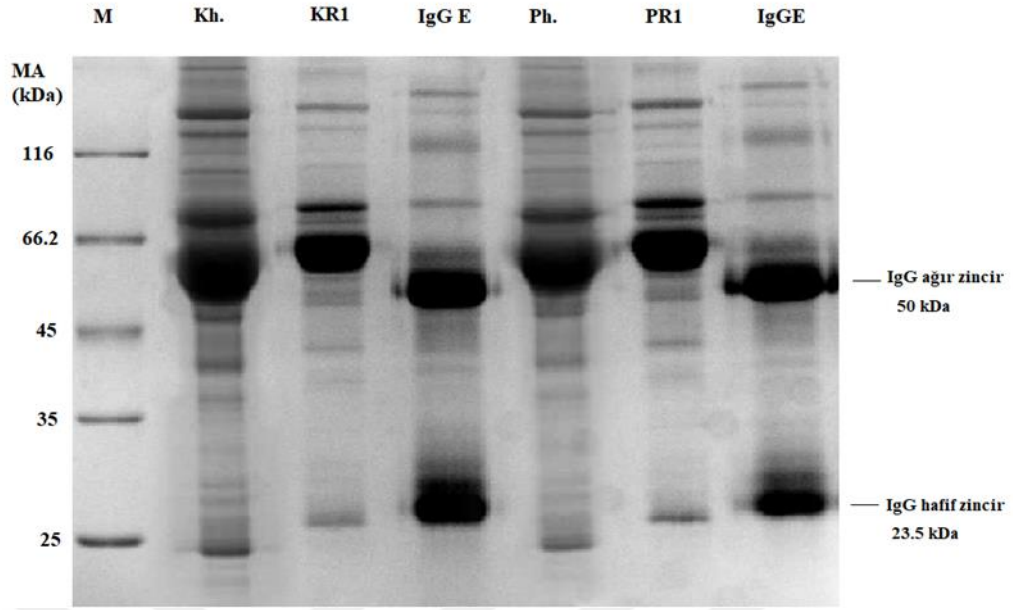


Şekil 4.1: Sistolik kan basıncı ve albümin düzeyi arasındaki Poisson eğrisi.

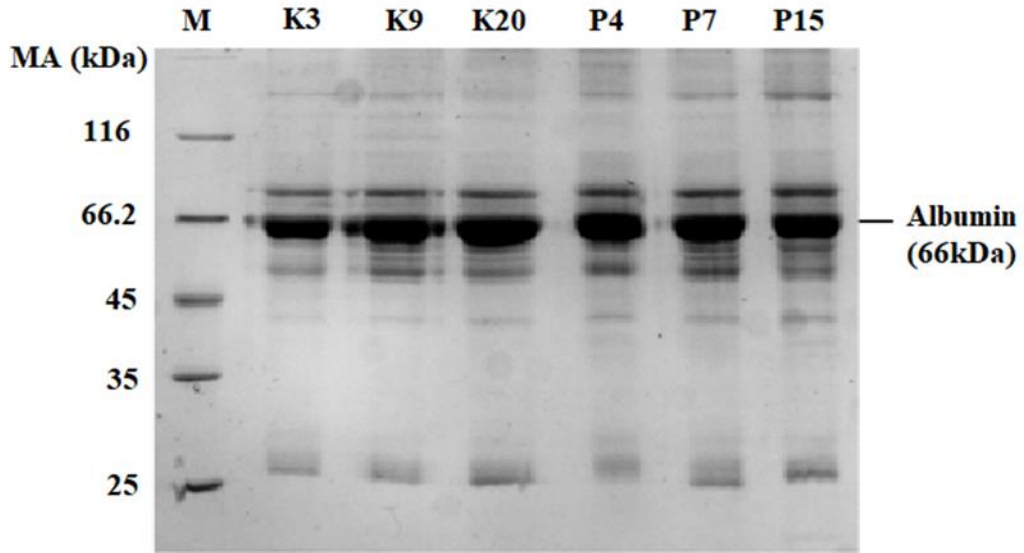
4.3 IGG VE ALBÜMİN UZAKLAŞTIRILMIŞ PLAZMA ÖRNEKLERİ

Havuz yapılan plazma örneklerinden kromatografik yöntemle IgG uzaklaştırıldıktan sonra yapılan elektroforetik analiz sonucunda IgG'nin (IgG ağır zincir: 50 kDa, hafif zincir: 23.5 kDa) başarıyla uzaklaştırıldığı Şekil 4.2'de gösterildi.

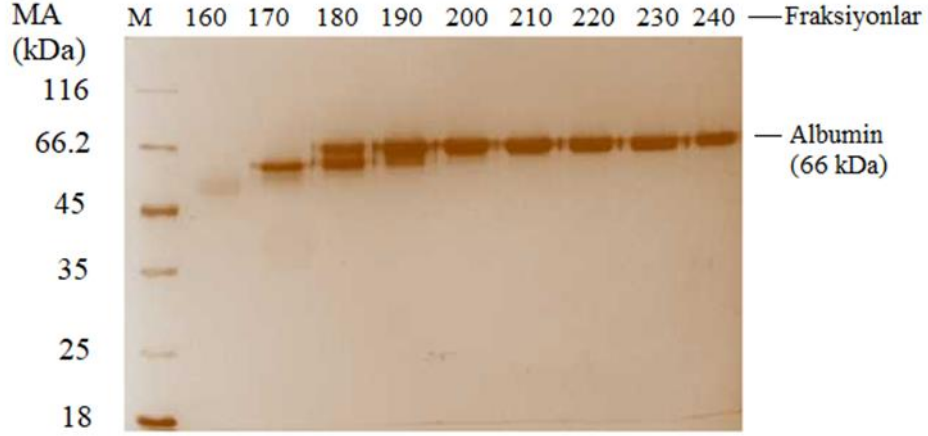
Rastgele seçilen 3 kontrol ve 3 preeklampsili bireyin protein örnekleri SDS-PAGE jelde yürütüldü ve albümin bantları (66 kDa) görüntülendi (Şekil 4.3). Daha sonra PrepCell sistemi kullanılarak albüminin uzaklaştırması gerçekleştirildi. Albümin içeren ve içermeyen fraksiyonlar SDS-PAGE ile belirlendi. Şekil 4.4'te görüldüğü gibi kontrol grubunda 180. fraksiyondan 240. fraksiyona kadar albümin bantı gözlemlendi. Bu nedenle incelenen fraksiyon aralığı daraltılarak 170-180. fraksiyonlar arası jelde yürütüldü ve albüminin hangi fraksiyondan itibaren gelmeye başladığı tespit edildi (Şekil 4.5). Kontrol grubunda 172. fraksiyondan 240. fraksiyona kadar olan fraksiyonlar albümin içerdiği için, 171. fraksiyon ve öncesindeki fraksiyonlar birleştirilerek ultrafiltrasyon aşamasına geçildi.



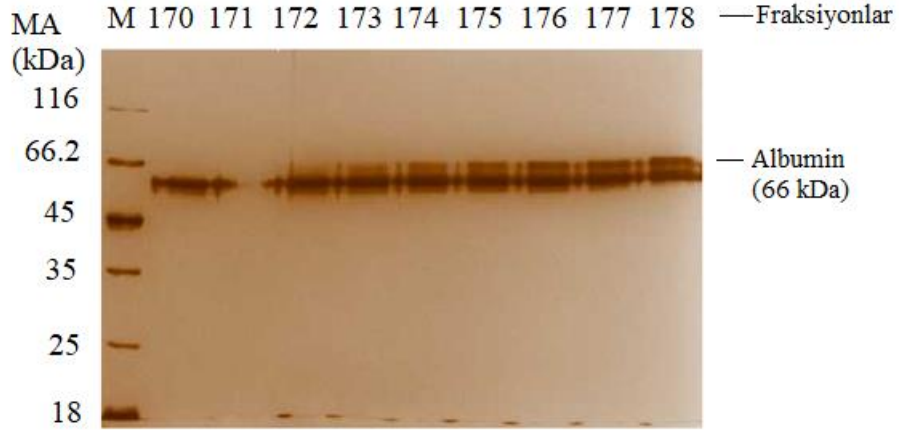
Şekil 4.2: Havuz yapılmış plazma örneklerinden kolon kromatografisi ile IgG'nin uzaklaştırılması öncesinde ve sonrasında IgG bantlarının SDS-PAGE jelindeki görüntüsü (Kh: Kontrol havuzu, Ph: Preeklampsi havuzu, KR1: IgG'nin 1. kromatografik ayırımından sonra elde edilen kontrol örneği, PR1: IgG'nin 1. kromatografik ayırımından sonra elde edilen P örneği, IgGE: IgG elüsyonu).



Şekil 4.3: Rastgele seçilen plazma örneklerinde albümin bantlarının SDS-PAGE jelindeki görüntüsü (M: Markır; K: Kontrol grubu; P: Preeklampsi grubu; farklı bireylere ait K ve P örnekleri farklı numaralarla gösterilmiştir).

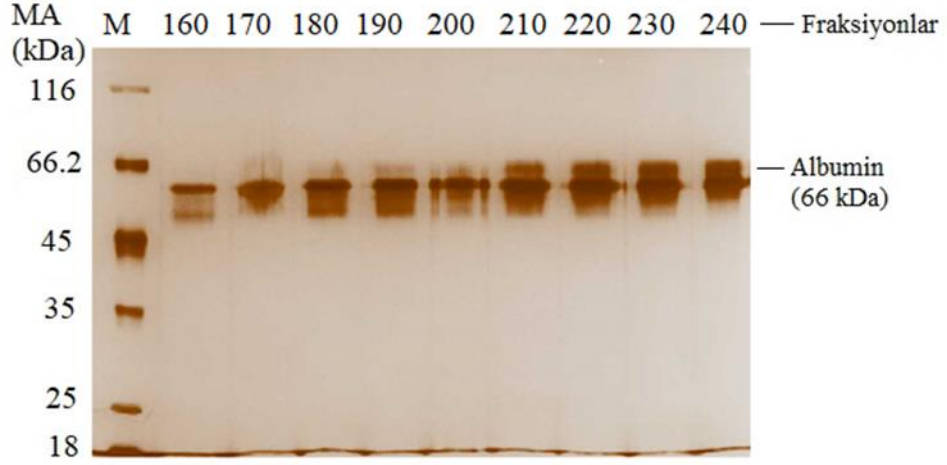


Şekil 4.4: Kontrol grubu plazma havuz örneğinden PrepCell ile albümin uzaklaştırması sırasında elde edilen 160-240. fraksiyonların SDS-PAGE jelindeki görüntüsü (MA: Molekül ağırlığı; M: Markır).

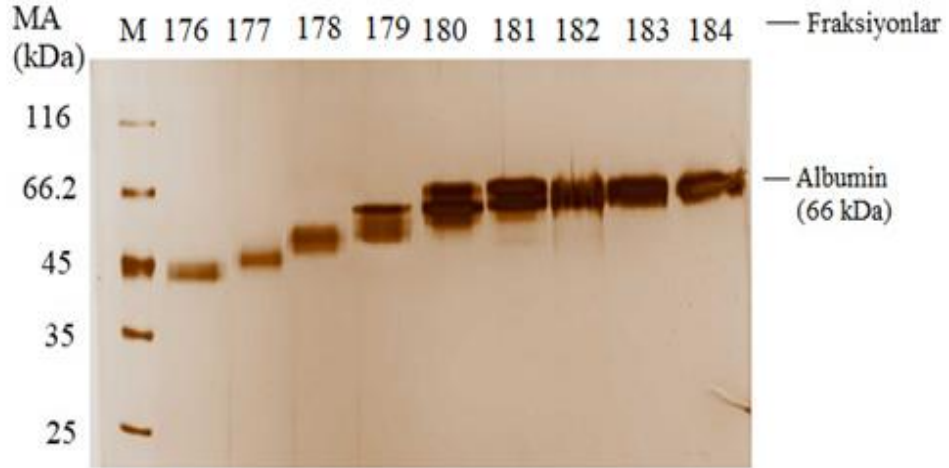


Şekil 4.5: Kontrol grubu plazma havuz örneğinden PrepCell ile albümin uzaklaştırması sırasında elde edilen 170-178. fraksiyonların SDS-PAGE jelindeki görüntüsü. (MA: Molekül ağırlığı; M: Markır.)

Aynı işlemler preeklampsi plazma havuz örneğinde de gerçekleştirildi. Preeklampsi grubuna ait örneğin önce 160-240. fraksiyonları SDS-PAGE ile analiz edildi (Şekil 4.6). Daha sonra 176-184. fraksiyonlar jelde analiz edildi (Şekil 4.7). Preeklampsi grubunda 179. fraksiyondan 240. fraksiyona kadar olan fraksiyonlar albümin içerdiği için, 178. fraksiyon ve öncesindeki fraksiyonlar birleştirilerek ultrafiltrasyon aşamasına geçildi.



