



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



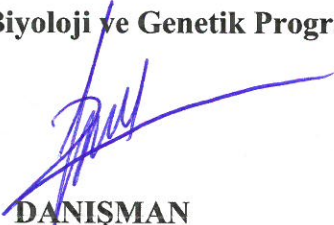
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PREEKLAMPSİNİN ERKEN TANISI İÇİN MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERDEN ELDE EDİLEN MİRNA'LARDAN
BİYOBELİRTEÇ SEÇİMİ**

Nilüfer KAMALI

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı


**DANIŞMAN
Doç. Dr. Tuba GÜNEL**

Temmuz, 2019

İSTANBUL

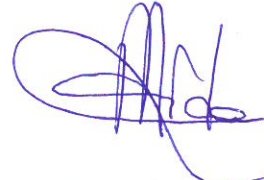
Bu çalışma, 17.07.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

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



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



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



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

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 28953 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Başta Yüksek Lisans sürecim boyunca desteğini, akademik tecrübelerini, sonsuz bilgisini ve sevgisini asla esirgemeyen, her zaman cesaretlendirici konuşup daha iyi şeyler başarabileceğime inandıran tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Tuba GÜNEL'e;

İstanbul Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Ercan ARICAN'a ve bölümümüzdeki tüm değerli öğretim üyesi hocalarıma;

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

Kök hücre çalışmalarında bize laboratuvarını açan Koç Üniversitesi öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Serçin KARAHÜSEYİNOĞLU'na;

Genetik Hastalıklar ve Moleküler Analiz Birimi Laboratuvarına adım attığım andan itibaren ev sıcaklığıyla disiplinli çalışmayı bir arada yaşamamı sağlayan başta Arş. Gör. Ece GÜMÜŞOĞLU ve Uzm. Mol. Bio. Tuğçe ŞENTÜRK olmak üzere, laboratuvar ekip arkadaşlarıma;

Hayatımın her aşamasında yanımda olacağını bildiğim, geçirdiğim tüm zorlu süreçlerde yanımda olup her koşulda destekleyen, mutlu olmam için elinden gelen her şeyi yapan, bana benden daha çok inanan, kendi seçtiğim ailem Cemre ŞİMŞEK'e;

Bana evini açıp kendi çocuğu gibi hissettiren halam Fatma AKTAŞ'a, her zaman kardeş olarak gördüğüm kuzenlerim Hülya AKTAŞ ve Rüya AKTAŞ'a;

Hayatım boyunca olduğu gibi bu tez sürecinde de her türlü destekçim olan ve her zaman arkamda olup bana sonsuz güvenen canım ailem; annem Gülseven KAMALI, babam Temel KAMALI ve canım kardeşim İlayda KAMALI'ya;

En içten dileklerimle sevgilerimi, saygılarımı ve bilgiye ulaşmamda bana rehber olan bütün yardımlar için de teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz 2019

Nilüfer KAMALI

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. İNSAN PLASENTASININ YAPI VE FONKSİYONU	4
2.2. PLASENTA GELİŞİMİ.....	5
2.3. KÖK HÜCRELER	7
2.3.1. Placenta Kökenli Kök Hücreler	8
2.3.2. Placenta Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler	10
2.3.3. Periferik Kan Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler	11
2.4. GEBELİKTE HİPERTANSİYON	12
2.5. PREEKLAMPSİ	12
2.5.1. Preeklampsinin Tanısı	13
2.5.2. Preeklampsinin Patogenezi.....	15
2.5.3. Preeklampsinin Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri.....	19
2.5.4. Preeklampside Kullanılan Biyobelirteçler.....	21
2.5.4.1. Anjiyogenik Belirteçler	21
2.5.4.2. Placental Protein 13	23
2.5.4.3. Gebeliğe Bağlı Plazma Proteini A.....	23
2.5.4.4. Böbrek Fonksiyon Bozukluğu ile İlişkili Testler	24
2.5.4.5. Serbest Fetal Nükleik Asitler	25
2.5.4.6. Doppler Velosimetrisi	27
2.5.5. Yeni Biyobelirteçler	27
2.5.5.1. Transkriptomik.....	28
2.5.5.2. Proteomik.....	29

2.5.5.3. Metabolomik	30
2.6. MİKORNA (MİRNA)	31
2.6.1. MikroRNA Biyogenezi	32
2.6.2. MikroRNA Fonksiyonu ve Regülasyonu	33
2.6.3. Preeklampsi’de mikroRNA’ların Rolü	34
2.6.4. MikroRNA Tespitinde Kullanılan Yöntemler	35
2.6.4.1. Northern Blotting	36
2.6.4.2. Mikrodizilim	37
2.6.4.3. Damlacıklı Dijital PZR	37
3. MALZEME VE YÖNTEM	40
3.1. ÇALIŞMA GRUPLARI	40
3.2. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KÜLTÜRÜ	41
3.2.1. Besiyeri Hazırlama	41
3.2.2. Desidüadan Mezenkimal Kök Hücre Kültürü	41
3.2.3. Periferel Kandan Mezenkimal Kök Hücre Kültürü	42
3.3. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE AYRIMI	42
3.4. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE DEN MİKORNA İZOLASYONU	43
3.5. RNA KALİTE KONTROL	45
3.6. MİKORNA’DAN CDNA SENTEZİ	45
3.7. DAMLACIKLI DİJİTAL POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (DDPZR)	47
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	49
4. BULGULAR	50
4.1. KULLANILAN ÖRNEKLERİN ÖZELLİKLERİ	50
4.2. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN PLASENTA VE KANDAN HÜCRE KÜLTÜRÜ İLE ELDESİ	50
4.2.1. Plasentadan Mezenkimal Kök Hücre Eldesi	50
4.2.2. Kandan Mezenkimal Kök Hücre Eldesi	51
4.3. HÜCRE KÜLTÜRÜNDEN MEZENKİMAL KÖK HÜCRE AYRIMI	52
4.3.1. Desidua Kökenli Mezenkimal Kök Hücre Ayrımı	52
4.3.2. Periferel Kan Kökenli Mezenkimal Kök Hücre Ayrımı	52
4.4. ÖRNEKLERİN KALİTE KONTROLÜ	53
4.5. MİKORNA ANLATIM ANALİZİ	54
4.5.1. Desidua Kökenli MKH’lerde miRNA Analizi	54
4.5.2. Periferel Kan Kökenli MKH’lerde miRNA Analizi	58
4.5.3. Biyoinformatik Tabanlı Hedef Gen ve Yolak Analizi	59

5. TARTIşMA VE SONUÇ	64
KAYNAKLAR.....	72
EKLER	103
EK1: ETİK KURUL BELGESİ.....	103
ÖZGEÇMİş	108



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Plasentanın yapısı ve membranları.	5
Şekil 2.2: Sinsisyotrofoblastın, maternal damarları aşındırması (de la Torre, Flores, 2018).	6
Şekil 2.3: Mezengenik süreç (Caplan, 2009).	8
Şekil 2.4: Gebe olmayan kadınlarda, PE hastası ve sağlıklı gebelerde vasküler düzenlenme (Parham, 2004).	17
Şekil 3.1: PE hastası ve sağlıklı gebelerden alınan desidua (A) ve kan (B) örnekleri.	40
Şekil 4.1: dMKH'lerin kültüre alındığı ilk gün (A) ve MKH ayrimından önce (B) alınan görüntüler.	51
Şekil 4.2: kMKH'lerin kültüre alındığı ilk gün (A) ve MKH ayrimından önce (B) alınan görüntüler.	52
Şekil 4.3: Hsa-miR-33b-3p'nin rölatif miRNA anlatım seviyesi ve ROC eğrisi analizi.	56
Şekil 4.4: Hsa-let-7b-3p'nin rölatif miRNA anlatım seviyesi ve ROC eğrisi analizi.	56
Şekil 4.5: Hsa-let-7f-1-3p'nin rölatif miRNA anlatım seviyesi ve ROC eğrisi analizi.	57
Şekil 4.6: Hsa-miR-425-3p'nin rölatif miRNA anlatım seviyesi ve ROC eğrisi analizi.	57
Şekil 4.7: Hsa-miR-550a-5p'nin rölatif miRNA anlatım seviyesi ve ROC eğrisi analizi.	58
Şekil 4.8: Hsa-miR-191-3p'nin rölatif miRNA anlatım seviyesi ve ROC eğrisi analizi.	58
Şekil 4.9: Hsa-miR-33b-3p'nin hedef gen analizi.	63
Şekil 5.1: miR-33b-3p'nin insan genomundaki lokalizasyonu.	68

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: cDNA sentezi için hazırlanan çalışma solüsyonu bileşenleri.....	46
Tablo 3.2: RT-PZR bileşenleri.	46
Tablo 3.3: RT-PZR termal döngüsü.	46
Tablo 3.4: ddPZR için hazırlanan bir reaksiyon için gerekli “mix” bileşenleri ve miktarları.	47
Tablo 3.5: ddPZR termal döngüsü.....	48
Tablo 4.1: Çalışmaya katılan gebelerin klinik özellikleri.....	50
Tablo 4.2: PE hastalarından (P) izole edilen total RNA’ların kalite kontrol ve miktar tayinleri.....	53
Tablo 4.3: Sağlıklı gebelerden (S) izole edilen total RNA’ların kalite kontrol ve miktar tayinleri.....	54
Tablo 4.4: dMKH’lerde ddPZR ile yapılan miRNA anlatım analizlerinin istatistiksel sonuçları..	55
Tablo 4.5: kMKH’lerde ddPZR ile yapılan miRNA anlatım analizleri. P: PE hastası, S: Sağlıklı.....	59
Tablo 4.6: Preeklampsi ve aday miR-33b-3p’nin ortak olarak bulundukları yollar.....	60
Tablo 4.7: Aday miRNA’ların ortak olarak bulunduğu yollar. “miRO 2.0” ile analiz edildi.	61

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	:Yüzde
cm	:Santimetre
dk (')	:Dakika
g	:Gram
<i>g</i>	:RCF “ <i>Relative Centrifugal Field</i> ”
kcal	:Kilokalori
mL	:Mililitre
mM	:Milimolar
ng	:Nanogram
rpm	:Dakikadaki devir sayısı
sn (")	:Saniye
Tm	:Erime sıcaklığı
µL	:Mikrolitre
µg	:Mikrogram
°C	:Santigrad derece

Kısaltmalar	Açıklama
ABC	: Adenozintrifosfat(ATP) Bağlayıcı Kaset
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ACE	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
ACOG	: Amerika Kadın Hastalıkları ve Doğum Koleji
AGO	: Argonat
ALK	: Aktivin Reseptörü Benzeri Kinaz
aMKH	: Amniyon Mezenkimal Kök Hücre
AP-1	: Aktivatör Protein-1
Arf6	: Adenozindifosfat(ADP)-Ribozilasyon Faktör-6
AT1-AA	: Anjiyotensin Reseptör Tip-1 Agonistik Otoantikor
AUC	: Eğri Altında Kalan Alan
BMAL1	: Beyin ve Kas Aril Hidrokarbon Reseptörü Çekirdek Antijeni-1

BMI	: Vücut Kitle İndeksi
CCND1	: Siklin D1
CCNE1	: Siklin E1
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik asit
CI	: Güven Aralığı
ddPZR	: Damlacıklı Dijital Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DGCR8	: DiGeorge Kritik Sendrom Bölgesi 8
dH₂O	: Distile su
DKB	: Diyastolik Kan Basıncı
dMKH	: Desidua Kökenli Mezenkimal Kök Hücre
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPBS	: Dulbeco'nun Fosfat Tamponlu Salın'ı
ECL	: Elektrokimyasal Işıma
EDTA	: Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EKH	: Embriyonik Kök Hücre
EXPAR	: Üstel İzotermal Amplifikasyon Reaksiyonu
FBS	: Fetal Sığır Serumunu
FGF	: Fibroblast Büyüme faktörü
FOX-A2	: Hepatosit Nükleer Faktör 3 Beta
GBH	: Gebeliğe Bağlı Hipertansiyon
GDO	: Genetiği Değiştirilmiş Organizma
gkMKH	: Göbek Kordonu Kökenli Mezenkimal Kök Hücre
GMCSF	: Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
HBSS	: Hank'ın Dengeli Tuz Çözeltilisi
HDAC	: Histon Deasetilaz
HELLP	: Hemoliz, Yüksek Karaciğer Enzimleri Ve Düşük Trombositler
HIF	: Hipoksi İndüklenebilir Faktör
HIF-2	: Hipoksi indüklenebilir faktör 2
HKH	: Hematopoetik Kök Hücre
HLA	: İnsan Lökosit Antijen
Has	: <i>Homo sapiens</i>
IDO	: İndoleamin 2,3 Dioksijenaz
IFN	: İnterferon

IL3	: İnterlökin
ISH	: <i>In Situ</i> Hibridizyon
ITGB1	: İntegrin Beta 1
IUGR	: Fetüste Büyüme Geriliği
KISS-1	: Kisspeptin-1
kMKH	: Koryon Mezenkimal Kök Hücre
kvMKH	: Koryonik Villus Mezenkimal Kök Hücre
LAP	: Gecikmeyle İlişkili Peptid
LBP	: Lipopolisakkarit Bağlayıcı Protein
LKB1	: Karaciğer Kinaz B1
LNA	: Kilitli Nükleik Asit
LPS	: Lipopolisakkarit
LZR	: Ligaz Zincir Reaksiyonu
MAPK	: Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz
MHC	: Ana Histouyumluluk Kompleksi
miR	: Mikro Ribonükleik Asit
miRNA	: Mikro Ribonükleik Asit
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
MS	: Kütle Spektrometrisi
mTOR	: Rapamisinin Memeli Hedefi
NCAM	: Nöral Hücre Adhezyon Molekülü
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NPAS2	: Nöral Pas Domain 2 Proteini
NTC	: Örnek İçermeyen Kontrol
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PAPP-A	: Gebeliğe Bağlı Plazma Proteini A
PAR	: Proteaz ile Aktive Olan Reseptör
PAR1	: Proteaz ile Aktive Olan Reseptör 1
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PDGF	: Trombosit(Platelet) Kaynaklı Büyüme Faktörü
PDGFR	: Trombosit(Platelet) Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü
PE	: Preeklampsi
PGE2	: Prostaglandin E2

PI3K	: Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PIGF	: Plasental Büyüme Faktörü
pMKH	: Plasenta Kökenli Mezenkimal Kök Hücre
PP-13	: Plasental Protein-13
PRA	: Plazma Renin Aktivitesi
Pri-miRNA	: Birincil Mikro Ribonükleik Asit
PS	: Penisilin-Streptomisin
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPZR	: Eş(Gerçek) Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RCA	: Yuvarlanan Daire Amplifikasyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
ROC	: “ <i>Reciever Operating Characteristic</i> ”
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RPMI	: “ <i>Roswell Park Memorial Institute</i> ” Besiyeri
RT-qPZR	: Gerçek Zamanlı Ters Transkripsiyon Kantitatif PZR
S1P	: Sfingosin-1 Fosfat
SIP1	: Sfingosin-1 Fosfat Reseptörü 1
SIP3	: Sfingosin-1 Fosfat Reseptörü 3
sEng	: Çözünür Endoglin
SERS	: Yüzey Arttırılmış Raman Spektrometresi
sFlt1(sVEGFR1)	: Çözünür Vasküler Endotel Büyüme Faktörü Reseptör-1
SKB	: Sistolik Kan Basıncı
SRY	: Cinsiyet Belirleme Bölgesi Y
TGFB	: Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
TGFB1	: Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta 1
TGFBR	: Transforme Edici Büyüme Faktörü Reseptörü
TRAIL	: Tümör Nekroz Faktör Ile İlişkili Apoptoz İndükleyici Ligand
tRNA	: Transfer Ribonükleik Asit
UADV	: Uterin Arter Doppler Velosimetresi
uPA	: Ürokinaz Tipi Plazminojen Aktivatörü
uPAR	: Ürokinaz Tipi Plazminojen Aktivatörü Reseptörü
VCAM-1	: Vasküler Hücre Adhezyon Molekülü-1
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
VEGFA	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü A

VEGFR : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
VLA-4 : En Yeni Antijen-4
XPO5 : Eksportin 5



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PREEKLAMPSİNİN ERKEN TANISI İÇİN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDEN ELDE EDİLEN MİRNA'LARDAN BİYOBELİRTEÇ SEÇİMİ

Nilüfer KAMALI

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Tuba GÜNEL

Preeklamps (PE), gebeliğe özgü hipertansif bir hastalıktır. Anormal plasantasyon preeklampsinin ayırt edici bir özelliğidir ve plasental oksidatif stresin artmasına neden olur. Oksidatif stres, desidual vasküler yapıda lokal hasara neden olan anti-anjiyogenik faktörlerin salınımını tetikler. Hasar daha sonra sistematik olarak yayılır ve maternal klinik semptomlarla sonuçlanır.

Maternal-fetal arayüzdeki mezenkimal kök hücrelerin (MKH) preeklamps patogenezinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Desidua bazalis mezenkimal kök hücreleri (dMKH) vasküler bir mikroçevrede bulunur. Preeklampside, dMKH'ler anormal derecede yüksek seviyelerde oksidatif strese ve maternal kanda dolaşan inflamatuvar faktörlere maruz kalırlar. Oksidatif strese maruz kalan dMKH'lerin preeklamps gelişiminde rol aldığı düşünülmektedir.