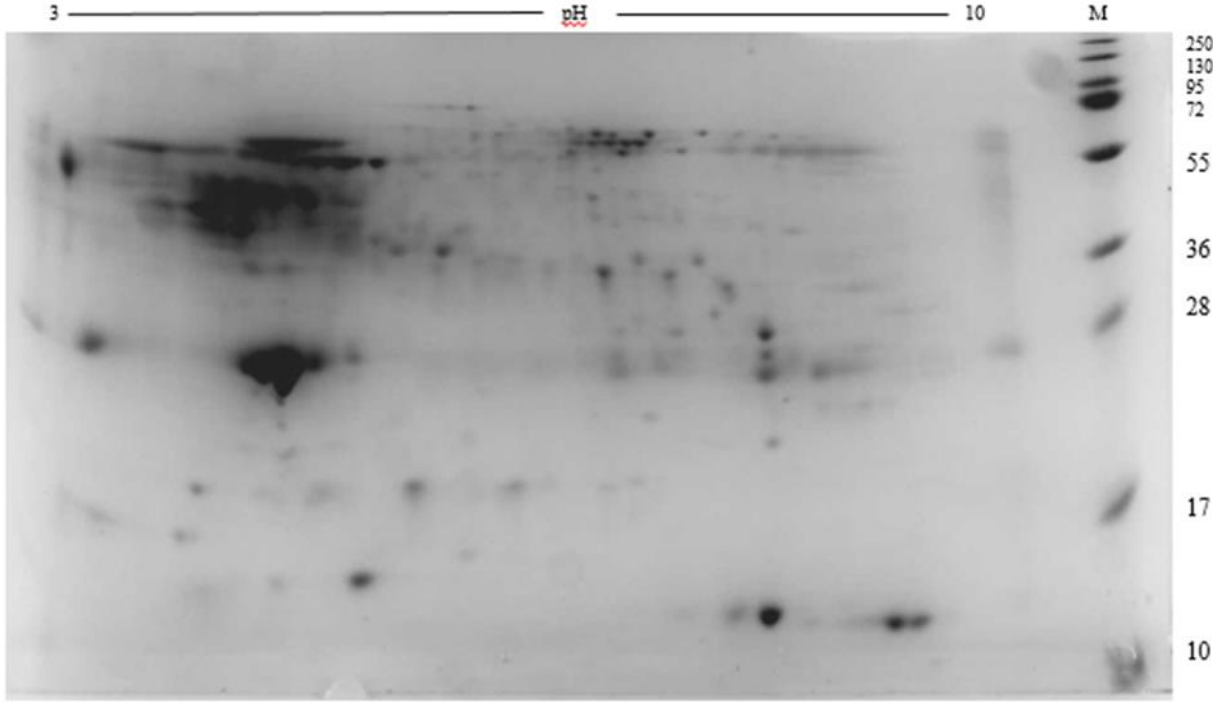
Şekil 4.6: Preeklampsi grubu plazma havuz örneğinden PrepCell ile albümin uzaklaştırması sırasında elde edilen 160-240. fraksiyonların SDS-PAGE jelindeki görüntüsü (MA: Molekül ağırlığı; M: Markır).



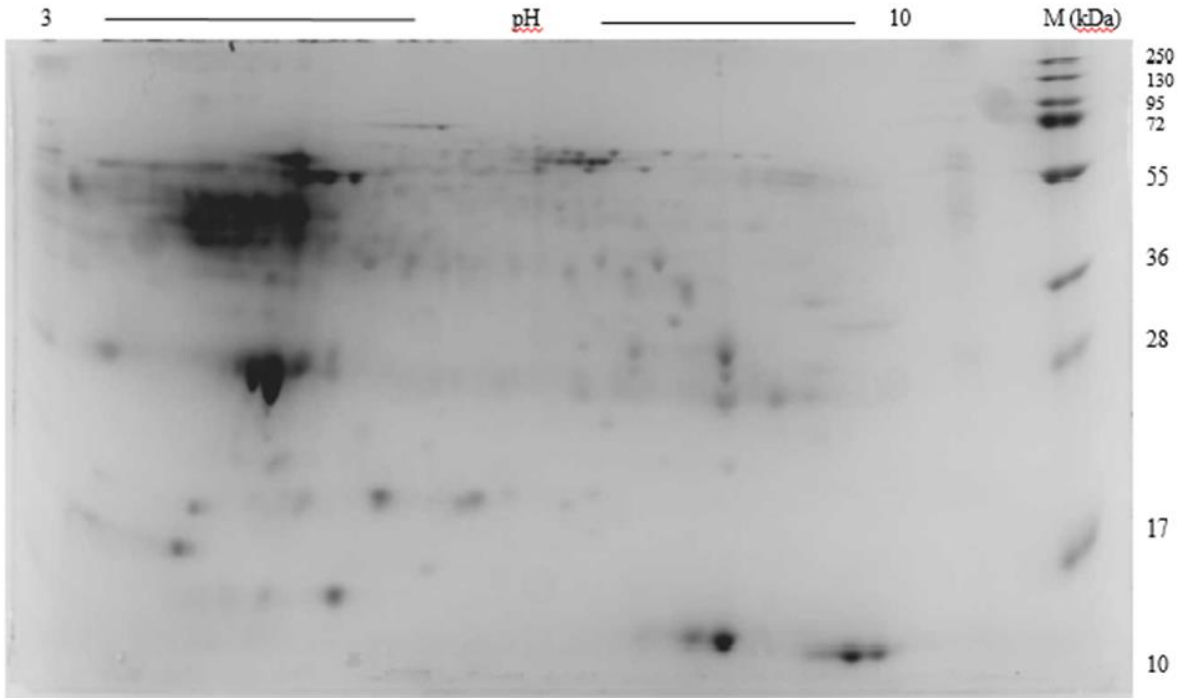
Şekil 4.7: Preeklampsi grubu plazma havuz örneğinden PrepCell ile albümin uzaklaştırması sırasında elde edilen 176-184. fraksiyonların SDS-PAGE jelindeki görüntüsü (MA: Molekül ağırlığı; M: Markır).

4.4 İKİ BOYUTLU SDS-PAGE BULGULARI

Ultrafiltrasyonla tampon değişimini takiben TCA ile çöktürülen kontrol ve preeklampsi havuz örneklerinin protein konsantrasyonları belirlendi ve her bir stripe (11 cm IPG Ready Strip, pH 3-10) 500 µg protein yüklenerek 2D SDS-PAGE gerçekleştirildi. Kontrol grubuna ait 2D SDS-PAGE jel görüntüleri Şekil 4.8’de, PE grubuna ait 2D SDS-PAGE jel görüntüleri ise Şekil 4.9’da verildi.



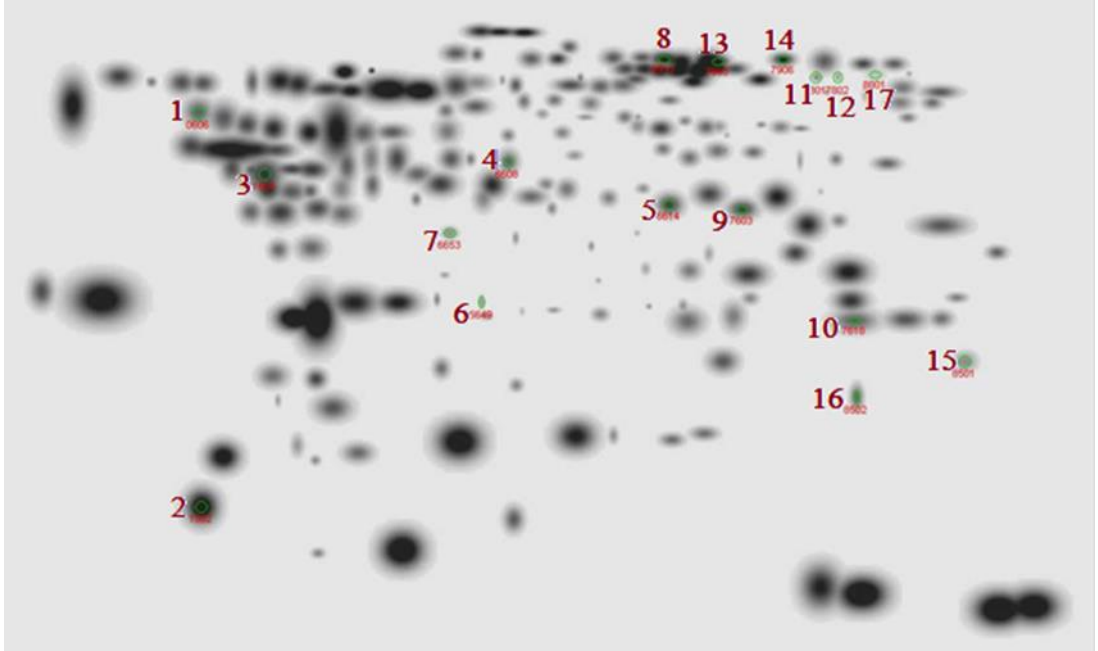
Şekil 4.8: Kontrol grubunun 2D SDS-PAGE jel görüntüsü (M: Markır).



Şekil 4.9: Preeklampsi grubunun 2D SDS-PAGE jel görüntüsü (M: Markır).

4.5 MALDI-TOF/TOF KÜTLE SPEKTROMETRİSİ İLE PROTEİNLERİN TANIMLANMASI

Kontrol ve preeklampsi grubu için ikişer tekrarlı olarak yürütülen jeller, QuantityOne (Bio Rad) yazılımı ile spot analizine uygun hale getirilerek, kendi grupları içerisinde karşılaştırıldı. Gruplar arasındaki farklı spotlar PDQuest Advance (Bio Rad) yazılımı ile belirlendi. 17 spotta regülasyonun farklı olduğu bulundu. Bunlardan kontrol grubuna kıyasla preeklampside, 5 spotta up-regülasyona rastlanırken 12 spotta down-regülasyon saptandı. Kesilen spotların görüntüsü Şekil 4.10'da verildi. Yapılan MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi analizi sonrasında up-regüle proteinlerin Haptoglobin (6.8 kat), Apolipoprotein A-I (1.82 kat), Kompleman C3 (5.34 kat), Keratin tip 1 hücre iskeleti 10 (9.71 kat) olduğu; down-regüle proteinlerin ise Serum albümin (1.3 kat), Fibrinojen beta zinciri (2.22 kat), α -1-antitripsin (4.83 kat) ve Fibrinojen alfa zinciri (68.88 kat) olarak saptandı. Elde edilen MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi verileri Tablo 4.5'te detaylı olarak verildi.



Şekil 4.10: Preeklampsi ve kontrol gruplarında ekspresyonu farklı olan proteinleri içeren ve MALDI-TOF MS analizi için kesilen 2D SDS-PAGE'deki spotlar. Kırmızı numaralara karşılık gelen olası proteinlerin AC no. (Accession numaraları) Tablo 4.5'te görülmektedir.

Tablo 4.5: Preeklampsisi ve kontrol gruplarında farklı düzeyde ekspresyonu yapılmış proteinlerin MALDI TOF/TOF sonuçları. AC No: Accession numarası; MA: Molekül ağırlığı; EP: Eşleşen peptid; pI: İzoelektrik nokta; DE: Dizi eşleşmesi; PED: Protein ekspresyonu değişimi; yukarı ok artışı, aşağı ok azalışı, okların yanındaki rakamlar kat değişimi göstermektedir.

No	AC No	Protein Adı	MA (Da)	Maldi Skoru	Beklenme Skoru	EP	PI	DE (%)	Tanımı	PED (kat)
1	P00738	Hpt_Human	45177	500	2.00E-46	23	6.13	30	Haptoglobin	↑ (6.80)
1	P00739	Hptr_Human	39005	130	2.00E-09	6	6.63	11	Haptoglobin ilişkili protein	↑ (6.80)
2	P02647	Apoa1 Human	30759	117	4.00E-08	13	5.56	27	Apolipoprotein A-I	↑ (3.07)
3	ID 1637 1646	C03_Human	187030	668	3.2e-063	46	6.02	22	Kompleman C3	↑ (5.34)
4	P02768	Albu_Human	69321	419	2.60E-38	23	5.92	31	Serum Albümin	↓ (1.30)
4	P00738	Hpt_Human	45177	60	0.021	11	6.13	25	Haptoglobin	↓ (1.30)
5	P02768	Albu_Human	69321	228	3.2e-019	16	5.92	16	Serum Albümin	↓ (2.72)

Tablo 4.5 (devam): Preeklampsi ve kontrol gruplarında farklı düzeyde ekspresyonu yapılmış proteinlerin MALDI TOF/TOF sonuçları. AC No: Accession numarası; MA: Molekül ağırlığı; EP: Eşleşen peptid; PI: İzoelektrik nokta; DE: Dizi eşleşmesi; PED: Protein ekspresyonu değişimi; yukarı ok artışı, aşağı ok azalışı, okların yanındaki rakamlar kat değişimi göstermektedir.