MikroRNA'lar (miRNA) kısa (19-25 nükleotit), tek zincirli ve kodlama yapmayan RNA'lardır. Gen ekspresyonunu, hedef mRNA'ların 3' kodlama yapmayan bölgelerine bağlanarak düzenlerler. Gelişim, farklılaşma, apoptoz ve onkogeneze gibi birçok biyolojik olayda önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Küçük kodlama yapmayan RNA'lar sınıfından olan miRNA'ların MKH'lerin farklılaşması, olgunlaşması ve işlevleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu araştırmalarla gösterilmiştir. MiRNA'lar üzerinde yapılan son araştırmalar, bu RNA'ların PE'de yeni moleküler belirteçler olarak kullanılabileceği fikrini beraberinde getirmiştir.

Mezenkimal kök hücreler (MKH) birçok hücre tipine farklılaşabilen multipotent öncü hücrelerdir ve maternal fetal arayüzde bol miktarda bulunurlar. Salgıladıkları maddeler yoluyla anjiyogenez ve nörogenezi teşvik etme yetenekleri vardır. Yapılan çalışmalarda, miRNA'ların PE hastası gebelerin plasentasından elde edilen MKH'lerde normal gebelere göre anlatımlarının farklılaştığı görülmüştür.

Bu tez, PE hastası ve sağlıklı gebelere ait desidua ve periferik kan kökenli MKH'lerin miRNA anlatım analizini kapsamakta ve olası biyobelirteçlerin araştırılması için bir ön çalışma niteliği taşımaktadır. Tez kapsamında, 7 PE hastası ve 7 sağlıklı olmak üzere toplam 14 gebenin hem desidua ve hem de periferik kan örnekleri ile çalışıldı. Toplam 28 örnek ile yapılan araştırmamızda MKH kültürü ile hücre sayısı artırıldı ve ardından saf MKH eldesi için spesifik hücre yüzey belirteçleri kullanılarak MKH ayrımı ("sorting") gerçekleştirildi. MKH'lerden total RNA izolasyonu sonrasında miRNA analizi için let-7b-3p, let-7f-1-3p, miR-191-3p, miR-550a-5p, miR-33b-3p ve miR-425-3p ve normalizasyon için U6 snRNA kullanıldı. MiRNA analizi damlacıklı dijital polimeraz zincir reaksiyonu (ddPZR) yöntemi ile gerçekleştirildi ve elde edilen sonuçlar "GraphPad Prism 8.1.2" programı kullanılarak değerlendirildi. Anlamlılık testleri parametrik olmayan "Mann Whitney Test", duyarlılık ve spesifite testleri ise "Receiver operating characteristic" (ROC) analizi ile yapıldı.

Yapılan analiz sonucunda, PE hastalarının dMKH'lerinde hsa-miR-33b-3p seviyesinde sağlıklı kontrollere göre anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi (AUC: 0,93, $p=0,04$, kat değişimi: 4,5). let-7b-3p, let-7f-1-3p, miR-191-3p, miR-550a-5p ve miR-425-3p $p<0,05$ şartını sağlamadıklarından anlamlı olarak değerlendirilmedi.

Temmuz 2019, 126 sayfa.

Anahtar kelimeler: Preeklampsi, Desidua Kökenli Mezenkimal Kök Hücre, Periferik Kan Kökenli Mezenkimal Kök Hücre, MikroRNA, Damlacıklı Dijital PZR

SUMMARY

M.Sc. THESIS

BIOMARKER SELECTION FROM MIRNAS OBTAINED FROM MESENCHYMAL STEM CELLS FOR THE EARLY DIAGNOSIS OF THE PREECLAMPSIA

Nilüfer KAMALI

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Tuba GÜNEL

Preeclampsia (PE) is a pregnancy-specific hypertensive disease. Abnormal placentation is a distinctive feature of preeclampsia and causes increased placental oxidative stress. Oxidative stress triggers the release of anti-angiogenic factors that cause local damage to the decidual vascular structure. Afterwards, the damage spreads systematically and results in maternal clinical symptoms.

Mesenchymal stem cells (MSC) at the maternal-fetal interface are thought to play an important role in the pathogenesis of preeclampsia. Decidua basalis mesenchymal stem cells (dMSC) are found in a vascular microenvironment. In preeclampsia, dMSCs are exposed to abnormally high levels of oxidative stress and inflammatory factors circulating in the maternal blood. dMSC exposed to oxidative stress is thought to play a role in the development of preeclampsia.

Micro RNAs (miRNAs) are short (19-25 nucleotides), single-stranded, non-coding RNAs. They regulate gene expression by binding to 3' non-coding regions of target mRNAs. They are known to play an important role in many biological processes such as development, differentiation, apoptosis and oncogenesis. MiRNAs from the class of small non-coding RNAs have been shown to have a significant impact on the differentiation, maturation and function of MSCs. Recent researches on miRNAs have asserted the idea that these RNAs can be used as new molecular markers in PE.

MSCs are multipotent precursor cells that can differentiate into many cell types and are abundant at the maternal fetal interface. They have the ability to promote angiogenesis and neurogenesis through the substances they secrete. Studies have shown that the expression of miRNAs in MSCs obtained from placenta of pregnant women with PE differs from that of normal pregnant women.

This thesis covers miRNA expression analysis of MSCs originated decidua and peripheral blood obtained from PE patient and healthy pregnant women and is a preliminary study to investigate putative biomarkers. In this thesis, both decidua and peripheral blood samples were studied from total 14 pregnant women, 7 PE patients and 7 healthy subjects. In our research with a total of 28 samples, the number of cells was increased by MSC culture and then MSCs were sorted using by specific cell surface markers to obtain pure MSCs. After isolation of total RNA from MSCs, let-7b-3p, let-7f-1-3p, miR-191-3p, miR-550a-5p, miR-33b-3p and miR-425-3p were used for miRNA analysis and U6 snRNA was used for normalization of the samples. MiRNA analysis was performed by droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) method and the obtained results were evaluated using “*GraphPad Prism 8.1.2*” program. Significance tests were performed using non-parametric “*Mann Whitney Test*”. Sensitivity and specificity tests were performed using “*Receiver Operating Characteristic*” (ROC) analysis.

As a result of the analysis, it was observed that the levels of hsa-miR-33b-3p significantly (AUC: 0.93, $p = 0.04$, fold change: 4.5) increased in dMSC of PE patients compared to healthy controls. However, let-7b-3p, let-7f-1-3p, miR-191-3p, miR-550a-5p, and miR-425-3p were not considered as significant because they did not meet the $p < 0.05$ requirement.

July 2019, 126 pages.

Keywords: Preeclampsia, Decidua Derived Mesenchymal Stem Cell, Peripheral Blood Derived Mesenchymal Stem Cell, MicroRNA, Droplet Digital PCR

1. GİRİŞ

Plasenta, fetüs için gerekli besini, gaz değişimini ve immünolojik toleransı destekleyerek fetal gelişimde önemli bir rol oynamaktadır. Hastalık plasental disfonksiyon ile ilk trimesterde başlar. Etiyopatogenezi hala tam olarak anlaşılamamış olsa da fetoplasental bölgedeki bozukluklar ve buna bağlı maternal-plasental patolojilerin etkili olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, plasenta gelişimi ve devamlılığı ile ilgili problemler preeklamps (PE) gibi gebeliğe bağlı bozukluklarla sonuçlanabilmektedir.

20. gebelik haftasından sonra gelişme gösteren hipertansiyon (kan basıncının $\geq 140/90$ mm-Hg ölçülmesi) ve proteinüri (24 saatlik idrarda protein atımının ≥ 300 mg olması) olarak tanımlanmasına rağmen ACOG (“*The American College of Obstetricians and Gynecologists*”) 2019 bülteninde, proteinüri olmaksızın preeklamps gelişebileceği bildirilmiştir (North ve diğ., 2011; ACOG, 2019). Dünya genelinde gebeliklerin yaklaşık %5’inde görülen preeklampsia (Sibai, Dekker ve Kupferminc, 2005) maternal-fetal hastalık ve ölümlere neden olmaktadır (Sibai, Dekker ve Kupferminc, 2005; North ve diğ., 2011). Hastalığın oluşum mekanizması hala tam olarak anlaşılamamış olsa da maternal-fetal arayüzdeki immün sistem dengesizliklerinin preeklamps patogenezinin nedenleri arasında olabileceği düşünülmektedir (Goldman-Wohl ve Yagel, 2007; Mütze ve diğ., 2008; Zhou ve diğ., 2008; Kanasaki ve Kalluri, 2009). Fetoplasental bölgedeki maternal immün bozukluklar, preeklamps gibi defektif trofoblast ve buna bağlı maternal-plasental patolojik anomalilerin gelişmesinin bir nedenidir (Erlebacher, 2013; Rolfo ve diğ., 2013). Yapılan diğer çalışmalar da, preeklampsili hastalarda anjiyogenezde bozulmalar ve anti-anjiyogenik faktörlerin plasental dolaşım bozukluklarıyla sonuçlanmasına neden olduğu bildirilmiştir (Venkatesha ve diğ., 2006; Verlohren, Stepan ve Dechend, 2012). Bu durum da plasental damar oluşumundaki anormalliklerin preeklamps patogenezinin muhtemel nedenlerinden biri olabileceğini göstermektedir.

Mezenkimal kök hücreler (MKH); osteoblast, adiposit ve kondroblast gibi çeşitli hücrelere farklılaşabilen, kolaylıkla izole edilebilen ve “*ex vivo*” saklanabilen multipotent öncü hücrelerdir (Karahuseyinoglu ve diğ., 2007; Liu, Zhao, ve diğ., 2012). MKH’ler esas olarak kemik iliğinde bulunur, ancak kordon kanı ve umbilikal kord, yetişkin periferik kanı, yağ dokusu, trabeküler kemik ve diş pulpası da dahil olmak üzere çeşitli konakçı dokularda benzer ama özdeş olmayan özelliklere sahip oldukları da gösterilmiştir (Gronthos ve diğ., 2000; Wang ve diğ., 2004; Sakaguchi ve diğ., 2005; Wagner ve diğ., 2005; Kassis ve diğ., 2006; Locke, Feisst ve Dunbar, 2011). Farklılaşmanın yanı sıra kendini yenileme yeteneğine de sahiptirler.

Böylece birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadırlar (Shi ve diğ., 2010). Maternal-fetal arayüz önemli bir MKH kaynağıdır (Atkinson ve diğ., 2005; Schwab ve Gargett, 2007; Cutler ve diğ., 2010). Castrechini ve diğerleri tarafından vasküler nişin damar olgunlaşmasına ve stabilizasyonuna katkı sağlayan plasenta kökenli mezenkimal kök hücreleri barındırdığı bildirilmiştir (Castrechini ve diğ., 2010). Diğer bir çalışmada ise preeklampsi hastalarından alınan desidua kökenli MKH’lerde anormal düzeyde sitokin seviyeleri gözlenmiş ve preeklampsi hastalarından alınan plasentalarda yüksek seviyede “MKH negatif markerlar” bulunmuştur (Benian ve diğ., 2008; Hwang ve diğ., 2010). Bu bulgular MKH’lerin preeklampsi patogeneze katkı sağlayabileceğini göstermektedir.

MikroRNA (miRNA)’lar protein kodlamayan, kısa (19-25 nükleotid), tek zincirli ve hedef mRNA’ların 3’ kodlama yapmayan bölgelerine bağlanarak gen anlatımını düzenleyen RNA molekülleridir (Lee ve Ambros, 2001). Gelişim, farklılaşma, apoptozis ve onkogenezis gibi birçok biyolojik olayda önemli rol oynadıkları bilinmektedir (Bushati ve Cohen, 2007). MiRNA’ların aynı zamanda kök hücrelerin farklılaşması, olgunlaşması ve fonksiyonları üzerinde önemli etkileri vardır (Heinrich ve Dimmeler, 2012; Leonardo ve diğ., 2012). Preeklampsi hastalarından alınan plasentalarda miRNA anlatım seviyelerinde farklılaşmalar gözlemlenmiştir (Hu ve diğ., 2009; Noack ve diğ., 2011). Bu durum, miRNA’ların desidua kökenli MKH’leri düzenleyerek preeklampsi patogenezinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Bu tez kapsamında, çalışma grubumuz tarafından PE hastalarının plasenta ve plazma örnekleri ile yapılmış olan microdizilim çalışması sonucu hem plasenta hem de plazmada farklılaştığı görülen 6 farklı aday miRNA’nın Damlacıklı Dijital Polimeraz Zincir Reaksiyonu (ddPZR) ile validasyonu yapılmıştır. Çalışma grubu olarak, 7 PE hastası ve 7 sağlıklı gebeden alınan toplamda 14 plasenta (desidua tabakası) ve 14 kan örneği kullanılmış ve hem desidua hem de periferik kan kökenli MKH kültürü yapılmıştır. Hücre kültürünün ardından MKH’lerde aday miRNA analizi yapılmıştır. Bu çalışmada PE hastası ve sağlıklı gebelerden elde edilen plasenta ve kan kökenli MKH’lerde miRNA anlatım farklılıklarını belirleyerek potansiyel biyobelirteç çalışması yapmak ve PE patogeneze katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

Çalışma sonucunda elde edilen verilerle istatistiksel “*Graphpad Prism 8.1.2.*” programında yapılmış ve miRNA’ların anlamlılık değerleri parametrik olmayan “*Mann Whitney Test*”, duyarlılık ve özgüllükleri ise “*Receiver operating characteristic*” (ROC) analizi ile değerlendirilmiştir. Yapılan testler sonucunda PE hastası ve sağlıklı gebelerin dMKH’lerinde yapılan miRNA analizinde yalnızca miR-33b-3p ($p=0,004$, AUC=0,93) anlamlı olarak değerlendirilmiş, let-7b-3p ($p=0,38$, AUC=0,65), let-7f-1-3p ($p=0,8$, AUC=0,55), miR-191-3p

($p=0,09$, AUC=0,77), miR-550a-5p ($p=0,053$, AUC=0,81) ve miR-425-3p ($p=0,71$, AUC=0,57) anlamlı bulunmamıştır.

“*MiRO 2.0*” ile yapılan biyoinformatik tabanlı hedef gen ve yolak analizinde, aday miRNA’ların hepsinin ortak olarak bulundukları yolaklar, anlamlı olarak bulunan miR-33b-3p ile preeklampsinin ortak olarak bulundukları yolaklar ve miR-33b-3p’nin hedef genleri için tarama yapılmıştır. Analiz sonucunda, TGFB1’in miR-33b-3p’nin hedefi olduğu ve preeklampside de etkili olan syndecan-2 aracılı sinyal yolağında, VEGF ve VEGFR sinyallenme ağında, MAPK sinyal yolağında, mTOR sinyal yolağında, Akt aracılı sınıf I PI3K sinyallenmede ve fokal adezyon kinaz aracılı sinyallenmede rol aldığı tespit edilmiştir.



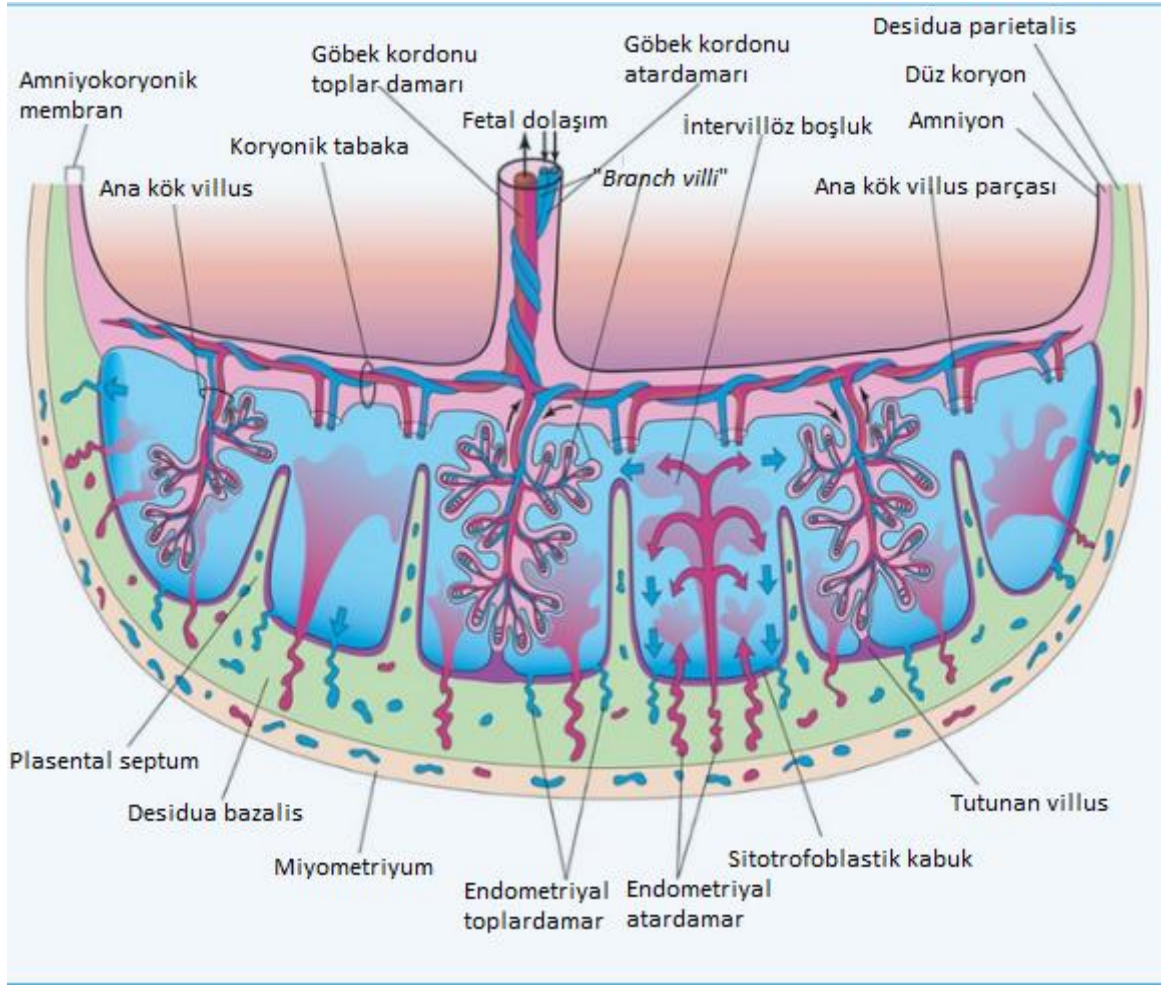
2. GENEL KISIMLAR

2.1. İNSAN PLASENTASININ YAPI VE FONKSİYONU

İnsan plasenta; fetüsün gelişimini destekleyen hem maternal hem de fetal hücrelerin bir arada olduğu çok hücreli bir bariyer olarak gebelikte eşsiz ve vazgeçilmez bir organdır. Plasenta, genetik olarak iki farklı birey olan anne ve fetüs arasındaki metabolik değişim, endokrin düzenleme ve bunlar arasındaki immünolojik toleranstan sorumludur (Siiteri ve Stites, 1982; Cross, Werb ve Fisher, 1994).