No	AC No	Protein Adı	MA (Da)	Maldi Skoru	Beklenme Skoru	EP	PI	DE (%)	Tanımı	PED (kat)
6	P02647	Apoa1 Human	30759	221	1.6e-018	20	6.13	45	Apolipoprotein A-I	↑ (1.82)
7	P13645	K1c10 Human	58792	258	3.20E-22	26	5.92	27	Keratin, tip I hücre iskeleti 10	↑ (9.71)
8	P02675	Fibb_Human	55892	468	3.20e-43	35	8.54	48	Fibrinojen beta zinciri	↓ 2.59
9	P02675	Fibb_Human	55892	272	1.3e-023	27	8.54	42	Fibrinojen beta zinciri	↑ 3.02
9	P02768	Albu Human	69321	211	1.6e-017	13	5.92	15	Serum Albümin	↑ 3.02
10	P01834	Igkc Human	11602	120	2.00E-08	7	5.58	56	Ig kappa zinciri C bölgesi	↓ 8.38

Tablo 4.5 (devam): Preeklampsi ve kontrol gruplarında farklı düzeyde ekspresyonu yapılmış proteinlerin MALDI TOF/TOF sonuçları. AC No: Accession numarası; MA: Molekül ağırlığı; EP: Eşleşen peptid; pI: İzoelektrik nokta; DE: Dizi eşleşmesi; PED: Protein ekspresyonu değişimi; yukarı ok artışı, aşağı ok azalış, okların yanındaki rakamlar kat değişimi göstermektedir.

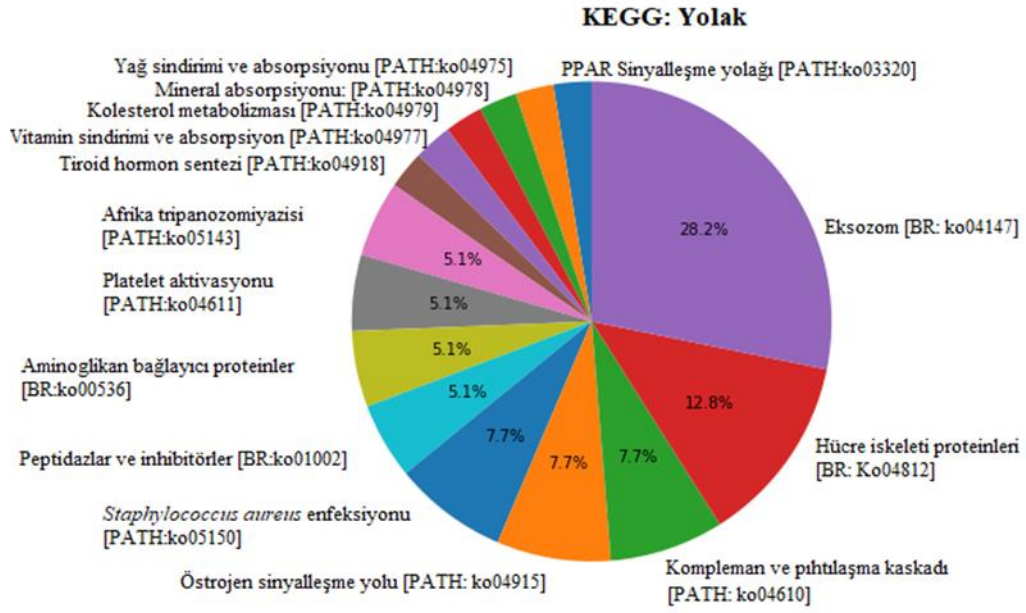
No	AC No	Protein Adı	MA (Da)	MS	Beklenme Skoru	EP	pI	DE (%)	Tanımı	PED (kat)
11	P01859	Ighg2 Human	35878	84	7.4e-005	4	7.66	4	Ig gama-2 zinciri C bölgesi	↓ 46.13
11	P01860	Ighg3 Human	41260	84	7.70E-05	4	8.23	4	Ig gama-3 zinciri C bölgesi	↓ 46.13
11	P02675	Fibb Human	55892	69	0.0026	10	8.54	13	Fibrinojen beta zinciri	↓ 46.13
12	P01859	Ighg2 Human	35878	76	0.00051	9	7.66	16	Ig gama-2 zinciri C bölgesi	↓ 3.35
12	P01860	Ighg_3 Human	41260	72	0.011	9	8.23	14	Ig gama-3 zinciri C bölgesi	↓ 3.35
13	P02675	Fibb Human	55892	250	2e-021	19	8.54	27	Fibrinojen beta zinciri	↓ 2.28
14	P02675	Fibb Human	55892	544	8.10E-51	39	8.54	53	Fibrinojen beta zinciri	↓ 2.22

Tablo 4.5 (devam): Preeklampsî ve kontrol gruplarında farklı düzeyde ekspresyonu yapılmış proteinlerin MALDI TOF/TOF sonuçları. AC No: Accession numarası; MA: Molekül ağırlığı; EP: Eşleşen peptid; PI: İzoelektrik nokta; DE: Dizi eşleşmesi; PED: Protein ekspresyonu değişimi; yukarı ok artışı, aşağı ok azalış, okların yanındaki rakamlar kat değişimi göstermektedir.

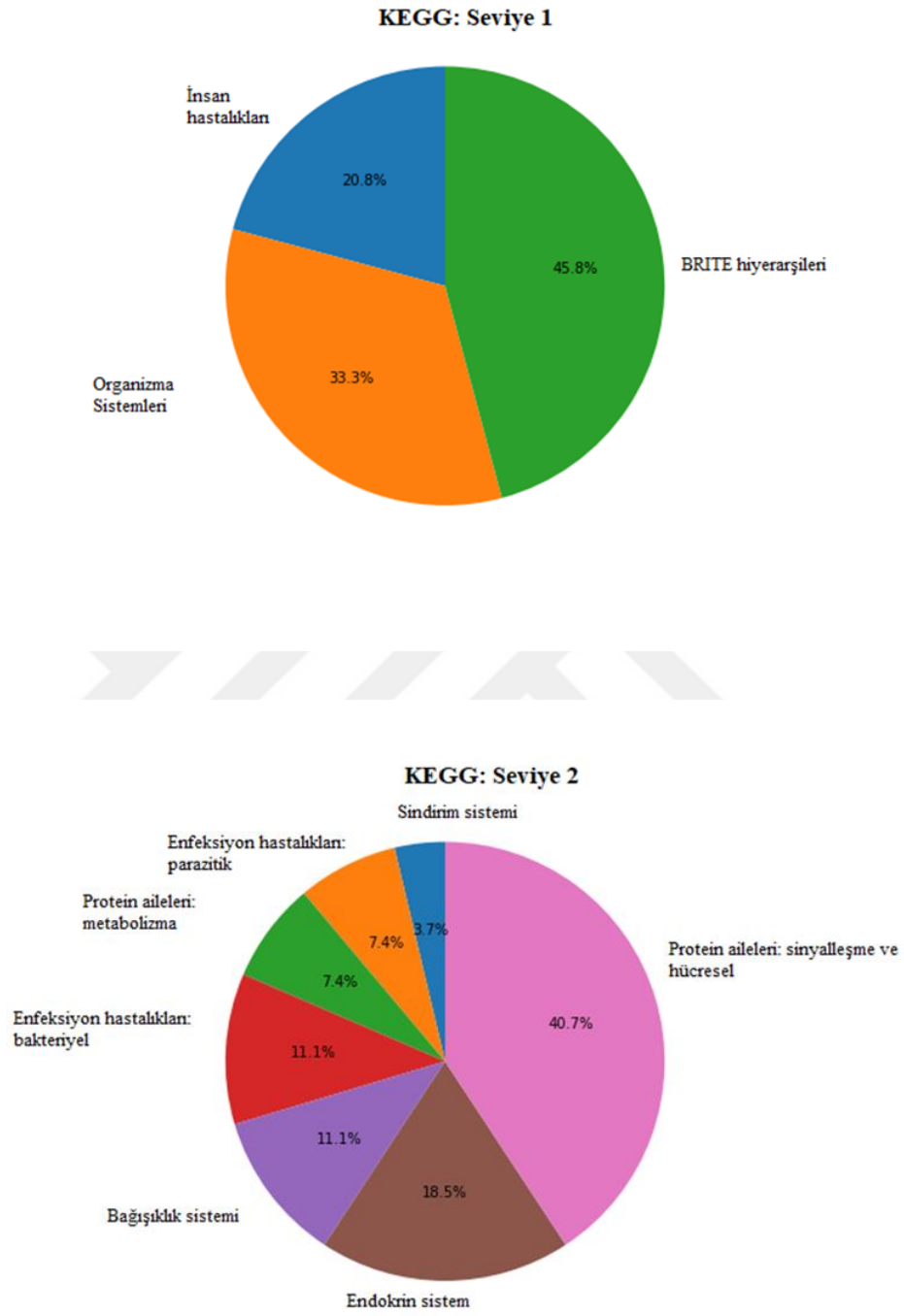
No	AC No	Protein Adı	MA (Da)	MS	Beklenme Skoru	EP	PI	DE (%)	Tanımı	PED (kat)
15	P01009	A1at Human	46707	348	3.20E-31	18	5.37	22	Alfa-1-antitripsin	4.83 ↓
16	P01009	A1at Human	46707	334	8.10E-30	18	5.37	20	Alfa-1-antitripsin	5.96 ↓
17	P02671	Fiba Human	94914	165	6.4e-013	16	5.7	13	Fibrinojen alfa zinciri	68.88 ↓
17	P01859	Ighg2 Human	35878	66	0.0046	5	7.66	8	Ig gamma-2 chain C' region	68.88 ↓
17	P01860	Ighg3 Human	41260	66	0.0056	5	8.23	7	Ig gamma-3 chain C' region	68.88 ↓

4.6 BİYOİNFORMATİK ANALİZLER

Tespit edilen proteinlerin Gene Ontology (GO)'ye göre biyolojik süreçlerdeki işlevleri, hücre bileşeni olarak rolleri, KEGG veri tabanıyla analizi ve moleküler fonksiyonları Şekil 4.11-Şekil 4.16 arasında verildi.

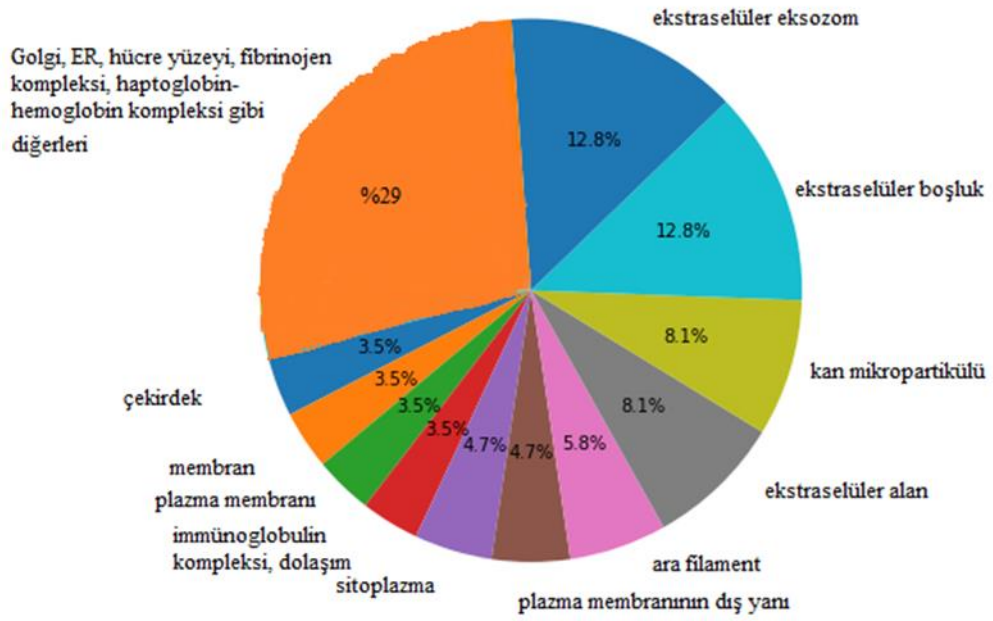


Şekil 4.11: MALDI sonuçlarına göre ekspresyonu değişen proteinlerin KEGG yolak analizi.