Latince'den türetilen plasenta terimi, diskoid şekli nedeniyle “yassı kek” anlamına gelir. Gebeliğin sonunda, 2-3 cm çapında, 2-3 cm kalınlığında ve 500 g ağırlığında, fetal ağırlığının 1/6'sı kadardır.

Plasenta; plasental disk, amniyotik ve koryonik membranlar olarak ikiye ayrılan fetal membranlar ve göbek kordonu gibi fetal kökenli yapılardan oluşur. Placenta ayrıca endometriyumdan kökenlenen ve desidua adı verilen maternal kökenli bir zardan da oluşur (Şekil 2.1). Plasentanın fonksiyonel birimi, hamilelik sırasında maternal ve fetal kan arasındaki sınırı oluşturan bariyerdir.

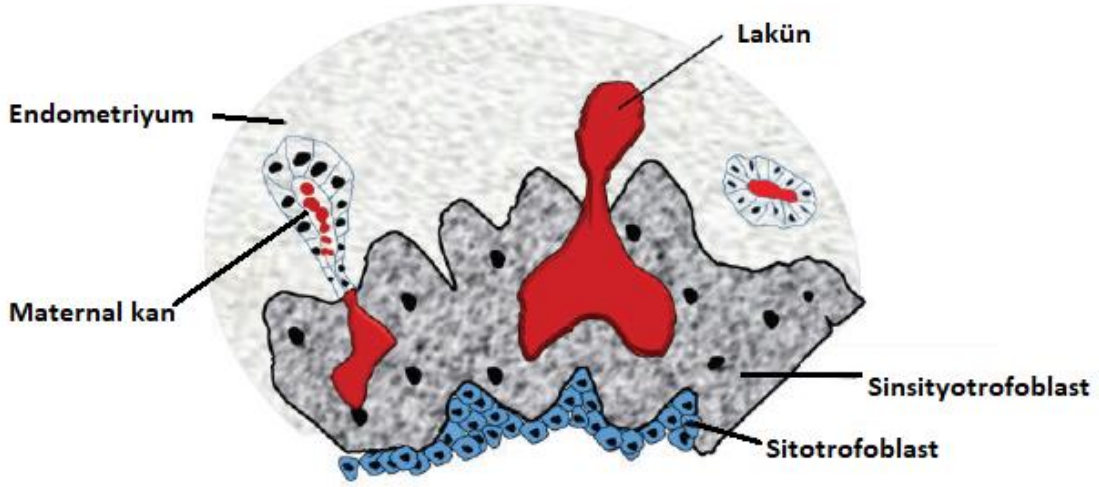


Şekil 2.1: Plasentanın yapısı ve membranları.

2.2. PLASENTA GELİŞİMİ

Plasenta gelişimi, erken embriyolojik aşamalarda, gastrulasyon gerçekleşmeden önce başlayan ve gebelik boyunca devam eden bir süreçtir. Döllenmeden dört beş gün sonra morula (blastomer adı verilen katı hücre kitlesi) uterusu ulaşır. Sıvı dolgulu iç boşluklu görünüm, moruladan blastosiste geçişi işaret eder ve buna hücresel farklılaşma eşlik eder: Yüzey hücreleri trofoblast hücrelerini oluştururken (plasenta ve göbek kordonu dahil olmak üzere ekstraembriyonik yapılara yol açar) iç hücre kütlesi de embriyoyu meydana getirir. Endometriyuma implantasyondan hemen önce, iç hücre kitlesi (embriyoblast) hücresel yeniden yapılanma gibi önemli değişikliklerden geçer ve bunun sonucunda epiblast ve hipoblast (ilkel endoderm) adı verilen yapılar oluşur. Amniyon gibi bazı ekstraembriyonik dokular, hamilelik sırasında embriyoyu barındıran ve amniyotik boşluğu sınırlayan epiblastlardan kökenlenmektedir. Gebelik sırasında amniyon sıvısının üretimindeki artış nedeniyle, amniyon genişler ve

amniyokoryonik membranı oluşturmak için trofoblast ile birleşir. İnsan embriyogenezindeki dış sinsisyotrofoblast ve iç sitotrofoblastın gelişmesi, erken aşamada trofoblastta gerçekleşir. Sitotrofoblast, yüksek oranda proliferatif mononükleer hücrelerden oluşur. Sinsisyotrofoblast, sitotrofoblastik hücrelerin füzyonu ile oluşur ve yüksek invaziv kapasiteye sahiptir. Oluşan sinsisyum, blastosistin uterus duvarlarına implantasyonundan sorumludur (de la Torre, Perez-Lorenzo ve Flores, 2018).



Şekil 2.2: Sinsisyotrofoblastın, maternal damarları aşındırması (de la Torre, 2018).

Endometriyum matrisinin bozulmasından sorumlu olan sinsisyotrofoblastın litik aktivitesi, endometriyumu aşındırarak uterus kılcal damarlarına ulaşır. Vasküler hasarın bir sonucu olarak maternal kan, lakünlere akmaya başlar. Bu laküner evre fetomaternal dolaşımın temelini oluşturur. Aynı zamanda, çoğalmaya devam eden sitotrofoblastın epitel benzeri hücreleri, sinsisyotrofoblasta doğru çıkıntı yapan birikimler oluşturur (Pijnenborg ve diğ., 1980). Bu parmak benzeri yapılar (sinsisyotrofoblast ile kaplanmış sitotrofoblast) döllenmeden sonraki dördüncü haftada her villusun içindeki kan damarlarını meydana getiren ekstraembriyonik mezoderm tarafından istila edilir. Bu durum fetal dolaşım ile trofoblastik lakün içinde bulunan maternal kan arasındaki etkileşimin oluşumunu mümkün kılar (Şekil 2.2). Trofoblastın farklı katmanları (sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblast), fetal damarların bazal membranları ve bu damarların vasküler endotelleri, maternal ve fetal dolaşım arasındaki metabolit değişimini düzenleyen plasenta bariyerini oluşturur. Bu değişim yüzeyinin gebeliğin 28. haftasında yaklaşık 5 m² olduğu ve doğumda 10-11 m²'ye ulaştığı tahmin edilmektedir. Bu bariyerde gebeliğin başlangıcından sonuna doğru 10 mikrondan 1-2 mikrona kadar ilerleyen bir incelme

meydana gelmektedir (Burton ve Watson, 1997). Göbek kordonu; plasentayı fetusa bağlayan, anne ve fetus arasında metabolitleri taşımak için iki atardamar ve bir toplardamar içeren dar bir tüp olarak meydana gelir.

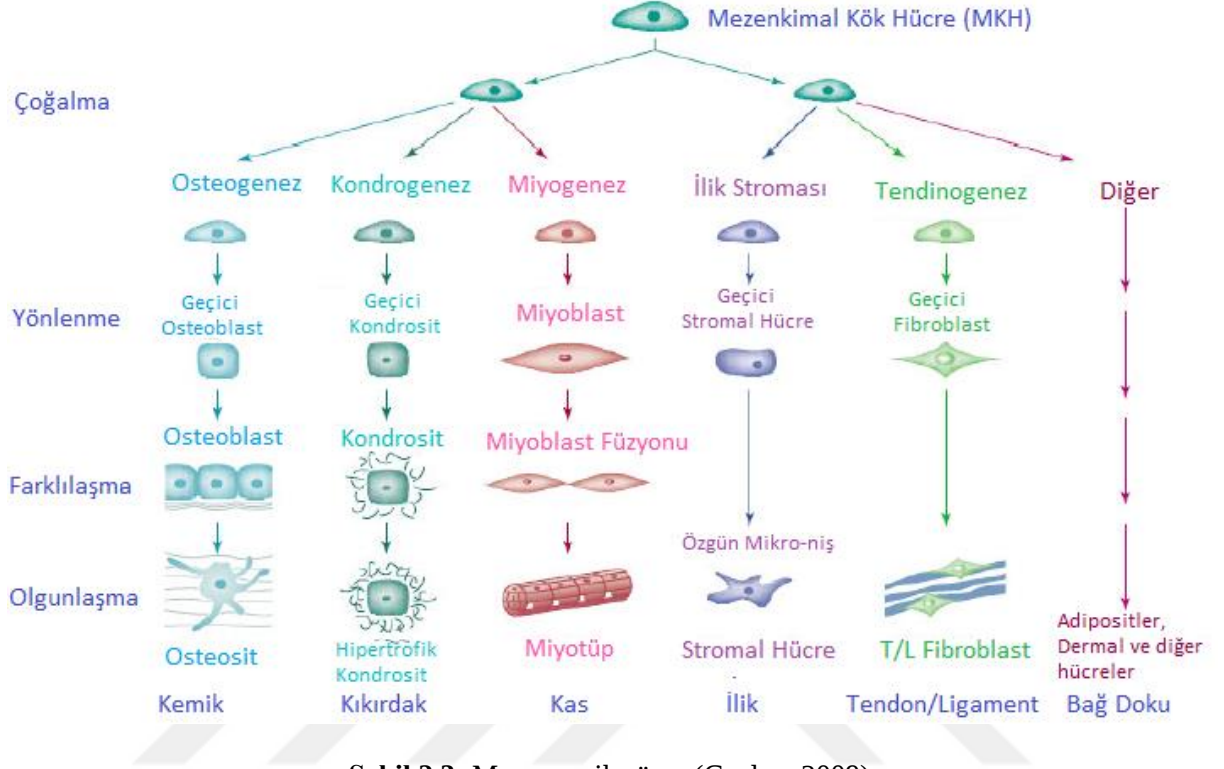
2.3. KÖK HÜCRELER

Kök hücreler; uzun süre kendini yenileyebilen ve farklı hücre tiplerine farklılaşarak vücudun doku ve organlarını oluşturan benzersiz hücrelerdir. Farklı hücre tiplerine farklılaşma yeteneği plastisite olarak adlandırılır. Kök hücreler embriyo, göbek kordonu ve birçok yetişkin dokusundan izole edilebilir ve farklılaşma potansiyelleri nereden geldiklerine bağlı olarak değişir (Panno, 2005; Kelly, 2007).

Embriyonik kök hücre (EKH), blastosist adı verilen erken embriyonun (4-5 gün) iç hücre kütesinden elde edilir (Chung ve diğ., 2008). EKH farklılaşmadan sınırsız sayıda simetrik bölünme yeteneğine sahiptir ve bu da uzun süreli kendini yenileme yeteneğine sahip oldukları anlamına gelir (Kirschstein, 2001). Uygun ortam ve koşullarda kültürlendiklerinde, seçici olarak daha özelleşmiş popülasyonlara ayrılması için uyarılabilirler. EKH'ler pluripotenttir ve vücuttaki her hücre tipine farklılaşabilirler. Bu nedenle, çok çeşitli doku rejenerasyonu ve rejeneratif tıpta hücresel tedaviler için önemli adaylardır (Ami ve diğ., 2008). Bugüne kadar, fare EKH'lerinin kardiyomiyositler, düz kas hücreleri, nöron hücreleri ve hepatositler gibi belirli hücre tiplerini oluşturmak için uyarılmasında bir miktar başarı elde edilmiştir (Thumanu ve diğ., 2011).

Yetişkin kök hücreler, farklılaşmış doku ve organlarda bulunan multipotent hücrelerdir. Özdeş kopyalar oluşturarak kendilerini uzun süre yenileyebilirler ve kökenlendikleri dokuların tüm özelleşmiş hücre türlerine farklılaşabilirler (Kirschstein, 2001). Kan, kemik iliği, kordon kanı, böbrek, yağ dokusu, diş gibi çeşitli dokularda bulunurlar. Yetişkin kök hücreler, kök hücre sayısını sabit tutarak, hücrelerin yaşlanması ve hastalıkları sırasında dokuların kendi kendilerini yenilemesi ile homeostazi için önemlidir (Perkins ve AC, 1998; Orlic ve diğ., 1999). Yetişkin kök hücreler, hematopoetik veya mezenkimal dokular dahil olmak üzere herhangi bir organ veya dokudan ortaya çıkabilir. Bu nedenle sırasıyla hematopoetik kök hücreler (HKH'ler) veya mezenkimal kök hücreler (MKH'ler) olarak adlandırılır. HKH'ler kemik iliğinden, periferel kandan ve umbikal kandan elde edilerek hematopoez olarak adlandırılan işlemle her türlü kan hücresini üretirler. Yetişkin kök hücrelerin bir başka popülasyonu, birçok doku tipinden izole

edilebilen ve ayrıca adipoz doku, kemik dokusu ve kıkırdak dokusu gibi mezenkimal kökenli dokulara farklılaşabilen mezenkimal kök hücreler olarak adlandırılır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Mezengerik süreç (Caplan, 2009).

2.3.1. Plasenta Kökenli Kök Hücreler

Plasenta, bazı avantajlara sahip olan bir kök hücre kaynağıdır. Plasenta doğumda kendiliğinden dışarı atılır ve diğer yetişkin kök hücre kaynaklarında olduğu gibi invaziv yöntemlerin kullanılmasını gerektirmez. Tıbbi bir atık olarak kabul edilir ve embriyonik kök hücreleri kullanmaktan farklı olarak, kullanımında etik kaygılar yoktur (Yen ve diğ., 2005). Plasenta, kemik iliği ve yağ dokusu gibi diğer kaynaklarla karşılaştırıldığında, hücre geri kazanımının donör yaşı ile azaldığı yüksek verimli bir kök hücre kaynağıdır (Shigeno ve Ashton, 1995). Plasmantal hücrelerin çok yönlülük ve farklılaşma potansiyeli muhtemelen ilkel kökenlerinden dolayı çok yüksektir (Macias ve diğ., 2010). Ayrıca, gebelik bir “tolere edilen allograft” örneğidir ve plasenta, maternal-fetal arayüzde immün düzenleyici organdır (Medawar, 1953). Plasenta immün ayrıcalıklı bir organdır ve plasentadan izole edilen hücreler, immün olarak uyumlu hayvanlara nakledildiğinde (“*xenotransplantation*”) *in vitro* (Bailo ve diğ., 2004) ve *in vivo* (Vegh ve diğ., 2013) düşük immünojenite gösterir. Allojenik transplantasyon için plasmantal hücrelerin kullanılabilirliği daha önce yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Kurtzberg ve diğ., 1996).

Rejeneratif tıpta, kök hücrelerin etkileri sadece hücre veya doku restorasyonu ile sınırlı değildir. Aynı zamanda geçici parakrin etki de bu süreçte rol oynar. Bu parakrin etki, yaralanmayı kontrol eden, immün yanıtları düzenleyen ve hayatta kalan yaralı dokuda kendi kendine onarımı teşvik eden kök hücreler tarafından üretilen ve salgılanan faktörlerle ilişkilidir (Gnecchi ve diğ., 2008). Plasenta fetomaternal toleransta temel bir rol oynar ve bu durum, plasenta türevli kök hücrelerin immün düzenleme açısından neden diğer kök hücrelere göre ilave bir avantaja sahip olduğunu açıklar (Lee ve diğ., 2012). Plasentadan kök/progenitör hücre özelliklerine sahip farklı hematopoetik, epitelyal, trofoblastik ve mezenkimal hücre popülasyonları izole edilmiştir.

Plasenta hematopoetik bir organdır. Çünkü gerçek hematopoetik kök hücrenin (HKH) fonksiyonel özelliklerine sahip büyük bir HKH havuzunu barındırır. Plasenta kaynaklı HKH, tüm olgun kan hücrelerine farklılaşabilir ve embriyonun ömrü boyunca hematopoezi devam ettirebilir. Plasental HKH aktivitesi, plasental HKH'nin fetal karaciğere ve embriyo içerisinde timus, dalak ve kemik iliği gibi diğer gelişmekte olan hematopoetik organlara mobilizasyonunu yansıtarak gebeliğin sonuna doğru azalır (Christensen ve diğ., 2004).

Amniyon, koryon ve desidua gibi plasantanın üç tabakası, kök hücre kaynaklarıdır. Amniyotik zar, tek hücreli bir epitel tabakasından ve sırasıyla epiblast ve hipoplasttan elde edilen daha derin bir mezodermal tabakadan oluşur (Miki ve diğ., 2005). Koryon tabakası, amniyonun mezenkimal bölgesine benzeyen iç koryonik mezodermden ve trofoblast kökenli bir dış tabakadan oluşur. Plasantanın uterin bileşeni olan desidua da mezodermal kökenli bir hücre kaynağıdır.

Plasental dokulardan izole edilen kök hücrelerin çoğu, mezodermal kökenli hücrelerdir ve kökenlendikleri katmana bağlı olarak amniyon mezenkimal kök hücreleri (aMKH), koryon mezenkimal kök hücreleri (kMKH), koryonik villus mezenkimal kök hücreleri (kvMKH) ve desidua mezenkimal kök hücreleri (dMKH) olarak adlandırılır (Igura ve diğ., 2004; Soncini ve diğ., 2007; Macias ve diğ., 2010). Göbek kordonunun içinde, bir umbilikal toplardamar ve iki umbilikal atardamarı çevreleyen bağ dokusu vardır. “Wharton” jölesi olarak da bilinen bu doku, göbek kordonu mezenkimal kök hücreleri (gkMKH) olarak adlandırılan zengin bir mezenkimal kök hücre kaynağıdır (Wang ve diğ., 2004). Hepsi, Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği tarafından önerilen üç minimum kriteri karşıladığı için gerçek mezenkimal kök hücreler olarak kabul edilir (Dominici ve diğ., 2006). İlk olarak, plasental MKH'ler kültür kabına yapışır

(“*plastic adherence*”). İkincisi, CD105, CD73 ve CD90 gibi spesifik bir hücre yüzey belirteci setini ifade ederken; CD34, CD45, CD14 veya CD11b, CD79a veya CD19 ve HLA-DR dahil olmak üzere hematopoetik belirteçleri ifade etmezler. Üçüncüsü, in vitro olarak adipositler, kondrositler ve osteoblastlar dahil olmak üzere farklı mezodermal hücre soylarına farklılaşma yetenekleri vardır. Ek olarak, aMKH ve kMKH, plasenta kaynaklı kök hücrelerdeki ilk uluslararası çalışmaya göre fetal kökenlidir (Parolini ve diğ., 2008).

2.3.2. Plasenta Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH), her zaman fazla miktarlarda olmasa da vücuttaki hemen hemen tüm yetişkin dokulardan izole edilebilir. Her organda destekleyici stromal dokuyu oluşturan tüm hücresel elemanları yeniden oluşturabilen bir öncü hücre popülasyonu olduğu düşünülmektedir (Owen, 1988). MKH’ler ilk önce kemik iliğinde hematopoetik olmayan hücrelerin alt kümesi olarak tanımlanmıştır (Friedenstein ve diğ., 1974). Klinik öncesi ve klinik çalışmalarda en çok çalışılan hücre tipidir. MKH'nin avantajları, kültürde izolasyon kolaylığı ve kültürde devamlılık, yüksek büyüme kapasitesi, yüksek plastisite ve doku tamir aktivitesidir. MKH'nin restoratif aktivitesi sadece ölü veya hasar görmüş hücrelerin yenilenmesiyle değil, aynı zamanda immün düzenlemeye aracılık eden ve hücre büyümesini ve/veya farklılaşmasını destekleyen parakrin eylemleri ile de ilgilidir. Ayrıca, MKH transplantasyondan sonra teratomlar oluşturmaz, konakçıya güvenliği sağlar ve düşük immünojeniteleri onları allojenik transplantasyon için uygun hale getirir. Aynı zamanda bu hücreler, enflamatuvar mikro ortamlara ve tümörlere göç etme kabiliyetine sahiptir (L. Chen ve diğ., 2008; Moodley ve diğ., 2013; Vegh ve diğ., 2013; Bonomi ve diğ., 2015). Bu özellik, MKH'ye önemli bir terapötik avantaj sağlar. Çünkü MKH’ler sistemik infüzyon yoluyla enjekte edilebilir ve antikanser ajanlar gibi ilaçların tümör bölgesine verilmesi için araç olarak kullanılabilir.

Plasenta'nın bir MKH kaynağı olarak kullanılması, diğer yetişkin MKH'lere göre çeşitli avantajlara sahiptir. İnvaziv yöntem olmadan MKH'nin plasentadan ayrılma kolaylığının yanı sıra, izole MKH daha homojen ve ilkel bir popülasyonu temsil eder (Macias ve diğ., 2010). Ayrıca, kültürde kemik iliği MKH'sine kıyasla daha yüksek çoğalma oranına sahiptir (Barlow ve diğ., 2008). Bu durum, gen ekspresyonunu etkileyen ve yaşlanma fenotipiyle sonuçlanan ex vivo yaşlanma riskini azaltarak daha az sayıda pasajla daha fazla sayıda hücre elde etmeyi mümkün kılar (Wagner ve diğ., 2009; Bork ve diğ., 2010). Hücresel tedavide plasenta kökenli MKH'nin (pMKH) kalite kontrolü için yaşlanma durumunun dikkate alınması gerekir. Ek

olarak, pMKH'nin klinik etkinliği ve güvenliği, diğer MKH kaynaklarına kıyasla daha yüksek olabilir. Çünkü pMKH, reaktif oksijen türleri (ROS), kimyasal ajanlar, biyolojik ajanlar ve fiziksel stresörler gibi zararlı ajanlara daha kısa süreli maruz kalan genç hücrelerdir (Brandl ve diğer., 2011). PMKH, oğalma sırasında da kaybedilen düşük telomeraz aktivitesi ile ilişkili olarak kültürde sınırlı büyüme kapasitesine sahiptir ve bu da onları rejeneratif tıpta kullanılacak güvenli bir ürün haline getirir (Macias ve diğer., 2010). Ayrıca pMKH, göç etme özelliği ve hasarlı dokularda yer değiştirme (“*homing*”) kapasitesi bakımından avantajlı olabilir. MKH’lerin yer değiştirmesi, temel olarak yaralı doku tarafından kemo-çekici maddelerin salınmasına ve MKH zarı üzerindeki kemokin reseptörlerinin ifadesine bağlıdır. Dokuya ekstrasvazyon için, MKH'nin endotele bağlanıp geçmesi gerekir. MKH'de birkaç integrin ve diğer adezyon moleküllerinin eksprese edildiği bilinmektedir. Endotel hücrelerine MKH'nin yapışması için VLA-4/VCAM-1 (“*very late antigen-4*”/“*vascular cell adhesion molecule-1*”) eksenine bağlılık gösterilmiştir (Ruster ve diğer., 2006). PMKH, kemik iliği MKH'sine kıyasla daha yüksek bir VLA-4 ekspresyonuna sahiptir ve bu durum pMKH'nin hasarlı dokuya yerleşmesi için gelişmiş özelliklere sahip olabileceğini düşündürmektedir (Karlsson ve diğer., 2012).

2.3.3. Periferel Kan Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler

Günümüzde, sayısız hücre tipine farklılaşma kapasitesine sahip kök hücrelerin izolasyonu, rejeneratif tıpta ve doku mühendisliğinde uygulanmaktadır (Lin ve Lee, 2008; Egusa ve diğer., 2012). Bu bağlamda, klinik uygulamalar için yeni kök hücre kaynaklarının, minimal invaziv izolasyon prosedürlerinin ve optimize edilmiş hücre kültürü koşullarının belirlenmesi gerekmektedir. MKH’lerin etkili klinik özellikleri nedeniyle, çok sayıda çalışma bu multipotent hücrelerin izolasyonu ve farklılaşmasına odaklanmıştır (Lin ve Lee, 2008; Egusa ve diğer., 2012; Maleki ve diğer., 2014). Kemik iliğinden izolasyon, düşük frekanslı ve heterojen popülasyon sağlayan invaziv ve yüksek riskli bir yaklaşımdır (Wagner ve diğer., 2005). Bu sorunları aşmak için araştırmacılar MKH’leri alternatif erişilebilir doku kaynaklarından izole etmeye çalışmışlardır (Bieback ve diğer., 2008; Hass ve diğer., 2011; Chong ve diğer., 2012; Maleki ve diğer., 2014). Erişilebilirlik ve yüksek farklılaşma potansiyeli, tıbbi uygulamalar için alternatif bir kaynak olarak kan kökenli kök hücreleri düşündürmektedir (Caplan, 2007; Hass ve diğer., 2011). Bununla birlikte, insanda kan dolaşımında MKH’lerin tespit edilip edilemeyeceği konusunda tartışmalar vardır.

Periferik kan kökenli MKH'ler, CD44, CD54, CD105 (SH2) ve CD166 yüzey moleküllerini ifade ederken, CD14, CD34, CD45 veya CD31 yüzey moleküllerini ifade etmemektedir (Cao, Dong ve Dong, 2005). Kassis ve diğ. CD90 ve CD105 (SH2) ifadesi için pozitif olan ve CD45 ve CD34 için negatif olan kan kökenli MKH'leri izole etmiştir (Jörn ve diğ., 2010). Tondreau ve diğ. kemik iliğı kökenli MKH ve periferik kan kökenli MKH'nin akış sitometrisi analizlerini gerçekleştirmiş ve benzer anlatım modellerini, yani CD44, CD105 (SH2) ve CD73 (SH3) ' n varlığı ve CD14, CD34, CD45 ve HLA-II'nin yokluğunu ortaya çıkarmıştır (Tondreau ve diğ., 2005).

2.4. GEBELİKTE HİPERTANSİYON

Gebeliğı bağılı hipertansiyon (GBH), gebeliklerin yaklaşık % 6-10'unu etkilemektedir (WHO, 2011). Gebelikte, sistolik kan basıncı (SKB)>140 mmHg ve diastolik kan basıncı (DKB)>90 mmHg olduğunda bu durum hipertansiyon olarak tanımlanır. Hipertansiyon; hafif (SKB 140-149, DKB 90-99 mmHg), orta (SKB 150-159, DKB 100-109 mmHg) ve şiddetli (SKB≥160, DKB≥110 mmHg) olmak üzere üç şekilde sınıflandırılmaktadır (Visintin ve diğ., 2010).

Kanada Hipertansiyon Topluluğı'na göre, sıralanan dört durumdan birinin varlığı GBH göstergesidir:

- Önceden var olan hipertansiyon,
- Gebelik hipertansiyonu ve PE,
- Önceden var olan hipertansiyona ek olarak proteinüri ile üst üste binmiş gebelik hipertansiyonu ve
- Sınıflandırılmayan hipertansiyon (Helewa ve diğ., 1997).

ABD'de 1995-2004 yılları arasında yapılan epidemiyolojik bir çalışma, gebelikte hipertansiyon ve PE'nin en sık saptanan hipertansif koşullar olduğunu, önceden varolan hipertansiyonun daha nadir olduğunu göstermiştir (Savitz ve diğ., 2014).

2.5. PREEKLAMPSİ

Preeklampsi, gebeliğın 20. haftasından sonra gelişme gösteren hipertansiyon ve proteinüri olarak tanımlanmaktadır (Roberts ve Hubel, 2009). ACOG, yenilenmiş klavuzlarında,

proteinürinin preeklampsisi tanısı koymak için artık gerekli olmadığına yer vermektedir (ACOG, 2019). Proteinüri yokluğunda hastalığın tanısı; daha önce var olmayan trombositopeni (trombosit sayısı μL başına $<100\ 000$) ile ilişkili hipertansiyon, karaciğer fonksiyonu bozukluğu ve böbrek yetmezliği, akciğer ödemi ya da beyinsel veya görsel bozukluk gelişimi üzerine kurulabilmektedir.

Dünya genelinde gebeliklerin yaklaşık %5'ini etkileyen preeklampsisi (Duley, 2009), maternal ve fetal ölümlerin önde gelen nedenlerindendir (Sibai ve diğ., 2005). Bu durum gebe kadınların aileleri, çevreleri ve sağlık sistemleri üzerinde büyük bir yük oluşturmaktadır (Duley, 2009). GBH, özellikle preeklampsisi, her yıl dünya çapında 76 bin maternal ölüm, 500 bin fetal ve yeni doğan ölümleriyle sonuçlanan toplam 10 milyon gebeliği etkilemektedir (Khowaja ve diğ., 2015). Bu ölümlerin neredeyse tamamı ($>99\%$) az ve orta gelişmiş ülkelerde görülmektedir (Duley, 2009). Ayrıca preeklampsisi hem anne hem de çocuğun yaşamları süresince kardiyovasküler bir risk faktörü olmaktadır (Agatista ve diğ., 2004; Mongraw-Chaffin ve diğ., 2010; Davis ve diğ., 2012). Preeklampsisi geçirmiş kadınlar iki kat artmış felç riski gösterirken, preeklampsisi 34. gebelik haftasından önce meydana geldiğinde iskemik kalp rahatsızlıkları sonucu ölümler sekiz kat daha fazla olmaktadır (Mongraw-Chaffin ve diğ., 2010).

2.5.1. Preeklampsinin Tanısı

Preeklampsisi genellikle proteinüri ile ilişkili hipertansiyon varlığında teşhis edilir (Brown ve diğ., 2000; Roccella, 2000; Sibai BM, 2003). Hipertansiyon; önceden normotansif olduğu bilinen kadınlarda 20. gebelik haftasından sonra en az iki kez ya da en az 4-6 saat aralıklarla ölçülen kan basıncı değerlerinin, SKB için 140 mm Hg'den fazla, DKB için 90 mm Hg'den fazla olması olarak tanımlanmaktadır (Brown ve diğ., 2000; Roccella, 2000; Sibai BM, 2003). Tanı için en fazla 7 gün aralıklarla kan basıncı ölçümü yapılmalıdır (Hauth ve diğ., 2000; Roccella, 2000; Sibai BM, 2003). SKB'de en az 160 mm Hg, DKB'de en az 110 mm Hg veya sürekli olarak yükselen artışlar varsa hipertansiyon şiddetli olarak kabul edilmektedir (Hauth ve diğ., 2000; Roccella, 2000; Buchbinder ve diğ., 2002; Sibai BM, 2003).

Proteinüri, her 24 saatte bir 300 mg veya daha fazla protein atılımı olarak tanımlanmaktadır. 24 saatlik idrar örneği alınamıyorsa proteinüri, en az 4-6 saat aralıklarla alınan en az iki rastgele idrar örneğinde 300 mg/L veya daha fazla protein konsantrasyonu (seviye çubuğu üzerinde $\geq +1$) olarak tanımlanmaktadır (Roccella, 2000; Sibai BM, 2003). Proteinüri ölçümü için kullanılan

idrar çubuğu testi en fazla 7 gün aralıklarla yapılmalıdır (Hauth ve diğ., 2000; Roccella, 2000; Sibai BM, 2003). Preeklampsinin doğru teşhisi, kesin tansiyon ölçümlerine (yani, manşon büyüklüğü, kolun kalp seviyesindeki konumu ve ekipmanın kalibrasyonuna) bağlıdır. Araştırmalar, idrar çubuğu ölçümlerinin yanı sıra rastgele protein-kreatinin oranlarının, gebelik hipertansiyonu olan kadınların 24 saatlik idrar örneklerinde bulunan proteinüri miktarıyla zayıf bir korelasyon gösterdiğini kanıtlamıştır (Durnwald ve Mercer, 2003; Sibai BM, 2003; Al ve diğ., 2004; Waugh ve diğ., 2004). Bu nedenle, proteinüri teşhisi için yapılan kesin testin 24 saatlik kantitatif protein atılımı olması gerektiği düşünülmektedir (Waugh ve diğ., 2004). Proteinüri yokluğunda hipertansiyon; persistan serebral semptomlar, mide bulantısı, kusma, trombositopeni ve anormal karaciğer enzimleri, epigastrik ağrı veya sağ üst kadranda ağrısı ile ilişkili olduğunda preeklampsisi düşünülmelidir (Brown ve diğ., 2000; Sibai BM, 2003).

Preeklampsisi, yüksek hipertansiyonun proteinüri ile ilişkili olması durumunda veya hipertansiyonun yüksek proteinüri ile ilişkili olması halinde (günde ≥ 5 g) ciddi olarak kabul edilmektedir (Sibai BM, 2003; Waugh ve diğ., 2004). Ayrıca preeklampsisi, akciğer ödemi, nöbetler, trombositopeni, persistan epigastrik ağrı veya sağ üst kadranda ağrısına bağlı anormal karaciğer enzimleri veya inatçı ve şiddetli merkezi sinir sistemi semptomları (baş ağrıları, bulanık görme veya körlük) gibi birden fazla organı etkilediğinde şiddetli olarak kabul edilmektedir (Brown ve diğ., 2000; Sibai BM, 2003).

Preeklampsisi teşhisini doğrulamak için geleneksel kriterler (20 haftalık gebelikten sonra hem hipertansiyon hem de yeni başlangıçlı proteinüri) çoğu sağlıklı ve hiç doğum yapmamış kadında kullanılmaya uygundur. Bununla birlikte, bazı kadınlarda, şiddetli gebelik hipertansiyonunun (proteinüri yok) gelişmesi, hafif preeklampsie göre daha yüksek maternal ve perinatal morbidite ile ilişkilidir (Hauth ve diğ., 2000; Buchbinder ve diğ., 2002). Ek olarak, hemoliz gelişen kadınların %10-15'inde, yüksek karaciğer enzimleri veya düşük trombosit sayısı ("*hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet*" HELLP sendromu) (Sibai, 2004) ve eklampsisi gelişenlerin %38'inde hipertansiyon veya proteinüri mevcut olmayabilir (Douglas ve Redman, 1994). Bu işaretler, hafif preeklampsiden çok daha yüksek anne ve perinatal morbidite oranları ile ilişkilidir (Douglas ve Redman, 1994; Sibai, 2004).