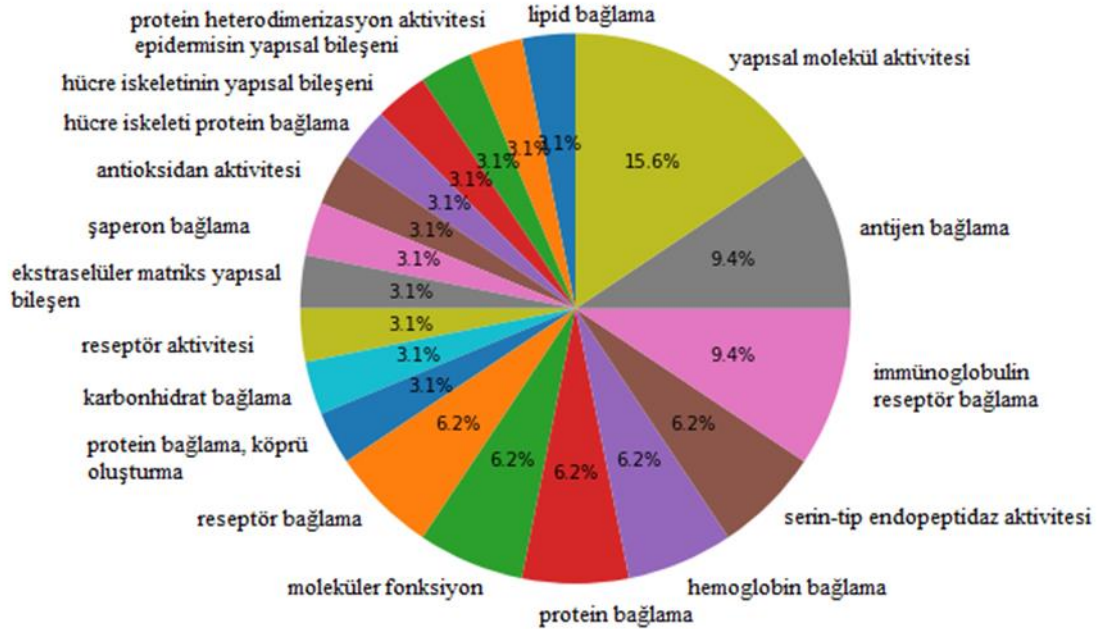
Şekil 4.12: MALDI sonuçlarına göre ekspresyonu değişen proteinlerin KEGG veri tabanında Seviye 1 ve Seviye 2 (sistem/hastalıklarla ilişki) analizi.

GO: Hücre Bileşeni

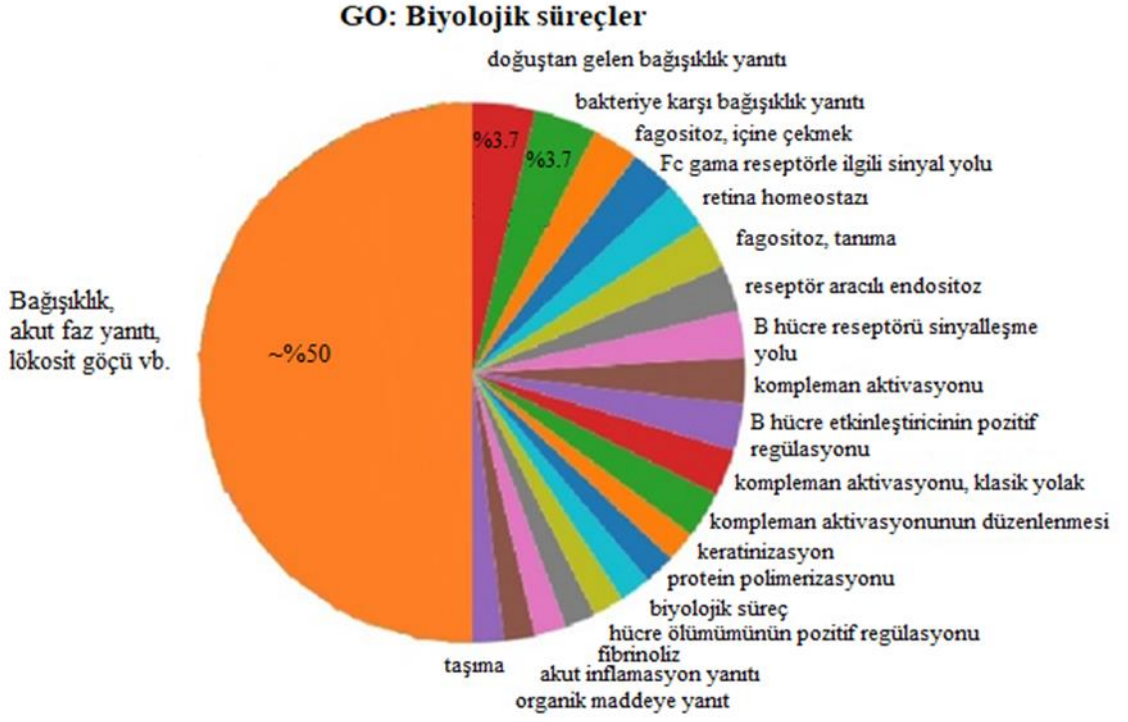


Şekil 4.13: MALDI sonuçlarına göre ekspresyonu değişen proteinlerin hücre bileşeni olarak rolleri (GO).

GO: Moleküler Fonksiyon



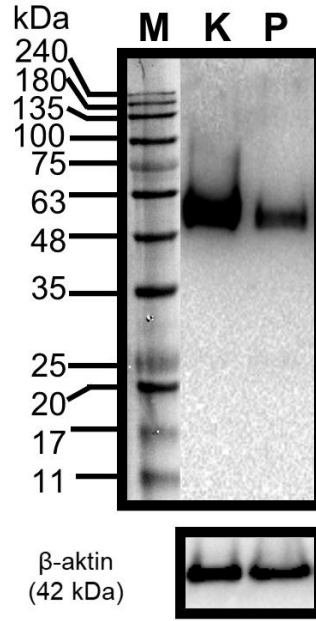
Şekil 4.14: MALDI sonuçlarına göre ekspresyonu değişen proteinlerin moleküler fonksiyonları (GO).



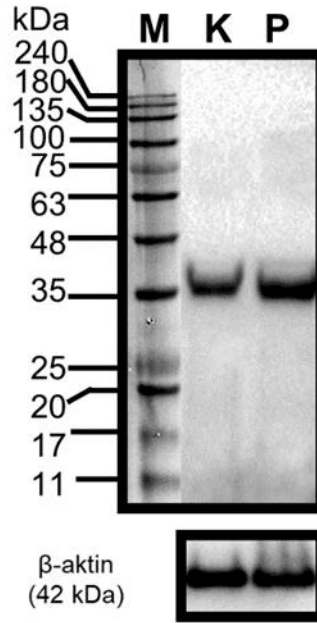
Şekil 4.15: MALDI sonuçlarına göre ekspresyonu değişen proteinlerin biyolojik süreçlerdeki rolleri (GO).

4.7 WESTERN BLOT VERİLERİ

Beta-aktin (42 kDa)'e göre normalize edilen Western blot verilerine göre preeklampsi grubunda kontrole kıyasla fibrinojen β (55 kDa) ekspresyonunun 2.22 kat azaldığı (Şekil 4.17); haptoglobin (37 kDa) ekspresyonunun ise 2.54 kat arttığı (Şekil 4.18) belirlendi.



Şekil 4.16: Preeklampsi grubunda fibrinojen β ekspresyonundaki azalışın Western blotlama ile validasyonu.



Şekil 4.17: Preeklampsi grubunda haptoglobin ekspresyonundaki artışın Western blotlama ile validasyonu.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada preeklampsili gebeler ile sağlıklı gebelerden alınan plazma örneklerinde anti-anjiyogenik faktörlerden sFlt-1 ile anjiyogenik faktörlerden PlGF'nin düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçüldü, her bir grupta yer alan tüm bireylere ait plazma örnekleri birleştirilerek havuz oluşturuldu ve proteomları karşılaştırıldı. İki grubun 2D SDS-PAGE ile ayrıştırılan proteinlerinden regülasyonları farklı olanlar MALDI-TOF/TOF MS ile analiz edildi, biyoinformatik araçlarla tanımlandı ve iki tanesi (fibrinojen ve haptogloblin) Western blotlama ile valide edildi.

Demografik veriler (Tablo 4.1) incelendiğinde iki grup arasında yaş, gebelik haftası ve boy arasında farklılık olmaması, sistolik ve diastolik kan basınçları ile idrarda albüminin PE grubunda belirgin şekilde yüksek olması örneklemenin iyi yapıldığını göstermektedir (ACOG, 2013; Ramos ve diğ., 2017). Toplam protein derişiminin PE grubunda anlamlı şekilde düşük olması dikkat çekicidir. Albümin ile sistol arasındaki korelasyon (Şekil 4.1) anlamlıdır ve PE tanısının doğru yapıldığını kanıtlar niteliktedir (Sogani ve diğ., 2014). PE grubunun lökosit sayısının kontrol grubundan anlamlı şekilde farklı olması inflamasyonun göstergesi olabilir.

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar, dolaşımdaki anjiyogenik faktörlerdeki değişikliklere bağlı olarak antianjiyogenik evrenin preeklampsiye neden olduğunu ortaya koymaktadır (Hod ve diğ., 2015). Ramos ve diğ. (2017)'ne göre preeklampsi tanısında gebeliğin 20. haftasından sonra gelişen hipertansiyona aşağıdaki kriterlerden en az biri eşlik etmektedir:

1. Ciddi proteinüri (Protein/kreatinin oranı > 0.3);
2. Maternal organik işlev bozuklukları;
 - Böbrek fonksiyon kaybı (kreatinin > 1.02 mg/dL);
 - Karaciğer fonksiyon bozukluğu (transaminazların en az 2 kat artması);
 - Nörolojik komplikasyonlar (örneğin, zihinsel durum değişikliği; körlük);
 - Hematolojik komplikasyonlar (trombositopeni, yaygın damar içi pıhtılaşma);

- Antianjiyogenez durumu (PIGF < 36 pg/mL veya sFlt-1/PIGF oranı > 85).

3. Uteroplasental disfonksiyon

Normal gebelikte sFlt-1'in serum konsantrasyonu gebeliğin 8-12. haftasından 16-20. haftasına kadar düşüktür, daha sonra 26-30. hafta civarında dereceli olarak artarken gebeliğin 35-39. haftasında hızlıca yükselir, doğumdan sonra normal düzeyine döner; preeklampitik gebelerde ise sFlt-1 düzeyi normal gebelerden oldukça yüksektir (Lagana ve diğ., 2016). Levine ve diğ. (2004) PE'de sFlt-1 düzeyinin arttığını ve hastalığın klinik olarak ortaya çıkışından 5 hafta önce bunun algılanabileceğini göstermişlerdir. Widmer ve diğ. (2007), kontrole kıyasla preeklampsi gelişen gebelerde 25. haftada sFlt-1 düzeyinin arttığını saptamışlardır. Moore ve diğ. (2007), özel algoritma kullanarak 34. haftada PE gelişen gebelerde gebeliğin 22-26. haftalarında hastalığın tahmin edilebildiğini rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada ELISA yöntemi ile yapılan ölçümler sonucunda plazma sFlt-1 düzeyi PE grubunda 9.64 ± 0.72 ng/mL (n=25), kontrol grubunda 13.68 ± 2.02 ng/mL (n=21) bulunmuştur. Ancak bu değerler mg protein başına göre hesaplandığında PE grubunda 0.83 ± 0.063 ng/mg protein, kontrol grubunda 0.067 ± 0.010 ng/mg protein bulunmuştur. Bu birim esas alındığında PE'li gebelerde plazma sFlt-1 düzeyi kontrole kıyasla anlamlı derecede yüksektir (p değeri <0.0001). Bu sonuç literatürdeki verilerle (Lagana ve diğ., 2016; Levine ve diğ., 2004; Widmer ve diğ., 2007) uyumlu çıkmıştır.

Normal gebelikte serum PIGF konsantrasyonu 8-12. haftalarda artmaya başlar ve 29-32. haftalarda en yüksek değerine ulaşır; 33-40. haftalarda düşer (Lagana ve diğ., 2016). PE boyunca PIGF düzeyi kontrole kıyasla oldukça düşüktür (Polsani ve diğ., 2013). Sistemik bir derlemede PE gelişen gebelerde 2. ve 3. trimesterde PIGF düzeyinin düştüğü ve bunun hastalığın şiddeti ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Widmer ve diğ. 2007).

Bu çalışmada ELISA yöntemi ile yapılan ölçümler sonucunda plazma PIGF düzeyi PE grubunda 0.36 ± 0.03 ng/mL (n=25), kontrol grubunda 0.49 ± 0.08 ng/mL (n=21) bulunmuştur. Normalizasyondan sonra da PE grubunda 0.0026 ± 0.0005 ng/mg protein, kontrol grubunda 0.0023 ± 0.0004 ng/mg protein değerleri elde edilmiştir. Bu birim esas alındığında, PE'li gebelerle kontrol grubu arasında plazma PIGF düzeyi bakımından anlamlı bir fark yoktur. Bu sonuç, ilgili referanslarla (Widmer ve diğ. 2007; Polsani ve diğ., 2013; Lagana ve diğ., 2016) uyumlu gözükmemektedir. Bunun nedeni, eğer teknik bir hatadan ileri

gelmiyorsa, büyük bir olasılıkla preeklampsi boyunca bu faktörün düzeyindeki dalgalanmalar veya öngörülemeyen metabolik aktivitelerdir.