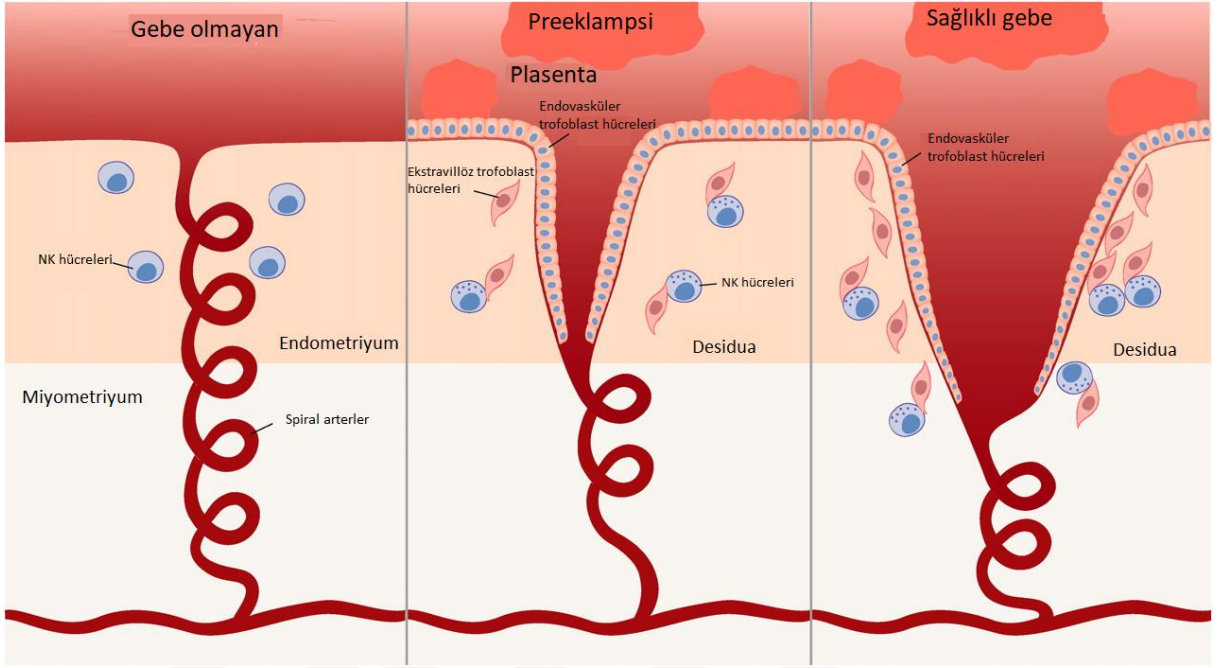
2.5.2. Preeklampsinin Patogenezi

20 haftalık gebelikten sonra gelişen hipertansiyon ve proteinüri ile karakterize preeklampsisi, gebeliğe özgü sistemik bir vasküler hastalıktır. Genellikle nöbetler (eklampsisi), böbrek yetmezliği, HELLP (hemoliz, yüksek karaciğer enzimleri ve düşük trombositler) sendromu, beyin kanaması, pulmoner ödem ve plasental abrupsiyon (“*abruption*”) gibi hayatı tehdit eden olaylar eşlik eder. Preeklampsideki hipertansiyon hem anne hem de yenidoğan sağlığında ciddi komplikasyonlara neden olabilir. Bununla birlikte, preeklampsideki hipertansiyon etiyolojisi belirsizliğini korumaktadır. Sağlıklı bir gebelikte; dolaşım hacmi ve kalp debisinde artma, periferik vasküler dirençte azalma mevcutken (Cope, 1961; MacGillivray, Rose ve Rowe, 1969) maternal damarların genişlemesi nedeniyle kan basıncında da hafif bir azalma mevcuttur (sistolik kan basıncında minimal değişiklikler ve diastolik kan basıncında belirgin azalma ile) (MacGillivray, Rose ve Rowe, 1969). Böyle bir damar genişlemesi, annede sıvı artışına izin verir ve plasental hipoperfüzyona karşı korunmasına yardımcı olur (Visser ve Wallenburg, 1995). Ancak preeklampitik gebelikte, şiddetli ödem olmasına rağmen plazma hacmi belirgin şekilde azalır (Cope, 1961). Sonuç olarak, hem maternal organların hem de bebeğin organlarının zarar görmesine neden olabilecek azaltılmış sistemik perfüzyon gelişir (Redman, 1984).

Preeklampitik kadınlarda, plazma renin aktivitesi (PRA) normal gebe kadınlara göre daha düşüktür (Brown ve diğ., 1992). Renin-anjiyotensin sisteminde anahtar enzim olan Renin, bir hacim sensörü olarak işlev görür ve düşük PRA, dolaşım hacminin genişlemesiyle ilişkilendirilir (Blumenfeld ve Laragh, 2001). Preeklampside, anjiyotensin II gibi vazoaktif maddeler için vasküler duyarlılığın arttığı bildirilmektedir (Gant ve diğ., 1973). Yapılan çalışmalar, preeklampsisi hastası kadınların serumlarında anjiyotensin reseptör tip I (AT1-AA'lar) için agonistik otoantikörlerin varlığını göstermektedir (Zhou ve diğ., 2008). Bu gibi AT1-AA'ların preeklampitik kadınlardan gebe farelere enjeksiyonu; hipertansiyon, proteinüri, glomerüler endotelyoz, plasental anormallikler ve embriyonik defektler gibi preeklampsinin temel özelliklerini indüklemektedir. AT1-AA enjeksiyonlu hamile farelerde bu semptomlar, losartan (bir AT1 reseptör antagonisti) veya AT1-AA'lara karşı nötrleştirici bir peptit uygulandığında zayıflatılır. Bu kanıt, preeklampside PRA'nın baskılanmasına rağmen, anjiyotensin reseptörünün aktivasyonunun preeklampsideki hipertansiyon mekanizmasını/mekanizmalarını anlamada anahtar olabileceğini göstermektedir. Preeklampsideki AT1-AA'ların üretimini tetikleyen mekanizmalar hala bilinmemektedir.

1980'lerde, bazı raporlar, preeklampitik kadınlarda anjiyotensin-dönüştüren enzim inhibitörünün (captopril) etkinliğini, önemli derecede hipertansiyon artışı ile ortaya koymuştur (Coen ve diğ., 1985; Hurault de Lignya ve diğ., 1987). Bu bulgular preeklampsiye bağlı hipertansiyonun aşırı aktif anjiyotensin reseptörü sinyalleşmesinden veya vazoaaktif madde ile indüklenen vazokonstriksiyondan kaynaklanabileceğini göstermektedir. Ne yazık ki, AT1 reseptör antagonistleri ve ACE inhibitörleri, ciddi teratojenik etkileri nedeniyle preeklampsi hastası kadınları tedavi etmek için klinikte kullanılmamaktadır.

İnsan plasenta gelişimi sırasında, sitotrofoblastlar iki farklı invaziv trofoblast türüne ayrılır: Çok çekirdekli sinsisyotrofoblastlar ve ekstrasvillöz trofoblastlar (Cross, Werb ve Fisher, 1994; Zhou ve diğ., 1997). Bu farklılaşma, yaklaşık 12–13. haftalarda meydana gelen uteroplasental dolaşımın kurulmasında çok önemli bir role sahiptir (Jauniaux ve diğ., 2003). Ekstrasvillöz trofoblastlar daha sonra uterus vaskülatürüne girer (endovasküler invazyon) ve maternal kanla doğrudan temas eder (Zhou ve diğ., 1997). Spiral arterlerin düz kas tabakasının trofoblastlar tarafından değiştirilmesi de dahil olmak üzere trofoblastların invazyonu sırasında bu tür vasküler yeniden yapılanmanın, vazoaaktif maddelere dirençli damarlar ile sonuçlandığı ve bu gibi damarların maternal kan basıncı regülasyonunun kontrolünden bağımsız olduğu sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak, normal plasental sirkülasyon, düşük dirençli genişlemiş damarlarla karakterize edilir (Karimu ve Burton, 1994). Ancak preeklampside, bu tür trofoblast invazyonu yüzeyseldir ve spiral arterler uygun şekilde yapılanmaz (Şekil 2.4) (Meekins ve diğ., 1994). Sonuç olarak, plasental dolaşım, bu yüksek dirençli/genişlemeyen damarlar nedeniyle embriyonik talebi karşılamak için yeterli kanı temin edemez.



Şekil 2.4: Gebe olmayan kadın, PE hastası ve sağlıklı gebelerde vasküler düzenlenme (Parham, 2004).

Uteroplazental üniteye kan dolaşımının azalması (muhtemelen anormal plasantasyonun bir sonucu olarak) kısmen preeklampsinin patogenezi açıklayabilir (Lunell ve diğ., 1982; Genbacev ve diğ., 1996). 1939'da Page, plasentadaki iskeminin eklampsi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Lunell ve diğ. (1982), preeklampsi kadınlarda uteroplazental dolaşımda %50 azalma olduğunu tanımlamıştır. Bu gözlemi desteklemek için Ogden ve diğ. 1940 yılında, köpeklerde uteroplazental dolaşımın %50 azalmasının (inen aortayı kısıtlayarak) kan basıncında yaklaşık 25 mmHg artışla sonuçlandığını göstermiştir (Ogden, Hildebrand ve Page, 1940). Daha sonra, bazı hayvan çalışmaları preeklampsii benzeri belirtiler ve azalmış plasental perfüzyon arasındaki ilişkiyi doğrulamıştır (Roberts ve Lain, 2002). Bu çalışmalar plasenta dolaşımındaki azalmanın preeklampsii başlangıcında muhtemelen temel bir faktör olduğunu göstermektedir. Gebeliğin ilk üç ayında anormal implantasyonun (Redline ve Patterson, 1995) ve/veya vasküler yeniden şekillenmedeki kusurların (Meekins ve diğ., 1994) plasenta dolaşımının azalmasına katkıda bulunan ana faktörler olduğu varsayılmıştır. Ancak, preeklampsideki plasental hipoksiye yol açan kesin mekanizmalar hala belirsizliğini korumaktadır.

PE çok faktörlü bir hastalık olarak kabul edilir. Patogenezi hakkında birçok teori geliştirilmiştir ve bunların ortak özellikleri, plasentanın merkezi rolüdür. “İki aşamalı teori” preeklampsii mekanizmalarında yaygın olarak kabul edilmektedir (Roberts ve Hubel, 2009). Erken

plasentasyonda, trofoblast hücreleri maternal uterin spiral arterlerin duvarını istila eder ve bu arterleri kan akışına karşı düşük dirençli büyük çaplı damarlara dönüştürür (De Wolf ve diğ., 1980; Zhou ve diğ., 1997). Preeklampside, bu transformasyon bozulur (anormal plasentasyon) (Robertson, Brosens ve Dixon, 1967; Brosens, Robertson ve Dixon, 1972; Pijnenborg ve diğ., 1991; Zhou ve diğ., 1993) ve ortaya çıkan hipoperfüzyonlu plaseenta, maternal dolaşıma sistemik vasküler ve endotel fonksiyon bozukluğuna yol açan plasental faktörler salgılar. Anormal yerleşimin birincil nedeni belirsizliğini korumaktadır; ancak genetik, immünolojik ve çevresel faktörlerin hepsinin dahil olması muhtemel görünmektedir (Saito ve diğ., 2010).

Plasental faktörlerin belirlenmesi yıllardır birincil araştırma konusu olmuştur. 2003 yılında, üç araştırma grubu (Koga ve diğ., 2003; Maynard ve diğ., 2003; Tsatsaris ve diğ., 2003) preeklampsisi hastası kadınlarda serum sFlt1'de (ayrıca çözünür vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü 1 (sVEGFR1) olarak da anılır) anormal artışlar bildirmiştir. Maynard ve diğ. de sFlt1'in adenoviral gen transferinin gebe sıçanlarda hipertansiyon ve proteinüri gibi preeklampitik fenotipleri indüklediğini bildirmiştir. Daha sonra, Levine ve diğ., sFlt1'in klinik preeklampsisi semptomlarının başlamasından önce artmaya başladığını ve sFlt1 düzeyinin preeklampsisi şiddeti ile iyi korele olduğunu göstermiştir (Levine ve diğ., 2004). Bu raporlarla birlikte, sFlt1 iyi bir plasental faktör olarak görülmüş ve anjiyogenik dengesizlik preeklampsinin en önemli patojenik mekanizmalarından biri olarak ortaya çıkmıştır.

Hipertansiyon ve proteinüri preeklampsinin konvansiyonel tanısı için belirleyicidir. Normal olarak hamilelik sırasında maternal dolaşım, artmış intravasküler hacim ve belirgin şekilde azalmış vasküler direnci içeren fizyolojik adaptasyonlardan geçer (Mashini ve diğ., 1987; Robson ve diğ., 1989; Duvekot ve diğ., 1993; Mabie ve diğ., 1994). Bu adaptasyonlar gebe olmayan kadınlardaki seviyenin (Christianson, 1976; Moutquin ve diğ., 1985) biraz altında bir arteriyel kan basıncı ve artmış glomerüler filtrasyon hızı ile sonuçlanır (Cornelis ve diğ., 2011). Preeklampside, artmış plasental sFlt1'in (çözünür fms benzeri tirozin kinaz 1), VEGF (vasküler endotel büyüme faktörü) ve PlGF (plasental büyüme faktörü) ile indüklenen mikrovasküler gevşemeyi önleyerek periferik vasküler direnci (ve dolayısıyla arteriyel basıncı) arttırdığı düşünülmektedir (Maynard ve diğ., 2003). VEGF sinyalleme, fenestre edilmiş endotelin devamlılığı için de önemlidir. VEGF sinyallemeinin inhibe edilmesi, glomerüler endotel fenestrazı daraltır ve glomerüler filtrasyon hızını azaltıp idrar protein atılımını artıran, glomerüler kılcal endotelyoz olarak adlandırılan endotel şişmesine neden olur (Mattot ve diğ.,

2002; Eremina ve Quaggin, 2004). VEGF sinyalleşmesinin inhibisyonu ayrıca, glomerüler kılcal endotelyoza ve renal trombotik mikroanjyopatiye yol açabilen podosit fonksiyon bozukluğuna da yol açar (Eremina ve diğ., 2003, 2008).

Yukarıda açıklandığı gibi, preeklampsi, maternal antianjiyogenik durumun neden olduğu endotel fonksiyon bozukluğunu içeren sistemik bir vasküler bozukluk olarak tanımlanabilir.

2.5.3. Preeklampsinin Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

Sağlıklı nullipar kadınlarda preeklampsinin sıklığı %2 ile %7 arasında değişmektedir (Hauth ve diğ., 2000; Sibai BM, 2003; Vatten ve Skjaerven, 2004). Bu kadınlarda, hastalık çoğunlukla hafif, başlangıç çoğunlukla doğuma yakın veya intrapartum (vakaların % 75'i) ve yalnızca olumsuz gebelik sonuçları için ihmal edilebilir düzeyde yüksek bir risk taşımaktadır (Hauth ve diğ., 2000; Sibai BM, 2003; Vatten ve Skjaerven, 2004). Buna karşılık, çoğul gebelik (Caritis ve diğ., 1998; Sibai ve diğ., 2000; Wen ve diğ., 2004), kronik hipertansiyon (Caritis ve diğ., 1998; Sibai, 2002), preeklampsi öyküsü (Caritis ve diğ., 1998; Hnat ve diğ., 2002), gebelik öncesi diyabet (Caritis ve diğ., 1998) ve önceden var olan trombofililerin bulunduğu kadınlarda, hastalığın sıklığı ve ciddiyeti daha yüksektir (van Pampus ve diğ., 1999; Alfirevic, Roberts ve Martlew, 2002; Kupferminc, 2003).

Preeklampsi riskinde artış ile birlikte çeşitli risk faktörleri tanımlanmıştır (Dekker ve Sibai, 2001). Gebe kalmadan önce aynı partnerle sınırlı sperm maruziyeti olanlarda risk artar (Dekker ve Sibai, 2001; Dekker ve Robillard, 2003; Einarsson, Sangi-Haghpeykar ve Gardner, 2003). Aynı partnerle uzun süreli sperm maruziyetinin koruyucu etkileri, 20 yaşından küçük kadınlarda preeklampsi riskinin yüksek olduğunu açıklayabilmektedir. Aynı eş ile daha önce yapılan bir kürtaj (kendiliğinden veya indüklenmiş) veya sağlıklı bir hamilelik, preeklampsi riskinin azalmasıyla ilişkilidir, ancak bu koruyucu etki bir eş değişikliği ile kaybedilmiştir (Dekker ve Robillard, 2003; Saftlas ve diğ., 2003). İskandinav ve ABD çalışmaları, paternal faktörlerin önemini doğrulamaktadır (Lie ve diğ., 1998; Esplin ve diğ., 2001).

Bütün popülasyon verileri ile Lie ve diğ. (1998), preeklampsik bir gebeliğin babası olan erkeklerin, preeklampsik bir hamilelik geçirip geçirmediğine bakılmaksızın farklı bir kadında preeklampsik bir gebeliğin babası olma ihtimalinin neredeyse iki kat olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, anneler, başka bir kadında preeklampsik bir ilk gebeliğin babası olan bir erkek tarafından gebe kaldıklarında, ikinci gebeliklerinde (neredeyse %3) önemli ölçüde artmış bir

riske sahip olurlar. Bu risk neredeyse ilk gebeliklerdeki ortalama risk kadar yüksektir (Lie ve diğ., 1998).

Yardımcı üreme teknolojisindeki ilerlemeler, maternal bağışıklık sistemi için preeklampsi riskini artıran çeşitli zorluklar doğurmuştur. Bunlara 40 yaşından büyük, ilk gebeliklerinde infertil veya polikistik over sendromlu obez olan kadınlar ve bağışlanan gametler; yani bağışlayıcı tohumlama, oosit bağışı ve hatta embriyo bağışı ile hamile kalan kadınlar dahildir. Bağışlanan gamet kullanımı, maternal-fetal immün etkileşimi etkilemekte ve bu kadınların çoğunda multifetal gebelikler meydana gelmektedir (Dekker ve Sibai, 2001; Wang ve diğ., 2002; Wen ve diğ., 2004).