Preeklampsi konusunda yapılmış farklı çalışmalarda bu iki faktörün düzeyleri arasında varyasyon bulunması birçok araştırmacıyı farklı bir parametre arayışına itmiştir. Bazı araştırmacılar serum sFlt-1 ve PlGF verilerinin birleştirilmesi ile elde ettikleri sFlt-1/PlGF oranının PE tahmininde kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (Levine ve diğ., 2004; Moore ve diğ., 2007; Kim ve diğ., 2007; Birdir ve diğ., 2018; Tardif ve diğ., 2018). Preeklampsinin gelişimini tahmin etmek için anjiyogenik ve antianjiyogenik faktörlere (sFlt-1, PlGF, sEng gibi) odaklanan kapsamlı araştırmalardan birinde ise bu faktörlerin sadece erken başlangıçlı preeklampsinin tahmin edilmesinde kullanılabildiği, dolayısıyla düşük özgüllük ve hassasiyet nedeniyle genel klinik pratikte uygulanmaya elverişli olmadığı vurgulanmaktadır (Nguyen ve diğ., 2019).

sFlt-1/PlGF (Elecsys/Roche) oranının limit değeri >38 olduğunda, bir hafta içinde preeklampsi gelişeceğinin öngörülme oranı %99.3'tür; dört hafta içinde preeklampsi gelişeceğini öngörme oranı ise %36.7'dir (Zeisler ve diğ., 2016). Bu sonuçlar klinik olarak şüpheli olgularda bu oranın yararlı bir parametre olabileceğini düşündürmektedir. Pant ve diğ. (2019)'nin ELISA yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada sFlt-1/PlGF oranının PE'de kontrole kıyasla yaklaşık 10 kat yüksek olduğu bulunmuştur (sırasıyla, 31.6 ± 9.6 , 3.2 ± 1.3).

Bu tez çalışmasında bulunan sFlt-1/PlGF oranı bakımından PE ve kontrol grupları arasında ilk bakışta bir fark gözlenmemekle beraber, ham veriler birim protein başına normalize edildiğinde PE grubundaki oranın (0.20 ± 0.02), kontrole (0.13 ± 0.006) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek (p değeri 0.0003) olduğu ortaya konulmuştur. Bu sonuç literatürdeki birçok referansla uyumludur (Ramos ve diğ., 2017).

Kan örneklerinin gebeliğin kaçınıcı haftasında alındığı, PE'nin erken başlangıçlı ve geç başlangıçlı olması, PE'nin hafif veya şiddetli olması, analizde kullanılan yöntemin ve hatta kitlerin farklı olması (ELISA, elektrokemilüminesans) literatürdeki farklı verilerin nedenleri olarak değerlendirilmektedir. Dolayısıyla PE tanısında sFlt-1/PlGF oranının ve diğer anjiyogenik faktörlerin yararlı belirteçler olup olmadığını belirlemek ve literatürdeki tartışmalı sonuçları aydınlığa kavuşturmak için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Tümör anjiyogeneğinde ve büyümesinde önemli rol oynaması, VEGF yolağını anti kanser

terapilerinde önemli bir hedef haline getirmiş ve bu konuda birçok araştırma yapılmıştır. Örneğin, *Bifidobacterium infantis* aracılı sFlt-1 gen transfer sisteminin kanser tedavisi için umut verici bir terapötik yaklaşım sunduğu ileri sürülmektedir (Zhu ve diğ., 2011). Preeklampsi ve kanser ile ilişkilendirilen VEGF yolağına olan ilgi artarak devam edecektir.

Bu çalışmada elde edilen proteomik veriler, PE ve kontrol grupları arasında 17 spotta toplam 12 proteinin ekspresyon düzeyinde farklılık olduğunu ortaya koymuştur (Tablo 4.5). Maldi skoru, eşleşen peptid sayısı ve dizi eşleşme oranı yüksek olan adaylar dikkate alındığında, up-regüle proteinlerin haptoglobin (6.8 kat), kompleman C3 (5.34 kat), apolipoprotein A-1 (1.82 kat), keratin tip 1 hücre iskeleti 10 (9.71 kat), olduğu down-regüle proteinlerin ise albümin (1.3 kat), fibrinojen beta zinciri (2.59 kat), α -1-antitripsin (4.83 kat) ve fibrinojen alfa zinciri (68.88 kat) olduğu saptanmıştır. Preeklampsi hastalarında kontrole kıyasla, fibrinojen alfa zincirindeki (%13 dizi eşleşmesi ile) 69 kat down-regülasyon dikkat çekmektedir.

Normal gebeliklerde fibrinojen seviyeleri (F VII, F VIII, F IV, F V) belirgin bir artış gösterir. Yapılan bazı çalışmalarda preeklampitik gebelerde fibrinojen değerlerinin sağlıklı gebelerden düşük olduğu tespit edilmiştir (Schjetlerin ve diğ., 1997; Schjetlein ve diğ. 1999; Açmaz ve diğ., 2008; Liu ve diğ., 2020). Bu çalışmada da fibrinojen alfa zincirinde (68.88 kat) ve beta zincirinde (46.13 kat) belirgin down-regülasyon gözlenmiştir. Ancak literatürde orta ve şiddetli preeklampsi görülen gebelerde normal gebelere kıyasla fibrinojen düzeyinin yüksek olduğunu ileri süren bir çalışmaya da rastlanmıştır (Üstün ve diğ., 2005). Fibrinojen genel olarak kanın pıhtılaşmasında görevlidir; plasentanın damarlarında hasar meydana geldiğinde fibrine dönüşerek pıhtılaşmayı sağlar. Alfa 1 antitripsin ise, vasküler endotel hücrelerinde oksidatif stresi baskılayarak hücre koruyucu rol oynar (Feng ve diğ., 2017). Nguyen ve diğ. (2019)'ne göre de fibrinojen ve Alfa 1 antitripsin ikinci ve üçüncü trimesterde up-regüle olmuştur ve bu up-regülasyon erken dönemde plasenta hasarı geliştiğinin ve erken başlayan preeklampsinin kullanışlı bir belirteci olabilir. Ancak bizim çalışmamızda bu proteinlere ilişkin alınan sonuçlar up-regülasyonu değil, down-regülasyonu işaret etmektedir. Sonuçlar arasındaki bu uyumsuzluk yapılan bir meta analiz çalışmasında da vurgulanmış, pıhtılaşma faktörlerinin de içinde yer aldığı 401 biyobelirteç adayının regülasyon sonuçlarında, çalışmalar arasındaki heterojenite nedeniyle tutarsızlık bulunduğu bildirilmiştir (Wu ve diğ., 2015).

Serbest hemoglobin (Hb), endotel fonksiyon bozukluğuna, damarlarda hasar ve inflamasyona neden olabilir; oksitlenmiş hemoglobin endotele zarar verebilir (Schaer ve diğ., 2013). Haptoglobin (Hp) hücree dışı hemoglobine bağlanarak, hemoglobinin monosit ve makrofajlar tarafından parçalanmasını sağlar (Smith ve McCulloh, 2015). Endotel fonksiyon bozukluğunda NO tükenmesi kabul gören patofizyolojik bir mekanizmadır (Schaer ve diğ., 2013). Ancak yerel doku çevresinde hemoglobin pro-oksidan ve inflamasyon ajanı gibi davranabilir (Schaer ve Buehler, 2013). Hücre dışı hemoglobin, orak hücreli anemi, sıtma ve kan nakli gibi hemolitik olgularda bir hastalık tetikleyicisi olarak kabul edilmiştir (Schaer ve diğ., 2013). Serbest Hb'nin pek çok yan etkisi, Hb süpürücü akut faz proteini Hp ile hafifletilebilir. Serbest Hb'nin neden olabileceği birincil fizyolojik bozuklukların, kardiyovasküler sistem ve endotelyumda tetiklenen oksidatif toksisiteye bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu toksisitenin ve Hp'nin koruyucu aktivitesinin moleküler mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da, Hp'nin Hb'yi iki yolla koruduğu öne sürülmektedir (Schaer ve diğ., 2013). İlk olarak Hp, Hb'nin protein yapısını stabilize eder, böylece proteinin açılmasını ve kümelenmesini önler. İkincisi, Hp, Hb'den reaktif lipoproteinlere hem ve/veya radikal transferini durdurur. Daha da önemlisi, Hp'nin bu kafesleme etkisi, Hb/Hp kompleksinin Hb- ve H₂O₂'ye maruz kalan dokularda koruyucu olarak işlev görmesine izin verir.

Boretti ve diğ. (2009) hayvan (köpek ve gine domuzu) deney modellerinde řu sonuçlara ulaşmışlardır: (1) endojen Hp sentezinin farmakolojik indüksiyonu veya saflaştırılmış Hp uygulanması, damar içine uygulanan Hb'nin tutulmasına neden olur; (2) Hp, yüksek afiniteli kompleks oluşumu yoluyla, serbest Hb infüzyonuna verilen sistemik hipertansif yanıtı köreltmektedir; ve (3) Hb'nin Hp tarafından intravasküler tutulması, böbrek gibi damar dışı bölmelerde peroksidasyona bağlı toksisiteyi önler.

Plazmada serbest Hb, Hp'ye bağlanarak makrofajlar tarafından parçalanır. Ancak plazmada oldukça yüksek miktarda bulunursa oksihemoglobin veya methemoglobin şeklinde albümine veya globüline bağlanarak idrarla atılır (Smith ve McCulloh, 2015). Graw ve diğ. (2017) yaptıkları fare deneylerinde serbest hemoglobin enjekte ettikleri farelerde hipertansiyon geliştiğini, akabinde haptoglobin enjekte ettiklerinde tansiyonun düştüğünü, ancak yüksek yağlı diyetle beslenen ve endotel fonksiyon bozukluğu olan farelerde serbest hemoglobin

enjeksiyonundan sonra haptoglobin enjekte edildiğinde tansiyonun düşmediğini gözlemişlerdir.

Literatürde haptoglobin ile ilgili bazı polimorfizm çalışmalarına da rastlanmıştır. Kelley ve diğ. (2019) yaptıkları çalışmada Tip 1 diyabet hastası olup preeklampsisi gelişen hastalarda Hp fenotipinin lipid metabolizması ile preeklampsisi riskini düzenleyebileceği sonucuna varmışlardır. Sammour ve diğ. (2010), haptoglobin 1-1 fenotipinin preeklampside koruyucu role sahip olabileceğini vurgulamışlardır. Aynı şekilde Sertorio ve diğ. (2013) Hp1-1 fenotipinin NO süpürücülüğünü azaltarak preeklampside koruyucu rol oynayabileceğini, Hp 2-1 ve Hp 2-2 fenotipinin NO biyoyararlanımını azaltarak preeklampsinin şiddetlenmesinde rol oynayabileceğini belirtmişlerdir. Weissgerber ve diğ. (2012) ise ilk gebeliği olan beyaz kadınlarda, Hp 2-1 fenotipinin preeklampsisi için yüksek risk faktörü olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Bu çalışmaya dahil edilen hastaların genom bilgileri yoktur; hangi Hp fenotipine sahip olduğu bilinmemektedir. Gelecekte bu hastalarda Hp polimorfizmi konusunda bir inceleme yapmak yararlı olabilir ve proteom verileriyle birleştirildiğinde haptoglobinin PE'deki rolüne ilişkin bilgileri geliştirebilir.

Diğer taraftan, kronik inflamasyon durumunda artan haptoglobin düzeyleri, bu proteinin doku onarımında rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Sistemik vaskülitte haptoglobin yan damarların oluşumunu teşvik ederek iskemiye (dokuya kan akışının yavaşlatılması ya da durdurulması) kompanse edebilir (Cid ve diğ., 1993). Preeklampside ise haptoglobinin plasenta gelişimi sırasında meydana gelen anjiogenezdeki kusurlar ve/veya artan inflamasyona yanıt olarak up-regüle olduğu düşünülebilir. Ancak, Kolialexi ve diğ. (2017) haptoglobin ekspresyonunun gebeliğin 11-13. haftalarda preeklampside kontrole kıyasla düşük olduğunu rapor etmişlerdir. Literatürde bunun tam tersi bilgilere de rastlanmıştır. Örneğin, Arinola ve diğ. (2016), serum haptoglobin düzeyini preeklampsisi gelişen hastalarda sağlıklı gebelere kıyasla daha yüksek bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda benzer bir bulgu elde edilmiştir: preeklampsisi tanısı konulan 3. trimesterdeki gebelerde haptoglobinin ekspresyon düzeyi, sağlıklı gebelere göre yüksektir (MALDI TOF-TOF MS verilerine göre en az 6.8 kat, Western bulgularına göre en az 2.5 kat). Haptoglobin düzeyine ilişkin farklı sonuçların büyük olasılıkla örnekleme zamanındaki farklılıktan ileri geldiği düşünülmektedir.

Haptoglobin ve fibrinojen, inflamasyonun akut faz proteinlerinden olup pozitif reaktant kabul edilirken, albümin negatif reaktanttır (Gruys ve diğ., 2005). Preeklampsi gelişen gebelerde inflamasyonun akut fazında haptoglobin ve fibrinojen düzeylerinde artış beklenir. Nitekim bu çalışmada haptoglobinde beklenen artış gözlenmiştir. Ancak fibrinojen α ve β zincirlerinde belirgin düşüşler dikkati çekmektedir. Bu sonuçlara bakıldığında, preeklampsi gelişiminde, fibrinojen alfa, beta, gama zincirlerindeki tek nükleotid polimorfizmleri ile kandaki fibrinojen düzeyleri arasındaki ilişkinin daha ileri çalışmalarla değerlendirilmesi ve hastaların hemolitik hastalıklar yönünden de incelenmesi gerektiği görülmektedir. Benzer şekilde, kandaki serbest Hg ve Hp düzeyleri ile Hp fenotipleri arasındaki ilişki de incelenmelidir.