Obezite preeklampsi için kesin bir risktir. Risk, yüksek vücut kitle indeksi ile artmaktadır (Dekker ve Sibai, 2001; O'Brien, Ray ve Chan, 2003). Obezitede dünya çapındaki artışın preeklampsi sıklığını arttırması muhtemeldir (Dekker ve Sibai, 2001; Cedergren, 2004). Obezitenin preeklampsi için risk faktörü olan insülin direnci ile güçlü bir bağlantısı bulunmaktadır (Dekker ve Sibai, 2001; Wolf ve diğ., 2002). Obezite veya insülin direncinin hastalıkla ilişkilendirilen kesin mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır. Muhtemel açıklamalar; hiperdinamik dolaşımla ilişkili dislipidemi veya artmış sitokin aracılı oksidatif stres, güçlendirilmiş sempatik aktivite, artmış tübüler sodyum rezorpsiyonu ve insülin direncinin, dolayısıyla hiperinsülinemik durumun plasenta oluşumu ile doğrudan etkileşimi şeklindedir (Dekker ve Sibai, 2001).

Sağlıklı hamileliğin kendisi, en azından üçüncü trimesterde, sistemik iltihaplanma durumudur. Buna dayanarak, preeklampsi ayrı bir oluşum değildir, ancak hamileliğin kendisinin yol açtığı bir dizi maternal sistemik inflamatuvar yanıtın etkisidir. Sonuç, bu yanıtı artıracak herhangi bir faktörün preeklampsiye zemin hazırlayacağı yönündedir (Redman ve Sargent, 2003). Buna bağlı olarak, enfeksiyonlar ve romatizmal hastalıklar gibi maternal enflamatuvar yanıtı arttıran herhangi bir faktör aynı zamanda kadınları preeklampsiye yatkınlaştıracaktır (Von Dadelszen ve Magee, 2002; Boggess ve diğ., 2003; Wolfberg ve diğ., 2004). Son çalışmalar maternal enfeksiyonların (örneğin idrar yolu, periodontal hastalık, klamidya ve sitomegalovirüs) preeklampsi ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Von Dadelszen ve Magee, 2002; Boggess ve diğ., 2003). İnflamasyon muhtemelen obezitenin preeklampsiye zemin hazırladığı nedensel yolun önemli bir parçasıdır (Wolf ve diğ., 2001).

Preeklampsili kadınlarda kontrollere kıyasla genel olarak artmış bir trombofili oranı görülmüştür (Alfirevic, Roberts ve Martlew, 2002; Kupferminc, 2003). Ancak, bu bulguları tekrarlayamayan birçok rapor olmuştur (Livingston ve diğ., 2001; Morrison ve diğ., 2002). Çalışılan hastaların heterojenliği bu durumu açıklayabilir. Olumsuz çalışmaların çoğu temel olarak (geç) üçüncü trimester vakalarını içermektedir. Bugüne kadarki en geniş preeklampitik hasta serisini inceleyen van Pampus ve diğ. (1999), çok erken başlangıçlı hastalığı olan kadınlarda (28. haftadan önce) üçüncü trimesterde doğum yapanlara göre (36. haftadan önce) farklılaşmış trombofili varlığını açıkça göstermiştir.

2.5.4. Preeklampside Kullanılan Biyobelirteçler

Öngörücü testin faydasının hastalığın genel tekrarlanma sıklığına bağlı olacağına dikkat etmek önemlidir. Preeklampsie meydana gelme sıklığı (“*incidence*”) nispeten düşük olduğu için, pozitif test sonuçlarına sahip tarama testleri, hastalıkların olasılığını doğru bir şekilde tahmin etmek için yüksek olasılık oranları gerektirir. Negatif sonuçlara sahip testler ise hastalığı güvenle dışlamak için çok düşük olasılık oranları gerektirir. Bu nedenle, preeklampsie için faydalı bir öngörü, pozitif sonuç için çok yüksek (> 15), negatif sonuç için ise çok düşük (< 0.1) olasılık oranları gerektirmektedir (Conde-Agudelo, Villar ve Lindheimer, 2004; Conde-Agudelo ve Romero, 2009).

2.5.4.1. Anjiyogenik Belirteçler

Mutlak sFlt-1, VEGF, PlGF ve sEng (çözünür endoglin) seviyelerindeki değişiklikler maternal dolaşımda preeklampsinin klinik başlangıcından birkaç haftadan birkaç aya kadar önce gözlemlenebildiği için potansiyel bir öngörücü test olarak önerilmiştir (Levine ve diğ., 2004, 2006; Noori ve diğ., 2010). Levine ve diğ. (2004) 120 preeklampitik kadın ve 120 normotansif hamilelik içeren “*Calcium for Preeclampsia Prevention*” (CPEP) çalışması kapsamında bir iç içe vaka kontrol çalışması gerçekleştirmiş ve gebelik boyunca incelenen anjiyogenik faktörlerin (toplam sFlt-1, serbest VEGF ve serbest PlGF) serum konsantrasyonlarını ölçmüştür. Yapılan çalışmada; normotansif gebeliklerde, sFlt-1 düzeyleri gebeliğin erken ve orta evrelerinde stabildir ve 33-36. haftalarda yükselmeye başlamaktadır. PlGF konsantrasyonları ilk iki trimesterde artmış, 29-32. haftalarda zirveye ulaşmış ve ardından azalmıştır. Sağlıklı gebelerde gözlemlenenen farklı olarak, sFlt-1 seviyeleri klinik hastalık sırasında preeklampitik grupta anlamlı olarak daha yüksektir. Ayrıca, Levine ve diğ. (2004) dolaşımdaki sFlt-1 seviyelerinin

preeklampsinin klinik başlangıcından 5 hafta önce artmaya başladığını ve hastalık şiddeti ile ilişkili olduğunu gözlemlemiştir. sFlt-1 seviyelerindeki artışa paralel olarak, serbest PlGF ve serbest VEGF seviyeleri düşmekte ve bu seviyelerdeki düşmenin sFlt-1 ile bağlanmanın bir sonucu olduğu öne sürülmektedir. Hem 13–20. hem de 21–32. haftalardaki düşük PlGF seviyeleri preterm preeklampsinin, 33-41 haftalarındaki düşük seviyeler ise term preeklampsinin öngörücüsüdür. sFlt-1 düzeyleri ile preeklampsi arasındaki ilişki hastalığın başlangıcına kadar gözlenmemektedir. 21–32. haftadan daha erken olmayan yüksek sFlt-1 düzeyleri preterm preeklampsinin belirleyicisi iken, 33-41. haftadaki yüksek sFlt-1 düzeyleri term preeklampsinin belirleyicisidir. Genelde, şiddetli ve/veya erken başlangıçlı preeklampsi gelişen kadınlar, her zaman aralığında daha yüksek sFlt-1 ve daha düşük PlGF seviyelerine sahip olmaktadır (Levine ve diğ., 2004).

Daha sonra aynı grup, sEng'in preeklampsinin patogeneğinde sFlt-1 ile birlikte hareket ettiği bulgusu ile bir başka iç içe vaka kontrol çalışması gerçekleştirmiştir (Levine ve diğ., 2006). Normal gebeliklerde, sEng'nin serum seviyeleri 33-36. haftalarda artmaya başlamış; ancak preeklampsi gelişen ve klinik hastalığın başlangıcında zirveye ulaşmış kadınlarda daha erken ve daha dik bir şekilde yükselmiştir. sEng seviyeleri preeklampsinin klinik başlangıcından 9–11 hafta önce ve term preeklampsinin klinik başlangıcından 12-14 hafta önce yükselmeye başlamaktadır. 13-20. haftalarda ve 21–32. haftalarda yüksek sEng seviyeleri preterm preeklampsi, 21-32. haftalarda ve 33-41. haftalarda yüksek sEng seviyeleri ise term preeklampsi için öngörücüdür. Ek olarak, gestasyonel hipertansiyon gelişen kadınlarda veya gebelik yaşına göre küçük olan bebek (*“small for gestational age”*) sahibi olan normotansif kadınlarda, hastalığın ortaya çıkmasından önce bu belirteçlerin seviyelerinde belirgin bir artış olmamaktadır (Levine ve diğ., 2006).

sFlt-1:PlGF oranı (hem artan sFlt-1 hem de azalmış PlGF'yi yansıtan bir antianjiyogenik aktivite indeksi) da değerlendirilmiş ve sonuçlar sEng seviyelerine paralel bulunmuştur. Bununla birlikte, çok değişkenli analiz, her birinin bağımsız olarak preeklampsi ile ilişkili olduğunu ve sFlt-1:PlGF oranının, preeklampsiyi tek başına herhangi bir proteinden daha güvenilir şekilde öngördüğünü göstermektedir. Formüle sEng seviyesinin eklenmesiyle, (sFlt-1+sEng):PlGF oranının preeklampsiyi bireysel biyobelirteçlerden daha güçlü bir şekilde belirlediği görülmüştür. Son olarak; sEng ya da sFlt-1:PlGF oranı veya her ikisinin seviyesi yüksek veya düşük olan kadınlar arasındaki risk analiz edildiğinde, tek bir biyobelirtecin

yüksek seviyelerde bulunduğu kadınlarda preeklampsii gelişme riskinde sadece küçük artışlar görülürken (olasılık oranı: 2.3–7.4), hem sEng hem de sFlt1: PlGF oranı yüksek seviyelerde olan kadınlarda preeklampsii gelişme riski çok yüksek bulunmuştur (olasılık oranı > 30).

2.5.4.2. Plasental Protein 13

Plasental protein-13 (PP-13) (Bohn, Kraus ve Winckler, 1983), normal implantasyon ve plasenta vasküler gelişimde rol oynayan, sinsisyotrofoblastlar tarafından anlatımı yapılan, galektin ailesinin bir üyesidir (Than ve diğ., 2004; Visegrády ve diğ., 2001). Preeklampsii, fetüste büyüme geriliği [*“intrauterine growth retardation”* (IUGR)] ve erken doğum gelişmekte olan kadınlarda, ilk trimesterde dolaşımdaki PP-13 seviyeleri anlamlı derecede düşüktür (Burger ve diğ., 2004; Huppertz ve diğ., 2008). 290 kontrol ve 47 preeklampitik kadını içeren prospektif bir iç içe vaka kontrol çalışmasında, Chafetz ve diğ. (2007) preeklampitik gebeliklerin, ilk trimesterde (9-12. haftalar) kontrollere kıyasla daha düşük PP-13 seviyelerine sahip olduğunu gözlemlemiştir (Chafetz ve diğ., 2007).

Son zamanlarda yapılan bir çalışma, PP-13 ile yapılan ardışık testlerin faydalı olduğunu göstermiştir. Gonen ve diğ. (2008) 1366 kadında 6-10., 16–20. ve 24-28. haftalarda PP-13 seviyelerini ölçmüş ve PP-13'ün sadece ilk trimesterde ya da ilk ve ikinci trimesterler arasındaki eğim ile birlikte kullanıldığında preeklampsii riskini değerlendirmek için uygun bir belirteç olarak kullanılabileceğini raporlamışlardır (Gonen ve diğ., 2008).

Tek bir zamanda değerlendirilen ikinci trimester PP-13 seviyelerinin (22-32. hafta) preeklampsiiyi öngörmeye faydalı olmadığı ve Doppler velosimetrisi ile birleştğinde öngörüsünün artmadığı görülmüştür (Spencer ve diğ., 2007).

2.5.4.3. Gebeliğe Bağlı Plazma Proteini A

Gebeliğe bağlı plazma proteini A (PAPP-A); insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinler için hidrolitik aktiviteye sahip, sinsisyotrofoblast tarafından üretilen bir peptidazdır (Lawrence ve diğ., 1999; Giudice ve diğ., 2002). Bu proteinler; implantasyon, maternal desiduanın trofoblast invazyonu ve plasental büyüme için önemli olduğu bilinen insülin büyüme faktörlerini düzenler (Hamilton ve diğ., 1998) ve maternal dolaşımda salınır (Oxvig ve diğ., 1993).

İlk trimesterde azalmış PAPP-A seviyeleri preeklampsi de dahil olmak üzere olumsuz gebelik riskindeki artışla ilişkilendirilmiştir (Spencer ve diğ., 2008). PAPP-A aslında trizomi 21 için belirlenmiş bir biyobelirteçtir. Spencer ve diğ. gelişmekte olan preeklampsinin olasılık oranında hafif bir artışın, azalan PAPP-A seviyeleri ile ilişkisini ortaya koymuştur. Normal PAPP-A değerleri görülen vakaların %5'inde, olasılık oranları 3.7 kat artmış (%95 Güven Aralığı “*Confidence Interval*” (CI): 2.3 – 4.8) ve bu vakaların da %15'inde preeklampsi tanımlanmıştır (Spencer, Cowans ve Nicolaides, 2008).

Bir sistematik derleme ve metaanaliz, Down Sendromluların serum taramasında kullanılan beş serum analitinin preeklampsiyi öngörmedeki doğruluğunu değerlendirmiştir. Normal PAPP-A değerleri görülen vakaların %5'inde, pozitif olasılık oranı 2.10 (%95 CI: 1.57-2.81) ve negatif olasılık oranı 0.95 (% 95 CI: 0.93-0.98) olarak bulunmuştur (Morris ve diğ., 2008). Birinci trimester serum PAPP-A'nın, geç başlangıçlı preeklampside iyi bir belirleyici olmadığı görülmüştür (D'Anna ve diğ., 2009).

2.5.4.4. Böbrek Fonksiyon Bozukluğu ile İlişkili Testler

Böbrek preeklampsinin ana hedef organı olduğundan, preeklampsinin olası belirleyicileri olarak böbrek fonksiyon bozukluğu ile ilgili testler önerilmiştir.

Serum ürik asit: Preeklampside gözlenen hiperürisemi, preeklampsiyi tahmin etmek için serum ürik asit düzeylerini ölçmenin kullanılıp kullanılamayacağını belirlemeye yönelik çalışmalara yol açmıştır. Ne yazık ki, ürik asit preeklampsiyi gebeliğin diğer hipertansif hastalıklarından ayırt etmede veya olumsuz sonuçların klinik bir öngörücüsü olarak sınırlı klinik kullanımdadır (Lim ve diğ., 1998; Thangaratnam ve diğ., 2006).

Proteinüri: Proteinüri, ilk gebelik tanısından itibaren doğum öncesi bakım ziyaretlerinde rutin olarak değerlendirilir. Proteinüri ölçümü, 24 saat boyunca total protein veya toplam albümin atılımını, mikroalbüminüri, albümin:kreatinin oranı ve spot proteinüri veya albüminüri için seviye çubuklarını içerir. Morris ve diğ. preeklampsideki idrar spot protein:kreatinin oranının sistematik derleme ve metaanalizini yapmış ve spot protein:kreatinin oranı anlamlı proteinüri tanısında rol alırken, preeklampsiye bağlı olumsuz sonuçlarla ilişkili olmadığı doğrulamıştır (Morris ve diğ., 2012).

Kallikreinler: Kallikrein-kinin sistemi, damar dilatasyonunun ve dolayısıyla kan akışının önemli bir parakrin düzenleyicisidir. Millar ve diğ. ve Kyle ve diğ., preeklampsinin bir belirleyicisi olarak idrar kallikrein seviyelerini değerlendirmiştir. Preeklampsi hastası gebelerde kallikreinürinin komplike olmayan gebeliklere göre azaldığı gösterilmiştir. Ancak, bildirilen özgüllük değerleri oldukça düşük olduğu için bir tarama testi olarak faydalı olması muhtemel bulunmamıştır (Kyle ve diğ., 1996; Millar ve diğ., 1996).

2.5.4.5. Serbest Fetal Nükleik Asitler

Annedeki fetal hücrelerin varlığının ilk tanımı, bir Alman patoloğunun eklampsiden ölen kadınların ciğerlerinde trofoblast hücreleri tespit ettiği 19. yüzyıla dayanmaktadır. 1969'da sağlıklı gebelerin kanında erkek fetal hücreleri bulunmuştur (Walknowska, Conte ve Grumbach, 1969). Bazı çalışmalar bu sonuçları doğrulamış ve fetal-maternal hücre trafiğinin tanımlanmasına yol açmıştır. Birkaç araştırmacı, fetal hücrelere göre daha fazla miktarda bulunan maternal dolaşımdaki fetal kökenli nükleik asitleri tanımlamıştır (Lo ve diğ., 1997; Poon ve diğ., 2001). Allojenik fetal hücrelerin maternal dolaşıma transferinin olduğu (Klonisch ve Drouin, 2009) ve maternal kanda hücre içermeyen fetal nükleik asitlerin (DNA ve mRNA) dolaştığı yaygın olarak kabul edilmektedir (Chiu ve Lo, 2004). Fetal sitotrofoblastların göçü dışında, hücrelerin çift yönlü transplasental göçüne yol açan kesin mekanizma büyük ölçüde bilinmemektedir. Ayrıca, serbest hücre dışı nükleik asitlerin dolaşıma serbest bırakılma mekanizması henüz net değildir. Kanıtların çoğu, maternal plazmada hücre içermeyen fetal DNA'nın büyük çoğunluğunun muhtemelen plasentadan, bazıları dolaşımdaki hücrelerden elde edilebilse de sitotrofoblastların apoptoz ve nekrozu yoluyla elde edildiğini göstermektedir.

Özellikle eritroblastlar olmak üzere fetal hücrelerin ve gebe kadınların kanlarından elde edilen hücre dışı fetal DNA'nın incelenmesi, doğum öncesi tanı için yeni risksiz yöntemler geliştirmek amacıyla yoğun araştırmalara konu olmaktadır (Dennis Lo ve Chiu, 2007; Maddocks ve diğ., 2009). Hücre dışı fetal DNA, fetal cinsiyet ve fetal kan grubu durumunun belirlenmesinde zaten kullanılmaktadır (Maddocks ve diğ., 2009).