Haptoglobin APOA1 (Apolipoprotein A-1) ile de ilişkili bir proteindir. APOA1 kolesterolün taşınmasında ve inflamasyonun düzenlenmesinde rol oynar (Melhem ve diğ., 2019). Hayvan modellerinde apolipoprotein mimetik peptidlerin ateroskleroza önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir ve vasküler inflamatuvar hasarları tedavi etmek için mükemmel bir tedavi seçeneği olabileceği belirtilmiştir (Van Lenten ve diğ., 2008). Bizim çalışmamızda da preeklampsi gebelerde APOA1 up-regüle durumdadır. APOA1'in up-regülasyonu preeklampsi gelişiminin lipid metabolizmasıyla da ilişkili olabileceğini ve/veya inflamasyona bağlı hasarı onarma amaçlı olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim Mei ve diğ. (2017) de preeklampsi gebelerde APOA1 ve haptoglobin ekspresyon düzeylerinin sağlıklı gebelere kıyasla yüksek olduğunu bulmuşlardır. Bu veri bizim bulgularımızı (PE'de APOA1 ve haptoglobin yüksek düzeydedir) desteklemektedir. Melhem ve diğ. (2019) de esas olarak plasental kaynaklı APOA1 salımının maternal kolesterol homeostazını sağlamak için gerekli olduğunu ileri sürmektedirler.

Gebeliğin devamı için, plasenta yoluyla anneye geçen fetal antijenlere karşı annede immün yanıtsızlık ya da tolerans geliştirilmesi gereklidir. Preeklampsi gelişen gebelerde bağışıklık sisteminin daha aktif olduğu görülmektedir (Saito ve diğ., 2007). Kompleman C3 (CO3)'ün up-regülasyonu inflamasyon ve/veya endotel hasarına bağlı olarak bağışıklık sisteminin aktifleştiğini veya fetal antijenlere karşı toleransın geliştirilemediğini düşündürmektedir.

Gelecek çalışmalarda tartışmada ele alınan proteinler dışında kalan, fakat PE'de regülasyon farklılığı proteomik çalışmalarla ortaya konulmuş olan diğer olası proteinlerin (Apolipoprotein A-I, Kompleman C3, Keratin tip 1 hücre iskeleti 10, Serum albümin, α -1-

antitripsin, Fibrinojen alfa zinciri) de validasyonları yapılmalı ve genel değerlendirmelerde bu proteinler de göz önüne alınmalıdır.

Sonuc olarak bu çalışma preeklampside anjiyogenik faktörlerle plazma proteomu arasındaki ilişkiye dair önemli ipuçları sağlamıştır. Bugüne kadar yapılmış proteomik çalışmalarda alınan heterojen sonuçlardan da görüldüğü üzere, plazma örneğinin gebeliğin kaçıncı haftasında alındığı, kullanılan proteomik yaklaşım ve bazı yöntemsel detaylar ( zellikle plazma ve/veya serum örneklerinde bol olarak bulunan proteinlerin uzaklaştırılması sürecinde) arasındaki farklılıkların ortadan kaldırılması için standart prosedürlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulduğu anlaşılmaktadır.



KAYNAKLAR

- Açmaz, G., Tayyar, A., Tayyar, M., 2008, Assessment of the role of fibrinogen in preeclampsia, *Erciyes Tıp Dergisi*, 30 (3), 138-143.
- Ahmed, A., 2011, New insights into the etiology of preeclampsia: identification of key elusive factors for the vascular complications, *Thrombosis Research*, 127 (3), 72-75.
- Alpoim, P. N., Godoi, L. C., Freitas, L. G., Gomes, K. B., Dusse, L. M., 2013, Assessment of L-arginine asymmetric 1 dimethyl (ADMA) in early-onset and late-onset (severe) preeclampsia, *Nitric Oxide*, 33, 81-82.
- American College of Obstetricians and Gynecologists; Task Force on Hypertension in Pregnancy, 2013, Hypertension in Pregnancy, Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy, *Obstetrics and Gynecology*, 122 (5), 1122-1131.
- Anderson, U. D., Jalmby, M., Faas, M. M., Hansson, S. R., 2018, The hemoglobin degradation pathway in patients with preeclampsia-fetal hemoglobin, heme, heme oxygenase-1 and hemopexin-potential diagnostic biomarkers?, *Pregnancy Hypertension*, 14, 273-278.
- Arinola, G., Arowojolu, A., Bamgboye, A., Akinwale, A., Adeniyi, A., 2006, Serum concentrations of immunoglobulins and acute phase proteins in Nigerian women with preeclampsia, *Reproductive Biology*, 6 (3), 265-274.
- Atkinson, K. R., Blumenstein, M., Black, M. A., Wu, S. H., Kasabov, N., Taylor, R. S., Cooper, G. J. S., North, R. A., 2009, An altered pattern of circulating apolipoprotein E3 isoforms is implicated in preeclampsia, *Journal of Lipid Research*, 50, 71-80.
- Auer, J., Camoin, L., Guillonnet, F., Rigourd, V., Chelbi, S., T., Leduc, M., Laparre, J., Mignot, T. M., Vaiman, D., 2010, Serum profile in preeclampsia and intra-uterine growth restriction revealed by iTRAQ technology, *Journal of Proteomics*, 73, 1004-1017.
- Aydın, S., Benian, A., Madazlı, R., Uludağ, S., Uzun, H., Kaya, S., 2004, Plasma malondialdehyde, superoxide dismutase, sE-selectin, fibronectin, endothelin-1 and nitric oxide levels in women with preeclampsia, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 113, 21-25.
- Bakker, W. W., Donker, R. B., Timmer, A., Van Pampus, M. G., Van Son, W. J., Aarnoudse, J. G., Van Goor, H., Niezen-Koning, K. E., Navis, G., Borghuis, T., Jongman, R. M., Faas M. M., 2007, Plasma Hemopexin Activity in Pregnancy and Preeclampsia, *Hypertension in Pregnancy*, 26 (2), 227-239.

- Birdir, C., Droste, L., Fox, L., Frank, M., Fryze, J., Enekwe, A., Königer, A., Kimmig, R., Schmidt, R., Gellhaus, A., 2018, Predictive value of sFlt-1, PlGF ratio and PAPP-A for late-onset preeclampsia and IUGR between 32 and 37 weeks of pregnancy, *Pregnancy Hypertension*, 12, 124-128.
- Björhall, K. Miliotis, T., Davidsson, P., 2005, Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples, *Proteomic*, 5, 307-317.
- Blankley, R.T. Fisher, C., Westwood, M., North, R., Baker, P. N., Walker, M. J., Williamson, A., Whetton, A. D., Lin, W., McCowan, L., Roberts, C. T., Cooper, G. J.S, Unwin, R. D., Myers, J. E., 2013, A label-free selected reaction monitoring workflow identifies a subset of pregnancy specific glycoproteins as potential predictive markers of early-onset pre-eclampsia, *Molecular & Cellular Proteomics*, 12, 3148-3159.
- Blumenstein, M., McMaster, M. T., Black, M. A., Wu, S., Prakash, R., Cooney, J., McCowan, L. M. E., Cooper, G. J. S., North, R. A., 2009, A proteomic approach identifies early pregnancy biomarkers for preeclampsia: novel linkages between a predisposition to preeclampsia and cardiovascular disease, *Proteomics*, 9, 2929-2945.
- Boretta, F. S., Buehler, P. W., D'Agnillo, F., Kluge, K., Glaus, T., Butt, O. I., Jia, Y., Goede, J., Pereira, C. P., Maggiorini, M., Schoedon, G., Alayash, A. I., Schaer, D. J., 2009, Sequestration of extracellular hemoglobin within a haptoglobin complex decreases its hypertensive and oxidative effects in dogs and guinea pigs, *J Clin Invest*, 119, 2271–2280.
- Bradford M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72 (1–2), 248-254.
- Brennan, L. J., Morton, J. S., Davidge, S. T., 2014, Vascular dysfunction in preeclampsia, *Microcirculation*, 21, 4-14.
- Brunelle, J. L., Green, R., 2014, Chapter Thirteen-Coomassie Blue Staining, *Methods in enzymology*, 541, 161-167.
- Buhimschi, I. A., Zhao, G., Funai, E. F., Harris, N., Sasson, I. E., Bernstein, I. M., Saade, G. R., Buhimschi, C. S., 2008, Proteomic profiling of urine identifies specific fragments of serpin1 and albumin as biomarkers of preeclampsia, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 551e1-551e16.
- Catarino, C., Santos-Silva, A., Luís, B., Rocha-Pereira, P., Rocha, S., Patrício, B., Quintanilha, A., Rebelo, I., 2012, Inflammatory disturbances in preeclampsia: relationship between maternal and umbilical cord blood, *Journal of Pregnancy*, Volume 2012, Makale ID 684384, 10 sayfa.
- Chaiworapongsa, T., Romero, R., Espinoza, J., Bujold, E., Kim, Y. M., Gonçalves, L. F., Gomez, R., Edwin, S., 2004, Evidence supporting a role for blockade of the vascular endothelial growth factor system in the pathophysiology of preeclampsia, Young Investigator Award, *Am J Obstet Gynecol.*, 190, 1541–1550.

- Chavarria, M. E., Lara-González, L., González-Gleason, A., García-Paleta, Y., Vital-Reyes, V. S., Reyes, A., 2003, Prostacyclin/thromboxane early changes in pregnancies that are complicated by preeclampsia, *Am J Obstet Gynecol*, 188, 986-92.
- Cid, M. C., Grant, D. S., Hoffman, G. S., Auerbach, R., Fauci, A. S. Kleinman, H. K., 1993, Identification of haptoglobin as an angiogenic factor in sera from patients with systemic vasculitis, *J. Clin. Investig*, 91 (3), 977–985.
- Conrad, K.P., Davison, J.M., 2014, The renal circulation in normal pregnancy and preeclampsia: is there a place for relaxin?, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 306 (10), F1121–F1135.
- Cornelius D. C., 2018, Preeclampsia: from inflammation to immunoregulation, *Clinical Medicine Insights: Blood Disorders*, 11, 1–6.
- Cui, L., Shu, C., Liu, Z., Tong, W., Cui, M., Wei, C., Tang, J. J., Liu, X., Hu, J., Jiang, J., J., He, J., Zhang D. Y., Ye F., Li, Y., 2018, The expression of serum sEGFR, sFlt-1, sEndoglin and plgf in preeclampsia, *Pregnancy Hypertension*, 13, 127-132.
- Cunningham, F. G., Leveno, K. J., Bloom, S. L., Spong, C. Y., Dashe, J. S., Hoffman, B. L., Casey, B. M., 2018, Implantation and placental development, In Williams Obstetrics 25th Edition, 5. Bölüm, *McGraw Hill Medical Books*, New York, ISBN: 9781259644320, 1-7.
- Dai, D. M., Cao, J., Yang, H. M., Sun, H. M., Su, Y., Chen, Y. Y., Fang, X., Xu W. B., 2017, Hematocrit and plasma albumin levels difference may be a potential biomarker to discriminate preeclampsia and eclampsia in patients with hypertensive disorders of pregnancy, *Clinica Chimica Acta*, 464, 218–222.
- Dai, X., Song X., Rui, C., Meng, L., Xue, X., Ding, H., Shen, R., Li, J., Li, J., Lu, Y., Long, W., 2017, Peptidome analysis of human serum from normal and preeclamptic pregnancies, *Journal of Cellular Biochemistry*, 118, 4341-4348.
- Dechend, R., Luft, F. C., 2008, Angiogenesis factors and preeclampsia, *Nature Medicine*, 14 (11), 1187-1188.
- Demir, R., Seval, Y., Huppertz, B., 2007, Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta, *Acta Histochem.*, 109 (4), 257–265.
- Desjardins, P., Hansen, J. B., Allen, M., 2009, Microvolume spectrophotometric and fluorometric determination of protein concentration, *Current Protocols in Protein Science*, 55 (1), e 3.10.1-3.10.16.
- Doğan, E., Demir, S. C., Kucukgoz Gulec, U., 2014, Maternal soluble vascular cytoplasmic adhesion molecule-1 and fibronectin levels in early- and late-onset preeclamptic pregnancies, *Clin Exp Obstet Gynecol*, 41 (6), 681-684.
- Duley L., 2009, The global impact of pre-eclampsia and eclampsia, *Seminars in Perinatology*, 33 (3), 130-137.

- Engin-Üstün, Y., Üstün, M., Kamacı, M., Şekeroğlu, R., 2005, Maternal serum ceruloplasmin in preeclampsia, *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 89, 51-52.
- Espana, F., Gilabert, J., Aznar, J., Estellés, A., Kobayashi, T., Griffin, J. H., 1991, Complexes of activated protein C with α -I-antitrypsin in normal pregnancy and in severe preeclampsia, *Am J Obstet Gynecol*, 164 (5-1), 1310-1316.
- Fattah, M. M., Ibrahim, F. K., Ramadan, M. A., Sammour, M. B., 1976, Ceruloplasmin and copper level in maternal and cord blood and in the placenta in normal pregnancy and in pre-eclampsia, *Acta Obstet Gynecol Scand*, 55, 383-385.
- Feletou M., 2011, Integrated systems physiology: from molecule to function to disease. In *The Endothelium. Part 2: EDHF-mediated Responses*, “The Classical Pathway”, *Morgan & Claypool Life Sciences*.
- Feng, Y., Wang, N., Xu, j., Zou, j., Liang, X., Liu, H., ChenY., 2017, Alpha-1-antitrypsin functions as a protective factor in preeclampsia through activating Smad2 and inhibitor of DNA binding, *Oncotarget*, 22, 8 (68), 113002–113012.
- Fraser, A., Nelson, S. M., Macdonald-Wallis, C., Cherry, L., Butler, E., Sattar, N., Lawlor, D. A., 2012, Associations of pregnancy complications with calculated cardiovascular disease risk and cardiovascular risk factors in middle age: the avon longitudinal study of parents and children, *Circulation*, 125, 1367–1380.
- Gabay, C., Kushner I., 1999, Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation, *The New England Journal of Medicine*, 340 (6), 448-454.
- Gezginç, K., Yazıcı, F., Sayal, H. B., 2013, Gebeliğin Hipertansif Hastalıkları: Derleme, *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 11 (Ek 2/Kadın Hastalıkları ve Doğum), 1-9.
- Ghmati, S.M., Van Hoeyveld, E. M., Van Strijp, J. G., Ceuppens, J. L., Stevens E. A., 1996, Identification of haptoglobin as an alternative ligand for CD11B/CD18, *J. Immunol.*, 156, 2542-2552.
- Goulopoulou, S., Davidge, S. T., 2014, Molecular mechanisms of maternal vascular dysfunction in preeclampsia, *Trends in Molecular Medicine*, 21 (2), 88-97.
- Gram, M., Anderson, U. D., Johansson, M. E., Edström-Hägerwall, A., Larsson, I., Jälmby, M., Hansson, S. R., Åkerström, B., 2015, The human endogenous protection system against cell-free hemoglobin and heme is overwhelmed in preeclampsia and provides potential biomarkers and clinical indicators, *PLoS ONE*, 10 (9), e0138111, 1-21.
- Graw, J. A., Yu, B., Rezoagli, E., Warren, H. S., Buys, E. S., Bloch, D. B., Zapol, W. M., 2017, Endothelial dysfunction inhibits the ability of haptoglobin to prevent hemoglobin-induced hypertension, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 312, 1120–1127.
- Griffin, J. F., 1983, Pregnancy-associated plasma protein levels at term in normal pregnancy, preeclampsia and essential hypertension, *Aust. A Nd N.Z. Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 23 (11), 11-14.

- Gruys, E., Toussaint, M. J. M., Niewold, T. A., Koopmans, S. J., 2005, Acute phase reaction and acute phase proteins, *J Zhejiang Univ SCI*, 6B (11), 1045-1056.
- Guller, S., Buhimschi, C. S., Ma, Y. Y., Huang, S. T. J., Yang, L., Kuczynski, E., Zambrano, E., Lockwood, C. J., Buhimschi, I. A., 2008, Placental expression of ceruloplasmin in pregnancies complicated by severe preeclampsia, *Lab Invest.*, 88 (10), 1057-1067.
- Günel, T., Göksever Çelik, H., Diz Küçükkaya, R., Alkaç, İ. M., Aydınli, K., 2020, İnsan hastalıklarında endotel fonksiyon ve disfonksiyonunun moleküler mekanizmaları, *İKSSTD*;12 (3), 201-216.
- Helmo, F. R., Lopes, A. M. M., Carneiro, A.C. D. M., Campos, C. G., Silva, P. B., Monteiro, M. L. G. D. R., Rocha, L. P., Reis, M. A. D., Etchebehere, R. M., Machado, J. R., Corrêa, R. R. M., 2017, Angiogenic and antiangiogenic factors in preeclampsia, *Pathology Research and Practice*, 214, 7–14.
- Hernandez-Nunez, J., Valdes-Yong, M., 2015, Utility of proteomics in obstetric disorders: a review, *International Journal of Women's Health*, 7, 385-391.
- Herraiz, I., Simón, E., Gómez-Arriaga, P. I., Martínez-Moratalla, J. M., García-Burguillo, A., Jiménez, E. A. L., Galindo, A., 2015, Angiogenesis-related biomarkers (sFlt-1/PLGF) in the prediction and diagnosis of placental dysfunction: an approach for clinical integration, *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 19009-19026.
- Hod, T., Cerdeira, A. S., Karumanchi, S. A., 2015, Molecular mechanisms of preeclampsia, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 5:a023473.
- Jain, S., Gautam V., Naseem, S., 2011, Acute-phase proteins: as diagnostic tool, *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 3 (1), 118-127.
- Jin, L.T., Hwang, S. Y., Yoo, G. S., Choi J. K., 2006, A mass spectrometry compatible silver staining method for protein incorporating a new silver sensitizer in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide electrophoresis gels, *Proteomics*, 6 (8), 2334-2337.
- Johal, T., Lees, C. C., Everett, T. R., Wilkinson, I. B., 2013, The nitric oxide pathway and possible therapeutic options in pre-eclampsia, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 78 (2), 244-257.
- Jung, Y. J., Cho, H. Y., Cho, S., Kim, Y. H., Jeon, J. D., Kim, Y. J., Lee S., Park, J., Kim, H. Y., Park, Y. W., Kwon, J. Y., 2017, The level of serum and urinary nephrin in normal pregnancy and pregnancy with subsequent preeclampsia, *Yonsei Med J*, 58 (2), 401-406.
- Karumanchi, S. A., Cerderia, A. S., 2012, Angiogenic factors in preeclampsia and related disorders, *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2:a006585.
- Karumanchi, S. A., Epstein, F. H., 2007, Placental ischemia and soluble fms-like tyrosine kinase 1: cause or consequence of preeclampsia?, *Kidney International*, 71, 959–961.

- Kim, S. M., Cho, B. K., Kang, M. J., Norwitz, E. R., Lee, S. M., Lee, J., Park, C. W., Kim, B. J., Jun, J. K., Park, J. S., Yi, E. C., 2016, Expression changes of proteins associated with the development of preeclampsia in maternal plasma: a case-control study, *Proteomics*, 16, 1581-1589.
- Kim, S. Y., Ryu, H. M., Yang, J. H., Kim, M. Y., Han, J. Y., Kim, J. O., Chung, J. H., Park, S. Y., Lee, M. H., Kim, D. J., 2007, Increased sFlt-1 to PlGF ratio in women who subsequently develop preeclampsia, *J Korean Med Sci*, 22, 873-877.
- Kolialexi, A., Tsangaris, G. T., Sifakis, S., Gourgiotis, D., Katsafadou, A., Lykoudi, A., Marmarinos, A., Mavreli, D., Pergialiotis, V., Fexi, D., Mavrou, A., Papaioanou, G. K., Papantoniou, N., 2017, Plasma biomarkers for the identification of women at risk for early onset preeclampsia, *Expert Review of Proteomics*, 14 (3), 269-276.
- Kolla, V., Jenö, P., Moes, S., Lapaire, O., Hoesli, I., Hahn, S., 2012, Quantitative proteomic (itraq) analysis of 1st trimester maternal plasma samples in pregnancies at risk for preeclampsia, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Volume 2012, ID:305964, 1-8.
- Lagana, A. S., Favilli, A., Triolo, O., Granese, R., Gerli, S., 2016, Early serum markers of pre-eclampsia: are we stepping forward?, *J Matern Fetal Neonatal Med*, 29 (18), 3019-3023.
- Law, K. P., Han, T. L., Tong, C., Baker, P. N., 2015, Mass spectrometry-based proteomics for pre-eclampsia and preterm birth, *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 10952-10985.
- Leeman, L., Fontaine, P., 2008, Hypertensive disorders of pregnancy, *American Family Physician*, 78 (1), 93-100.
- Levine, R. J., Maynard, S. H., Qian, C., Lim, K. H., England, L. J., Yu, K. F., Schisterman, E. F., Thadhani, R., Sachs, B. P., Epstein, F. H., Sibai, B. M., Sukhatme, V. P., Karumanchi, S. A., 2004, Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia, *The New England Journal of Medicine*, 350 (7), 672-683.
- Liu, C., Zhang, N., Yu, H., Chen, Y., Liang, Y., Deng, H., Zhang, Z., 2011, Proteomic analysis of human serum for finding pathogenic factors and potential biomarkers in preeclampsia, *Placenta*, 32, 168-174.
- Liu, J., Liu, X., Zhao, S., Zheng, Y., Chen, L., Wang, J., Zhan, S., Hu, S., Dong, Y., Tang, G., Lu, Y., Zhai, Y., Cao, Z., 2020, A pilot proteomic study with a prospective cohort suspected to develop preeclampsia, *Hypertension Research*, 43, 1319-1321.
- March, M. I., March, M. I., Geahchan, C., Wenger, J., Raghuraman, N., Berg, A., Haddow, H., Mckeeon, B. A., Narcisse, R., David, J. L., Scott, J., Thadhani, R., Karumanchi, S. A., Rana, S., 2015, Circulating angiogenic factors and the risk of adverse outcomes among haitian women with preeclampsia, *Plos One*, DOI: 10.1371/journal.pone.0126815.

- Mary, S., Kulkarni, M. J., Malakar, D., Joshi, S. R., Mehendale, S. S., Giri, A. P., 2017, Placental proteomics provides insights into pathophysiology of pre-eclampsia and predicts possible markers in plasma, *Journal of Proteome Research*, 3, 16 (2), 1050-1060.
- Maynard, S. E., Min, J. Y., Merchan, J., Lim, K. H., Li, J., Mondal, S., Libermann, T. A., Morgan, J. P., Sellke, F. W., Stillman, I. E., Epstein, F. E., Sukhatme, V. P., Karumanchi S. A., 2003, Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia, *The Journal of Clinical Investigation*, 111 (5), 649-658.
- Maynard, S. E., Karumanchi, S. A., 2011, Angiogenic factors and preeclampsia, *Semin Nephrol.*, 31 (1), 33-46.
- Mei, Z., Zhou, S., Huang B., Mo, Y., Hou H., 2017, Proteomic identification of candidate plasma biomarkers for preeclampsia in women with pregnancy-induced hypertension, *Int J Clin Exp Pathol.*, 10 (10), 10383–10391.
- Melhem, H., Kallol, S., Huang, X., Lüthi, M., Ontsouka, C. E., Keogh, A., Stroka, D., Thormann, W., Schneider, H., Albrecht, C., 2019, Placental secretion of apolipoprotein A1 and E: the anti-atherogenic impact of the placenta, *Sci Rep*, 9, 6225.
- Michalczyk, M., Celewicz, A., Celewicz, M., Woźniakowska-Gondek, P., Rzepka, R., 2020, The role of inflammation in the pathogenesis of preeclampsia, *Mediators of Inflammation*, Article ID 3864941, 1-9.
- Moore Simas, T.A., Crawford, S. L., Solitto M. J., Frost, S. C., Meyer B. A., Maynard S. E., 2007, Angiogenic factors for the prediction of preeclampsia in high-risk women, *Am J Obstet Gynecol*, 197:244.e1–8.
- Mosesson, M. W., 2005, Fibrinogen and fibrin structure and functions, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3, 1894–190
- Myers, J. E., Tuytten, R., Thomas, G., Laroy, W., Kas, K., Vanpoucke, G., Roberts, C. T., Kenny, L. C., Simpson, N. A. B., Baker, P.N., North, R. A., 2013, Integrated proteomics pipeline yields novel biomarkers for predicting preeclampsia, *Hypertension*, 61, 1281-1288.
- Nadkarni, N. A., Rajakumar, A., Mokhashi, N., Burke, S. D., Rana, S., Salahuddin S., Dang, Q., Thadhani, R., Krishnan, R., Stossel, T. P., Karumanchi, S. A., 2016, Gelsolin is an endogenous inhibitor of syncytiotrophoblast extracellular vesicle shedding in pregnancy, *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*, 6, 333-339.
- Navajas, R., Corrales F., Paradela A., 2021, Quantitative proteomics-based analyses performed on pre-eclampsia samples in the 2004–2020 period: a systematic review, *Clinical Proteomics*, 18 (6).