Preeklampside fetal-maternal hücre trafiği, bu gebelikler sırasında maternal dolaşımda tespit edilen yüksek sayıda fetal hücre ile önemli ölçüde değişmektedir (Holzgreve ve diğ., 1998). Prospektif çalışmalar ayrıca bu durumun preeklampitik gebeliklerde erken gerçekleştiğini göstermiştir (Al-Mufti ve diğ., 2000; Holzgreve ve diğ., 2001). Benzer bir şekilde preeklampitik

gebeliklerde hücre dışı fetal DNA'nın hastalığın klinik başlangıcından çok önce yükseldiği gösterilmiştir (Lo ve diğ., 1999; Leung ve diğ., 2001; Zhong, Holzgreve ve Hahn, 2002). Bu sonuçlar CPEP çalışması kapsamında geniş bir vaka kontrol çalışmasında doğrulanmıştır. Levine ve diğ. preeklampsisi başlangıcından önce maternal serumlarda hücre dışı fetal DNA'da iki aşamalı bir artış bildirmiştir. İlk yükselme 17–28. haftalarda (36 vs. 16 genomik eşdeğer/mL, $p < 0.001$) ve ikincil bir yükselme ise klinik sendromun başlamasından yaklaşık 3 hafta önce başlamaktadır (176 vs. 75 genomik eşdeğer/mL, $p < 0.001$). Ayrıca, fetal DNA, kontrollere göre 17. haftadan 20. haftaya doğru gidildikçe daha fazladır. Ancak 25 ila 28. haftaya kadar istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır. Hamileliğin erken döneminde (13-16. haftalar arasında) belirgin bir fark görülmemiştir (Levine ve diğ., 2004).

Crowley ve diğ. normal gebeliklere kıyasla preeklampsisi görülen gebeliklerde 20. haftadan önce plazma fetal DNA'sını ölçmek için iç içe geçmiş bir vaka kontrol çalışması gerçekleştirmiştir. Örnek toplamada ortalama gebelik yaşı 13 haftadır. Y kromozomuna özgü “*sex determining region Y*” (SRY) geni fetal belirteç olarak kullanılmıştır. Bu gen preeklamptik gebeliklerin %94'ünde ve normal gebeliklerin %78'inde tespit edilmiştir. Ancak ortalama seviyeler, vakalar ve kontroller arasında benzerlik göstermektedir. Yazarlar, 20. haftadan önce maternal plazmada serbest fetal DNA miktarının preeklampsisi için kullanışlı bir öngörücü olmadığı sonucuna varmışlardır (Crowley ve diğ., 2007). İlk doğum öncesi ziyarette toplanan tam kan örneklerini kullanarak (ortalama 15.7 ± 3.6 hafta), Cotter ve diğ. 50.000 SRY kopya/mL eşik değerinde preeklampsiyi öngörmek için %39 duyarlılık ve %90 özgüllük bildirmiştir (Cotter ve diğ., 2004).

Bu testleri preeklampsiyi öngörmek için tarama araçları olarak kullanmanın bir dezavantajı, fetal hücrelerin veya hücre dışı fetal DNA analizlerinin hala karmaşık ve maliyetli olmasıdır. Yüksek maternal DNA arka planı nedeniyle, maternal plazmadan fetal DNA'nın saptanması zordur. Ek olarak, fetal DNA'nın ölçülmesi tipik olarak Y kromozomuna spesifik dizilere dayanır ve bu da tekniğin kullanımını sadece erkek fetus taşıyan gebelerde kullanılması ile sınırlar. Bu nedenle, bu sınırlamanın üstesinden gelmek için maternal ve fetal DNA (Tsui ve diğ., 2007) ve fetal RhD geni (Cotter ve diğ., 2005) arasındaki farklı epigenetik belirteçlerin, evrensel ve cinsiyetten bağımsız fetal belirteçler olarak kullanılması gibi başka yaklaşımlar kullanılmıştır. Total serbest DNA da kullanılmış ve daha sonra preeklampsisi gelişen kadınlarda total serbest DNA'nın arttığı ve böylece cinsiyet sorununun üstesinden gelindiği bildirilmiştir

(Farina ve diğ., 2004). Ayrıca, plasenta kökenli mRNA'lar da hamile kadınlarda tespit edilmiş ve bu alandaki araştırmalar, yeni biyobelirteçler üretmek için fetal olmayan mRNA'ya odaklanmıştır. MRNA kullanmanın avantajı; plasental/fetal kökenli olması, hamileliğe özgü olması ve fetal cinsiyetten bağımsız olmasıdır. Ng ve diğ., yalnızca plasenta tarafından üretilen proteinler olan insan koryonik gonadotropin ve insan plasenta laktojeni için maternal plazmada mRNA anlatım analizi yapmıştır. Bu proteinlerdeki mRNA anlatımının gebeliğe özgü olduğu ve plasental gen anlatımını kısmen yansıttığı bulunmuştur (Ng ve diğ., 2003).

Purwosunu ve diğ. preeklampitik gebeliklerde 15-20. gebelik haftalarında maternal plazmada plasenta kökenli serbest mRNA panelinin arttığını göstermiştir. %5'lik bir yanlış pozitif oranında, tespit oranı %84 (%95 CI: 71.8–91.5), ROC eğrisi altındaki alan 0.927 ($p < 0.001$) olarak bulunmuştur (Purwosunu ve diğ., 2009). Anne kanında dolaşımdaki fetal hücreler ve hücre dışı fetal nükleik asitlerin kullanımı biyobelirteç çalışmaları için iyi bir araştırma alanıdır.

2.5.4.6. Doppler Velosimetrisi

Preeklampsi, anormal plasenta oluşumu ve maternal uterin arterlerin sitotrofoblast hücreleri tarafından azalmış invazyonu ile karakterize olduğundan maternal uterin spiral arterlerin yüksek akışlı ve düşük dirençli damarlara normal vasküler yeniden yapılanması meydana gelmez. Bu nedenle Doppler ultrasonografi preeklampsi için potansiyel bir prediktif test olarak değerlendirilmiştir.

Çeşitli çalışmalar erken başlangıçlı preeklampsi için uterin Doppler velosimetrisinin tahmin doğruluğunu değerlendirmiştir. Pozitif olasılık oranı 5 ile 20, negatif olasılık oranı ise 0,1 ile 0,8 arasında değişmiştir (Conde-Agudelo ve Romero, 2009). Kullanılan indeks veya indeks kombinasyonlarından bağımsız olarak, uterin arter Doppler velosimetrisi (UADV), erken başlangıçlı preeklampsi gelişimi için orta-iyi bir belirleyici olabilir.

2.5.5. Yeni Biyobelirteçler

İnsan genom projesinin tamamlanmasıyla, aynı anda binlerce genin (genomik), gen transkriptinin (transkriptomik), proteinlerin (proteomik), metabolitlerin (metabolomik), protein etkileşiminin (interaktomik) ve kromatin modifikasyonlarının (epigenomik) tek bir deneyde incelenmesine izin veren çeşitli ileri teknoloji teknikleri geliştirilmiştir. Bu yeni teknolojiler potansiyel DNA, RNA ve protein biyobelirteçlerinin sayısında artışla beraber bu alana duyulan

ilgiyi arttırmıştır. Tek bir biyobelirteç veya sadece birkaçının bir kombinasyonunun analizi; genlerin, RNA'nın veya proteinlerin bir imzasını veren çok parametrelili bir analiz ile değiştirilmektedir. Bu yeni metodolojiler şu anda onkoloji (Quackenbush, 2006; Cho ve Cheng, 2007; Fan ve diğ., 2009), nefroloji (Magnussen ve diğ., 2009), kardiyoloji (Arab ve diğ., 2006; Chen ve diğ., 2008; Ping, 2009) ve diğerleri gibi hemen hemen tüm tıp alanlarında; erken tanı, sınıflandırma, prognoza yardımcı olan kalıpları ayırt etme ve tedavilere verilen cevabın tahmininde kullanılmaktadır.

2.5.5.1. Transkriptomik

Transkriptom, herhangi bir anda RNA'ya (mRNA, tRNA, miRNA ve diğer RNA türlerine) transkripsiyonu yapılan tüm DNA'nın bir tanımıdır. İlgili proteomun oluşması ile sonuçlanan protein sentezi şablonunu oluşturur. Transkriptomik, global bir RNA değerlendirmesini ifade etmektedir.

Farina ve diğ. 6 preeklampsisi hastası ve 30 kontrolden oluşan gebelerin maternal kanında dolaşımdaki 7 mRNA'nın ölçümünü yapmıştır. Vakalar ve kontroller arasında ekspresyon paterninin farklı olduğu rapor edilmiştir. Normotansif kontrollere kıyasla; inhibin A, p-selektin ve VEGF reseptörü mRNA değerleri preeklampside daha yüksek; insan plasental laktojen, KISS-1 ve plazminojen aktivatör tip 1 mRNA değerleri ise daha düşük bulunmuştur (Farina ve diğ., 2006). Yazarlar, preeklampsi kadınlardan alınan serumda plasentaya özgü, dolaşımdaki mRNA'nın anormal kantitatif ifadesinin bu hastalığın tahmini için yararlı olabileceğini öne sürmüşlerdir (Farina ve diğ., 2006). Tsui ve diğ., maternal plazmada plasentaya özgü mRNA belirteçlerinin tanımlanması için mikrodizilim teknolojisinin kullanımını açıklamıştır (Tsui ve Lo, 2008). Fetal/plasental orijinli dolaşımdaki hücreler de potansiyel bir biyobelirteç olarak değerlendirilebilecek bir mRNA kaynağıdır. Okazaki ve diğ. preeklampsinin potansiyel biyobelirteçlerini tanımlamak için maternal kanın hücresel bileşeninde gen anlatım profili ve gerçek zamanlı kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) çalışmalarını gerçekleştirmiştir. Preeklampsisi hastası beş kadından alınan örnekte ve eşleştirilmiş beş kontrol örneğinde mikroarray analizi yapılmış ve bunu preeklampsisi hastası 28 ve kontrol grubu 29 kadının kan örneği ile yapılan RT-qPCR analizi izlemiştir. Preeklampsisi hastası kadınlarda, trofoblast glikoproteini (bir trofoblast membran proteini) ve gebeliğe özgü $\beta 1$ glikoproteini (sinsisyotrofoblastlar tarafından üretilen protein) mRNA'ları artmış ve

gebeliğe özgü $\beta 1$ anlatım seviyeleri ile hastalığın şiddeti arasında doğrudan bir korelasyon olduğu görülmüştür (Okazaki ve diğ., 2007).

MRNA'nın yanı sıra, miRNA'lar gibi küçük RNA molekülleri artık dolaşımdaki yeni belirteçler olarak araştırılmaktadır. MiRNA'lar kısa (19-25 nükleotit uzunluğunda), hedef mRNA'ların 3' anlatım yapmayan bölgelerine bağlanarak gen ekspresyonunu düzenleyen tek iplikli protein kodlamayan RNA'lardır. MiRNA'lar fertilite düzenlemesi de dahil olmak üzere insan dokularında çeşitli genetik yollara katılmaktadırlar (Luense, Carletti ve Christenson, 2009). Pineles ve diğ. (2007) ve Zhu ve diğ. (2009) doğum sırasında elde edilen preeklampatik plasentalarda miRNA'ların ekspresyonunu, normal gebeliklerden elde edilen plasentalarla karşılaştırarak incelemişlerdir. Araştırmacılar iki grup arasında farklı bir anlatım profili gözlemlemiştir. Preeklampsideki risk değerlendirmesi için klinik yararlı bir test minimal invaziv olmalıdır (Conde-Agudelo, Villar ve Lindheimer, 2004). Bu bağlamda plasentaya özgü miRNA'nın maternal dolaşımda salgılandığı (Luo ve diğ., 2009) ve maternal plazma örneğinde saptanabileceği gösterilmiştir (Chim ve diğ., 2008).

2.5.5.2. *Proteomik*

Proteom; bütün bir organizma, hücre, organel, kan, amniyotik sıvı ya da idrar gibi herhangi bir biyolojik materyalde bulunan proteinlerin toplamıdır. Proteomiğin transkriptomiğe göre avantajı; proteinin kendisini, yani gen anlatımının fonksiyonel ürününü ölçmesidir.

Blumenstein ve diğ. (2009), preeklampsisi gelişen ve sağlıklı bir gebeliği olan kadınların 20. gebelik haftalarında plazma proteomlarını karşılaştırmış ve iki grup arasında farklı bir protein paterni olduğunu bildirmiştir. Farklı şekilde anlatımı yapılan proteinler; lipid metabolizmasında, pıhtılaşmada, tamamlayıcı düzenlemede, hücre dışı matriks yeniden düzenlenmesinde, proteaz inhibitör aktivitesinde ve akut faz tepkilerinde rol aldıkları belirtilmiştir.

Buhimschi ve diğ. (2008), hamile kadınların idrarını kullanarak proteomik bir profil çıkarmış ve zorunlu doğum gerektiren ciddi preeklampsisi hastası kadınların benzersiz bir idrar proteomik parmak izine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu karakteristik proteomik profil, klinik belirtilerden 10 haftadan daha önce ortaya çıkmış ve preeklampsiyi hamilelikteki diğer hipertansif veya proteinürik bozukluklardan ayırmıştır. İdrarın proteomik profili, zorunlu

doğum gerektiren preeklampsinin tahmini için P:C (protein:kreatinin) oranı ve sFlt1:PlGF oranından daha iyi sonuç vermiştir (Buhimschi ve diğ., 2008).

2.5.5.3. *Metabolomik*

Metabolomik, biyolojik bir sistemde endojen ve salgılanan metabolitlerin geniş çaplı analizi olarak tanımlanmaktadır. Proteomikte olduğu gibi, insan metabolom çalışmaları, idrar, plazma veya serumun rutin numuneleri üzerinde yapılabilir ve minimal numune hazırlığı gerektirir. Metabolomiğin bir avantajı, proteoma kıyasla daha küçük ve daha izlenebilir bir bileşikler grubunu içermesidir.

Bir ön çalışma, metabolomik stratejilerin trofoblast dokusunun veya plasental dokunun metabolik fonksiyonunu araştırmak ve değişen çevresel koşullara cevaben değişiklikleri değerlendirmek için uygun olabileceğini ortaya koymuştur. Heazell ve diğ. plasental metabolomu farklı oksijen oranları altında incelemiştir (Heazell ve diğ., 2008). Plasental villus eksplantları 96 saat boyunca %1, 6 ve 20 oksijende kültürlenmiş ve yeni redoks biyobelirteçlerini ortaya çıkarmıştır (Heazell ve diğ., 2008). Aynı grup, preeklampitik eksplantlardan elde edilen besi ortamının komplike olmayan gebeliklerden elde edilen besi ortamı ile karşılaştırıldığında farklı bir metabolik parmak izine sahip olduğunu göstermiştir (Dunn ve diğ., 2009). Metabolomik stratejiler plazmaya da uygulanmış ve preeklampitik gebeliklerin normal gebeliklerle karşılaştırıldığında farklı bir metabolomik profile sahip olduğu bulunmuştur (Kenny ve diğ., 2008). Metabolit pik değişkenlerinin üçü kullanarak preeklampsi, %100 duyarlılık ve %98 özgüllük ile sağlıklı gebe kontrollerinden ayırt edilebilmektedir (Kenny ve diğ., 2005). Gebeliğin erken döneminde preeklampsiyi öngörmeye metabolomiği kullanmak için, Kenny ve diğ. iki fazlı bir keşif/doğrulama metabolik profil çalışması kullanmış ve 0.92'lik AUC değeri ile tüm preeklampsiyi öngören 14 metabolitin varlığını gözlemlemiştir (Kenny ve diğ., 2010).

Hastalığın varlığını öngörmeye ek olarak, bir biyobelirteç ayrıca hastalık ciddiyeti, prognoz ve terapötiklere yanıtın bir göstergesi olarak da kullanılabilir. Bu bağlamda, plasentanın gen ekspresyon profilinin preeklampsi ve komplike olmayan gebelikler ile erken ve geç başlangıçlı preeklampsi arasında farklı olduğu gösterilmiştir (Nishizawa ve diğ., 2007; Sitras ve diğ., 2009). Buna göre, preeklampsi hastası kadınlarda plasentanın (Jin ve diğ., 2008), amniyotik sıvının (Joong Shin Park ve diğ., 2008), plazmanın (Watanabe ve diğ., 2004) ve idrarın

(Buhimschi ve diğ., 2008) proteomik analizleri normal kontrollerden farklı proteomik profiller ortaya koymuştur. Diğer biyobelirteçler için bildirilene benzer şekilde, bu sonuçlar gelecekteki karmaşık durumlarda preeklampsiyi ortadan kaldırmak, hastalığı ciddiyet açısından sınıflandırmak ve prognozunu değerlendirmek için genomik ve proteomik stratejiler uygulama olasılığını vurgulamaktadır. Ek olarak, bu teknoloji işlemsel (“*computational*”) biyologlar tarafından çıkarılabilecek çok büyük bir veri tabanı oluşturabilir ve hastalığın mekanizmasına yeni bakış açıları getirebilecek yeni yollar ve moleküller sağlayabilir. Ayrıca, preeklampsi biyolojisini çözme çabalarını hızlandıracak ve sonuçta yeni tedavilere yol açacak olan hipotez odaklı araştırmaları teşvik edecektir.