- Nguyen, T. P. H., Patrick C. J., Parry, L. J., Familiari M., 2019, Using proteomics to advance the search for potential biomarkers for preeclampsia: A systematic review and meta-analysis, *Plos One*, 14 (4), 1-23.
- Nicolic, A., Cabarkapa, V., Mikic, A. N., Jakovljević, A., Stosic, Z., 2015, Ceruloplasmin and antioxidative enzymes in preeclampsia, *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 29 (18), 2987–2993.
- Ohkuchi, A., Hirashima, C., Suzuki, H., Takahashi, K., Yoshida, M., Matsubara, S., Suzuki, M., 2010, Evaluation of a new and automated electrochemiluminescence immunoassay for plasma sflt-1 and plgf levels in women with preeclampsia, *Hypertension Research*, 33, 422-427.
- Ostlund, E., Hansson, L. O., Bremme K., 2001, Fibronectin is a marker for organ involvement and may reflect the severity of preeclampsia, *Hypertension in Pregnancy*, 20 (1), 79-87.
- Pant, V., Yadav B. K., Sharma, J., 2019, A cross sectional study to assess the sFlt1:PlGF ratio in pregnant women with and without preeclampsia, *BMC Pregnancy and Childbirth*, 19, 266.
- Paternoster, D. M., Stella, A., Simioni, P., Girolami, A., Plebani M., 1996, Fibronectin and antithrombin as markers of pre-eclampsia in pregnancy, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 70, 33-39.
- Pecks, U., Seidenspinner, F., Röwer, C., Reimer, T., Rath, W., Glocke, M. O., 2010, Multifactorial analysis of affinity-mass spectrometry data from serum protein samples: a strategy to distinguish patients with preeclampsia from matching control individuals, *J Am Soc Mass Spectrom*, 21, 1699 –1711.
- Pinherio da Costa B. E., Scocco, C., Poli de Figueiredo, C. E., Guimarães, J. A., 2006, Increased serum phosphodiesterase activity in women with pre-eclampsia, *BJOG*, 113, 577-579.
- Polsani, S., Phipps, E., Jim, B., 2013, Emerging new biomarkers of preeclampsia, *Adv Chronic Kidney Dis*, 20, 271–279.
- Powers, R. W., Catov, J. M., Bodnar, L. M., Gallaher, M. J., Lain, K. Y., Roberts, J. M., 2008, Evidence of endothelial dysfunction in preeclampsia and risk of adverse pregnancy outcome, *Reproductive Sciences*, Vol. 15, No. 4, 374-381.
- Ramos, J. G. L., Sass N., Costa S. H. M., 2017, Preeclampsia, *Rev Bras Ginecol Obstet*, 39 (9), 496-512.
- Ramsay, J. E., Stewart, F., Greer, I. A., Sattar, N., 2003, Microvascular dysfunction: a link between pre-eclampsia and maternal coronary heart disease, *BJOG* 110, 1029–1031.
- Rana, S., Powe, C. E., Salahuddin, S., Verlohren, S., Perschel, F. H., Levine, R. J., Lim, K. H., Wenger, J. B., Thadhani, R., Karumanchi S. A., 2012, Angiogenic factors and the risk of adverse outcomes in women with suspected preeclampsia, *Circulation*, 125 (7), 911-919.

- Rasanen, J., Girsén, A., Lu, X., Lapidus, J. A., Standley, M., Reddy, A., Dasari, S., Thomas, A., Jacob, T., Pouta, A., Surcel, H. M., Tolosa, J. E., Gravett, M. G., Nagalla S. R., 2010, Comprehensive maternal serum proteomic profiles of preclinical and clinical preeclampsia, *Journal of Proteome Research*, 9, 4274–4281.
- Redman, C. W. G., Sargent, I. L., 2003, Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response-a review, *Placenta*, 24 (17), 21-27.
- Saito, S., Shiozakia, A., Nakashimaa A., Sakaic M., Sasakic Y., 2007, The role of the immune system in preeclampsia, *Molecular Aspects of Medicine*, 28 (2), 192-209.
- Sammour, R. M., Nakhoul, F. M., Levy, A. P., Miller-Lotan, R., Nakhoul, N., Awad, H. R., Gonen, R., Ohel, G., 2010, Haptoglobin phenotype in women with preeclampsia, *Endocr*, 38, 303–308.
- Sankaralingam, S., Xu, H., Davidge, S. T., 2010, Arginase contributes to endothelial cell oxidative stress in response to plasma from women with preeclampsia, *Cardiovascular Research* 85, 194–203.
- Sankaralingam, S., Xu, Y., Sawamura, T., Davidge S. T., 2009, Increased lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 expression in the maternal vasculature of women with preeclampsia: role for peroxynitrite, *Hypertension*, 53, 270–277.
- Schaer, C. A., Deuel, J. W., Bittermann, A. G., Rubio, I. G., Schoedon, G., Spahn, D.R., Wepf, R. A., Vallelia F., Schaer, D. J., 2013, Mechanisms of haptoglobin protection against hemoglobin peroxidation triggered endothelial damage, *Cell Death and Differentiation*, 20, 1569–1579.
- Schaer, D. J., Buehler, P. W., 2013, Cell-free hemoglobin and its scavenger proteins: new disease models leading the way to targeted therapies, *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3:a013433, 1-18.
- Schjetlein, R., Haugen, G., Wisløff, F., 1997, Markers of intravascular coagulation and fibrinolysis in preeclampsia: association with intrauterine growth retardation, *Acta Obstet Gynecol Scand*, 76, 541-546.
- Schjetlein, R., Abdelnoor, M., Haugen, G., Husby, H., Sandset, P. M., Wisløff F., 1999, Hemostatic variables as independent predictors for fetal growth retardation in preeclampsia, *Acta Obstet Gynecol Scand*, 78, 191–197.
- Schoofs, K., Grittner, U., Engels, T., Pape, J., Denk, B., Henrich, W., Verlohren, S., 2014, The importance of repeated measurements of the sflt-1/plgf ratio for the prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction, *J Perinat Med*, 42 (1), 61-68.
- Shaarawy M. Aref, A., Salem, M. E., Sheiba, M., 1998, Radical-scavenging antioxidants in pre-eclampsia and eclampsia, *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 60, 123-128.
- Smith, A., McCulloh R. J., 2015, Hemopexin and haptoglobin: allies against heme toxicity from hemoglobin not contenders, *Front Physiol*, 6, 187.

- Sogani, S., Varma, V., Sarkar, P. D., 2014, Significance of urine albumin/ creatinine ratio (UACR) and uric acid in women with preeclampsia and its comparison with healthy normotensive pregnant women in their third trimester, *Acta Medica Lituanica*, 21 (1), 9-15.
- Steegers E. A. P., Von Dadelszen, P., Duvekot, J. J., Pijnenborg, R., 2010, Pre-eclampsia, *Lancet*, 376, 631-644.
- Stepan, H., Herraiz, I., Schlembach, D., Verlohren, S., Brennecke, S., Chantraine, F., Klein, E., Lapaire, O., Llurba, E., Ramoni, A., Vatish, M., Wertaschnigg, D., Galindo, A., 2015, Implementation of the sFlt-1/PIGF ratio for prediction and diagnosis of pre-eclampsia in singleton pregnancy: implications for clinical practise, *Ultrasound Obstet Gynecol*, 45, 241-246.
- Tardif, C., Dumontet, E., Caillon, H., Misbert, E., Dochez, V., Masson D., Winer N., 2018, Angiogenic factors sFlt-1 and PIGF in preeclampsia: prediction of risk and prognosis in a high-risk obstetric population, *J Gynecol Obstet Hum Reprod*, 47 (1), 17-21.
- Üstün Y., Engin Üstün, Y., Kamacı M., 2005, Association of fibrinogen and C-reactive protein with severity of preeclampsia, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 121, 154–158.
- Van Lenten, B. J., Navab, M., Anantharamaiah, G.M., Buga, G. M., Reddy, S. T., Fogelman A. M., 2008, Multiple indications for anti-inflammatory peptides, *Curr Opin Investig Drugs*, 9 (11), 1157–1162.
- Vidaeff A. C., Saade, G. R., Sibai, B. M., 2020, Preeclampsia: the need for a biological definition and diagnosis, *Am J Perinatol*, <https://doi.org/10.1055/s-0039-1701023>.
- Vitoratos N., Salamalekis, E., Dalamaga, N., Kassanos, D., Creatsas, G., 1999, Defective antioxidant mechanisms via changes in serum ceruloplasmin and total iron binding capacity of serum in women with pre-eclampsia, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 84, 63-67.
- Wang, Y., Zhao, S., 2010, Vascular biology of the placenta, *Morgan and Claypool Life Sciences*, Chapter 6: Vasculogenesis and angiogenesis of human placenta.
- Wang, Y., Zhao, S., 2010, Vascular biology of the placenta, *Morgan and Claypool Life Sciences*, Chapter 7: Angiogenic Factors.
- Widmer, M., Villar, J., Benigni, A., Conde-Agudelo, A., Karumanchi, S. A., Lindheimer, M., 2007, Mapping the theories of preeclampsia and the role of angiogenic factors: a systematic review, *Obstet Gynecol*, 109, 168–80.
- Wu, P., Van den Berg, C., Alfirevic, Z., O'Brien, S, Röthlisberger, M., Baker, P. N., Kenny, L. C., Kublickiene, K., Duvekot, J. J., 2015, Early pregnancy biomarkers in pre-eclampsia: a systematic review and meta-analysis, *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 23035-23056.
- Yaylalı, Y. T., Küçükaslan, M., 2011, Endotel disfonksiyonu, *Pam Tıp Derg* , 4 (3), 152-157.

- Zeisler, H., Llurba, E., Chantraine, F., Vatish, M., Staff, A. C., Sennström, M., Olovsson M., Brennecke S. P., Stepan, H., Allegranza, D., Dilba P., Schoedl M., 2016, Predictive value of the sflt-1:plgf ratio in women with suspected preeclampsia, *The New England Journal of Medicine*, 374 (1), 13-22.
- Zhu, H., Li, Z., Mao, S., Ma, B., Zhou, S., Deng, L., Liu, T., Cui, D., Zhao, Y., He, J., Yi, C., Huang, Y., 2011, Antitumor effect of sFlt-1 gene therapy system mediated by *Bifidobacterium infantis* on lewis lung cancer in mice, *Cancer Gene Therapy*, 18, 884–896.



EKLER

5.1.1 EK-1: Etik Kurul Karar Belgesi



* B E K 4 K 8 M Z P *



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



Sayı :83045809-604.01.02-
Konu :Dokt.Öğr. Vildan Yaman'nın etik kurul kararı

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi :05.05.2016 tarih, 52825153-604.01.01-164199 sayılı yazınıza

Anabilim Dalınız öğretim üyesi **Prof.Dr.Ali BENİAN**'ın ve İ.Ü.Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi **Prof.Dr.Emine Şeküre Nazlı ARDA**'nın danışmanlıklarında **Doktora Öğrencisi Vildan YAMAN**'ın yürütücülüğünde **Doç.Dr.Tuğba GÜNEL**'in yardımcılığında "**Preeklampside Anjiyonenez Faktörleri ile Plazma Proteomu Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi**" başlıklı Doktora Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri **07 Haziran 2016** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Başkan

e-İmzalı
Prof. Dr. Haluk EMİR
Bölüm Başkanı

EK :
1 dosya elden teslim edilecektir.

Doğrulamak için:http://194.27.128.66/envision.Sorgula/Validate_Doc.aspx?V=BEK4K8MZP

Ayrıntılı bilgi için irtibat : Güler SOYDANER Dahili : 22300
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL
Tel : 0 (212) 414 30 00 21107- 21108 Fax : 0 (212) 632 00 33
e-posta : ctfpersonel@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbul.edu.tr

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Vildan YAMAN
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fakülte	Fen Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	10.06.2008

Yüksek Lisans	
Üniversite	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Biyoloji Programı

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Makale ve Bildiriler	
Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler:	
Yaman V. ve diğ., 2019, Angiogenesis-related proteins sFlt-1 and PlGF in preeclampsia, <i>Turk J Biol.</i> , 43(5 Suppl): 1–132.	
Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:	
Yıldız V., Acar O., 2010, Eryngium maritimum L. Bitkisinde Tohum Dormansisi. 20. <i>Ulusal Biyoloji Kongresi</i> , (Yayın No:2915038).	

Acar O. ve diğ., 2010, *Lycopersicon esculentum* Mill Köklerinde *Orobancha ramosa* Penetrasyonu Boyunca Antioksidan Enzim Aktivitelerinin ve Lipit Peroksidasyonunun Değişimi, 20. *Ulusal Biyoloji Kongresi*, (Yayın No:2915017).

Acar O. ve diğ., 2010, *Orobancha ramosa* L Parazitinin *Lycopersicon esculentum* Mill Bitkisinin Büyüme ve Pigment İçeriği Üzerine Olan Etkileri, 20. *Ulusal Biyoloji Kongresi*, (Yayın No:2915034).

Acar O. ve diğ., 2010, *Lycopersicon esculentum* Mill Yapraklarında *Orobancha ramosa* L. Stresine Karşı Antioksidan Enzim Aktivitelerinin ve Lipit Peroksidasyonunun Değişimi, 20. *Ulusal Biyoloji Kongresi*, (Yayın No:2915024).

Aydın B. ve diğ., 2010, *Capsicum annuum* Bitkisinin Büyüme ve Pigment İçeriğine *Orobancha aegyptica* Pers Bitkisinin Etkisi, 20. *Ulusal Biyoloji Kongresi*, (Yayın No:2914986).