2.6. MİKRORNA (MİRNA)

İlk mikroRNA (miRNA) *lin-4*’ün, *Caenorhabditis elegans*’ta 1993 yılında Ambros ve Ruvkun grupları tarafından keşfedilmesi moleküler biyoloji alanında devrim yaratmıştır (Lee, Feinbaum ve Ambros, 1993; Wightman, Ha ve Ruvkun, 1993). Yıllar önce *lin-4*, Horvitz’in laboratuvarında *C. elegans* larvalarının zamansal gelişimini düzenleyen genlerden biri olarak nitelendirilmiştir (Horvitz ve Sulston, 1980; Chalfie, Horvitz ve Sulston, 1981). Hem Ambros hem de Ruvkun, Horvitz’in laboratuvarından ayrıldıktan sonra *lin-4* ve *lin-14* çalışmalarına devam etmiş, ancak daha sonra *lin-4*’ün protein kodlayan bir RNA olmadığını, aslında küçük bir kodlama yapmayan RNA olduğunu keşfetmişlerdir (Lee, Feinbaum ve Ambros, 2004; Almeida, Reis ve Calin, 2011). Ayrıca *lin-14*’ün transkripsiyon sonrası aşamada 3’ anlatım yapmayan bölgede (“*untranslated region*”) (UTR) anlatımının azaldığını ve *lin-4*’ün *lin-14*’ün 3’ UTR’sinin tamamlayıcı bir dizisine sahip olduğunu da bulmuşlardır (Lee, Feinbaum ve Ambros, 1993). Bu nedenle, *lin-4*’ün transkripsiyon sonrası seviyede *lin-14*’ü düzenlediğini öne sürmüşlerdir (Wightman, Ha ve Ruvkun, 1993). O zamandan beri miRNA’lar tüm hayvan modeli sistemlerinde tespit edilmiş ve bazılarının türler arasında yüksek oranda korunduğu gösterilmiştir (Pasquinelli ve diğ., 2000; Davis ve Hata, 2010; Li ve diğ., 2010; Friedländer ve diğ., 2014). Yeni miRNA’lar hala keşfedilmektedir ve gen düzenlemesindeki rolleri iyi bilinmektedir (de Rie ve diğ., 2017).

MiRNA’lar, ortalama 22 nükleotit uzunluğunda kodlama yapmayan küçük RNA’lardır. Çoğu miRNA, DNA dizilerinden önce birincil miRNA’lara (pri-miRNA’lar) transkribe edilir ve ardından öncül miRNA’lara (pre-miRNA’lar) ve olgun miRNA’lara işlenir. Çoğu durumda,

miRNA'lar anlatımı baskılamak için hedef mRNA'ların 3' UTR'si ile etkileşime girer (Ha ve Kim, 2014a). Bununla birlikte; miRNA'ların 5' UTR, kodlama dizisi ve gen promotörleri dahil diğer bölgelerle etkileşimi de rapor edilmiştir (Broughton ve diğ., 2016). Ayrıca, miRNA'ların belirli koşullar altında gen anlatımını aktive ettiği gösterilmiştir (Vasudevan, 2012). Son dönemlerde yapılan çalışmalar, miRNA'ların translasyonu ve hatta transkripsiyonu kontrol etmek için farklı hücre içi bölümler arasındaki hareketini ileri sürmektedir (Makarova ve diğ., 2016).

MiRNA'lar normal hayvan gelişimi için kritik öneme sahiptir ve çeşitli biyolojik işlemlere katılmaktadır (Fu ve diğ., 2013). MiRNA'ların anormal anlatımı birçok insan hastalığı ile ilişkilidir (Tüfekci ve diğ., 2014; Paul ve diğ., 2018). Ek olarak, miRNA'lar hücre dışı sıvılara salgılanmaktadır. Hücre dışı miRNA'lar çeşitli hastalıklar için potansiyel biyobelirteçler olarak geniş çapta araştırılmakta ve ayrıca hücre-hücre iletişimine aracılık etmek için sinyal molekülleri olarak da görev yapmaktadırlar (Hayes, Peruzzi ve Lawler, 2014; Wang, Chen ve Sen, 2016; Huang, 2017).

2.6.1. MikroRNA Biyogenezi

MiRNA biyogenezi; RNA polimeraz II/III transkriptlerinin, transkripsiyon sonrasında ve transkripsiyon sırasında işlenmesiyle başlar (Ha ve Kim, 2014b). Hali hazırda tanımlanmış tüm miRNA'ların yaklaşık yarısı intrageniktir ve çoğunlukla intronlardan ve nispeten az sayıda protein kodlayan gen ekzonundan işlenirler. Diğer miRNA'lar ise intergeniktir, bir konakçı geninden bağımsız olarak kopyalanır ve kendi promotörleri tarafından düzenlenir (Kim ve Kim, 2007; de Rie ve diğ., 2017). Bazen miRNA'lar, benzer tohum bölgelerine sahip olabilecek kümeler adı verilen uzun bir transkript olarak kopyalanır ve bu durumda bir aile olarak kabul edilir (Tanzer ve Stadler, 2004). MiRNA'nın biyolojik oluşumu kanonik ve kanonik olmayan yollara sınıflandırılır.

Kanonik biyogenez yolu, miRNA'ların işlendiği baskın yoldur. Bu yolda, pri-miRNA'lar genlerinden kopyalanır ve daha sonra bir RNA bağlayıcı protein “*DiGeorge Syndrome Critical Region 8*” (DGCR8) ve bir ribonükleaz III enzimi olan Drosha'yı içeren mikroişlemci kompleksi tarafından pre-miRNA'lara işlenir (Denli ve diğ., 2004). Pre-miRNA'lar üretildikten sonra, bir exportin 5 (XPO5)/RanGTP kompleksi tarafından sitoplazmaya taşınır ve daha sonra bir RNaz III endonükleaz olan Dicer tarafından işlenir (Denli ve diğ., 2004; Okada ve diğ.,

2009). Bu işlem, terminal halkanın çıkarılmasını gerektirir ve bu da bir olgun miRNA dupleksinin oluşmasıyla sonuçlanır (Zhang ve diğ., 2004). MiRNA dizisinin yönü, olgun miRNA formunun adını belirler. 5p zinciri pre-miRNA saç tokasının 5' ucundan, 3p zinciri ise 3' ucundan meydana gelir. Olgun miRNA dupleksinden meydana gelen her iki zincir de ATP bağımlı yolla Argonaute (AGO) protein ailesine (insanlarda AGO1-4) bağlanabilir (Yoda ve diğ., 2010). Herhangi bir miRNA için, AGO-bağı 5p veya 3p zincir oranı, hücre tipine veya hücresel ortama bağlı olarak büyük ölçüde değişmektedir. Miktarları eşit olabilir ya da biri diğerine göre daha fazla miktarda olabilir (Meijer, Smith ve Bushell, 2014). 5p veya 3p dizisinin seçimi, kısmen miRNA dupleksinin 5' uçlarındaki termodinamik stabiliteye veya 1. pozisyonundaki nükleotiddeki 5' U'ya dayanmaktadır (Khvorova, Reynolds ve Jayasena, 2003).

Bugüne kadar, birçok kanonik olmayan miRNA biyogenez yolu açıklanmıştır. Bu yollar, kanonik yoldaki proteinlerin, özellikle Drosha, Dicer, exportin 5 ve AGO2'nin farklı kombinasyonlarını kullanır. Genel olarak, kanonik olmayan miRNA biyogenez, Drosha/DGCR8'den bağımsız ve Dicer'den bağımsız yollar halinde gruplandırılabilir (Ruby, Jan ve Bartel, 2007; Babiarz ve diğ., 2008).

2.6.2. MikroRNA Fonksiyonu ve Regülasyonu

MiRNA'ların, mRNA'yı yıkıma uğratmak ve translasyonu baskılamak için 5' terminal tohum sekanslarının ("*seed sequence*") (2-8 nükleotid) mRNA'nın 3' UTR'si ile eşleşebileceği ve transkripsiyon sonrası düzenleyici moleküller oldukları yaygın olarak kabul edilmektedir (Beermann ve diğ., 2016). MiRNA, hedef mRNA'sı ile tamamen baz eşleşmesi yaptığında, hedef mRNA'daki tek bir fosfodiester bağı mRNA'yı yıkıma uğratmak için doğrudan ayrılabilir. 3' UTR'de çoklu bölgelere tamamen tamamlayıcı olmadığında ise protein sentezi inhibe edilir (Beermann ve diğ., 2016). Son yıllarda, araştırmalar mRNA'nın yıkılması ve translasyon baskılamasının yakından bağlantılı olaylar olduğunu ve miRNA aracılı gen susturma işleminin erken aşamada translasyonu engellediğini göstermiştir (Djuranovic, Nahvi ve Green, 2012). MiRNA'lar hücre çoğalmasında, anjiyogenezde, immün hücre gelişiminde ve çeşitli organ sistemlerinin gelişiminde önemli bir rol oynamakta ve miRNA anormallikleri meme kanseri, akciğer kanseri, mide kanseri, yumurtalık kanseri ve lenfoma gibi birçok kanserde bulunmaktadır (Bhaskaran ve Mohan, 2014).

2.6.3. Preeklampsi’de mikroRNA’ların Rolü

Preeklampsi hastalarında değişmiş miRNA ifadeleri çalışmalarla ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte, PE patogenezindeki rolleri henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Biyolojik bilgi analizi PE'deki farklılaşan miRNA'ların metabolik değişiklikler; transkripsiyonel düzenleme; kardiyovasküler ve üreme gelişimi; bağışıklık fonksiyonu; hücre döngüsü; hücre adezyonu; ve MAP kinazlar, “*transforming growth factor-beta*”, Hippo ve mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) sinyallenmesini içeren ilişkisel sinyal yollarında yer aldıklarını göstermektedir (Enquobahrie ve diğ., 2011; Wu ve diğ., 2012; Luo ve diğ., 2017). PE'de miRNA'nın fonksiyonlarının ve mekanizmalarının keşfi aşağıdaki gibi özetlenebilir.

Daha önce bahsedildiği gibi, PE'nin belirgin özelliklerinden biri yetersiz trofoblast invazyonudur. Anormal biçimde ifade edilen bazı miRNA'lar çoğunlukla trophoblast invazyonunu düzenlemeye odaklanmaktadır. Çalışmalar, miR-195 (Bai ve diğ., 2012), miR-376c (Fu, Ye, ve diğ., 2013) ve miR-378a-5p'nin (Luo ve diğ., 2012) HTR8/SVneo hücrelerinin çoğalmasını ve invazyonunu teşvik edebileceğini göstermiştir ve bu miRNA'ların aktivin A tip II reseptörü (ACVR2A) (Bai ve diğ., 2012), aktivin reseptörü benzeri kinaz 5 (ALK5), ALK7 (Fu, Ye, ve diğ., 2013) ve Nodal (Luo ve diğ., 2012) gibi farklı hedefleri bulunmaktadır. Buna karşılık miR-299 (Gao ve diğ., 2018), miR-181a-5p (Wu ve diğ., 2018) ve miR-134 (Zou ve diğ., 2018); histon deasetilaz 2 (HDAC2) (Gao ve diğ., 2018), insülin benzeri büyüme faktörü 2 mRNA-bağlayıcı protein 2 (IGF2BP2) (Wu ve diğ., 2018) ve integrin $\beta 1$ 'i (ITGB1) (Zou ve diğ., 2018) hedef alarak trofoblast hücre invazyonunu ve göçünü önlemektedir. Preeklampitik plasentadaki anlatımı artmış miR-29b; miyeloid hücre lösemi sekansı 1, matriks metaloproteinaz 2, VEGFA ve integrin $\beta 1$ 'in 3' UTR bölgesine direkt olarak bağlanarak trofoblastik apoptozu ve trofoblast invazyonunun baskılanmasını indükleyebilmektedir (Li, Guo ve et., 2013). Benzer şekilde, PE plasentada miR-20a'nın aşırı anlatımı, “*Forkhead box protein A1*” (FOXA1)'in doğrudan düzenlenmesi yoluyla JEG-3 hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunu önemli ölçüde inhibe edebilmektedir (Wang ve diğ., 2014). MiR-30a-3p (Niu ve diğ., 2018) ve miR-4421 (Gao, Li ve Wei, 2018) de trofoblastların fonksiyonunu olumsuz etkileyebilmekte ve PE gelişimini düzenlemektedir.

PE'de çeşitli anjiyogenez ile ilişkili faktörlerin anlatımlarının düzenlenmesinde birçok miRNA rol oynayabilir. PE hastası gebe kadınlarda anlatımı artmış miR-195-5p, yüksek sFLT-1 seviyesi (Sandrim, Eleuterio, ve diğ., 2016) ve azalmış VEGF anlatımına (Sandrim, Dias, ve

diğ., 2016) eşlik etmektedir. MiR-20b, Ephrin-B2 ve Eph reseptörü B4'ü hedef alarak insan göbek kordonu endotel hücreleri ve trofoblastlarında hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF) 1A, matris metalloproteinaz 2 ve VEGFA'nın ekspresyonunu etkileyebilir (Wang ve diğ., 2012). MiR-346 veya miR-582-3p'nin aşırı anlatımı, trofoblastlarda VEGF seviyesini önemli ölçüde azaltabilir (Su ve diğ., 2017). MiR-126 ve VEGF mRNA'sının anlatımı arasında pozitif bir korelasyon bulunmakta ve miR-126'nın anlatımının azalması VEGF anlatımını önemli ölçüde azaltmaktadır (Hong, Li ve Xu, 2014). Mevcut araştırmalar, plasenta spesifik miRNA'ların insan villöz trofoblast hücreleri tarafından anlatımlarının yapıp daha sonra eksozomların içinde maternal dolaşıma salınabileceğini göstermektedir. Bu miRNA'ların dolaşıma salınması plasental implantasyon anormalliklerinin nasıl sistemik vasküler fonksiyon bozukluklarına yol açtığını kısmen açıklayabilmektedir (Luo ve diğ., 2009). Diğer çalışmalar, PE'de anormal şekilde anlatımı yapılan miRNA'ların, göbek kordonu endotel hücrelerinin kılcal damar oluşturma kapasitesini etkileyebileceğini bulmuşlardır (Chen ve diğ., 2015).

PE desidua'lardaki MKH'lerde yüksek miR-494 seviyeleri, MKH'lerde G1/S geçişini önleyebilir ve siklin bağımlı kinaz 6 (CDK6) ve siklin D1'i hedef alarak MKH çoğalmasını etkileyebilir (Chen ve diğ., 2015). MiR-494'ün aşırı anlatımına sahip olan desidual MKH'ler, PGE2 salgılanmasının azalması aracılığı ile PE'de maternal-fetal arayüzde bir immün dengesizliğe yol açarak makrofajların M2 polarizasyonunu inhibe etmektedir (Zhao ve diğ., 2016). Benzer şekilde, miR-181a'nın göbek kordonu ve desidua kökenli MKH'lerde anlatımı PE hastalarında artmış ve MKH'lerin çoğalmasını önleyebilmiştir; ancak, apoptozu etkilememiştir (Liu ve diğ., 2012). Ayrıca, anlatımı artmış miR-495, MKH apoptozunu teşvik edebilmekte ve hücrel yaşlanmaya neden olabilmektedir (Li ve diğ., 2017). Kontrol grubu olarak MKH ile tedavi, dekstran sülfat sodyum kaynaklı deneysel kolit geliştirirken, miR-181a transfeksiyonu ile tedavi edilen grup, benzer sonuçlar göstermemiştir. Bu durum miR-181a'nın, *in vivo* olarak MKH'lerin immünosüpresif özelliklerini azaltabildiğini göstermektedir (Liu ve diğ., 2012).

2.6.4. MikroRNA Tespitinde Kullanılan Yöntemler

MiRNA'lar, memeli hücrelerinde gelişme, hücrel çoğalma ve farklılaşma gibi çeşitli biyolojik işlemlerde kritik düzenleyici rol oynayan küçük kodlayıcı olmayan RNA'lardır (yaklaşık 18-24 baz) (Lee, Feinbaum ve Ambros, 1993; Farh ve diğ., 2005; Lim ve diğ., 2005). MiRNA ekspresyon düzeyi, hastalıkların ortaya çıkması ve gelişmesi ile yakından ilişkilidir (Esquela-

Kerscher ve Slack, 2006; Tavazoie ve diğ., 2008). Bu nedenle miRNA tespiti, biyolojideki temel araştırmalar ve hastalıkların moleküler tanı ve tedavisi için çok önemlidir. Ancak; küçük boyut, doku ve hücrede düşük içerik, miRNA ailesini oluşturan miRNA'lar arasındaki dizi benzerlikleri gibi özellikler saptama yöntemlerini zorlaştırmaktadır. Geleneksel miRNA saptama metotları esas olarak “*northern-blotting*”, mikrodizilim, in situ hibridasyon (ISH), polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), ligaz zincir reaksiyonu (LZR), yuvarlanan daire amplifikasyonu (“*rolling circle amplification*” (RCA)), üstel izotermal amplifikasyon reaksiyonu (“*exponential isothermal amplification reaction*” (EXPAR)), nükleaz destekli çoğaltım ve nanomateryal tabanlı saptama vb. teknikler dahil nükleik asit çoğaltım teknikleridir (Dong ve diğ., 2013; Hunt ve diğ., 2015; Graybill ve Bailey, 2016). Son yıllarda, miRNA araştırmalarının artmasıyla birlikte, miRNA'nın tespiti için pek çok yöntem duyarlılık, özgüllük, çeşitlilik ve yerinde görüntüleme vb. açısından geliştirilmiştir. Ayrıca, nükleik asit çoğaltımına dayalı yöntemler hızla geliştirilmiş ve damlacıklı dijital PZR (ddPZR) (Pinheiro ve diğ., 2012; Miotke ve diğ., 2014), elektrokimyasal ışıma (ECL) (Cheng ve diğ., 2014), yüzey arttırılmış raman spektroskopisi (“*surface-enhanced raman spectroscopy*” (SERS)) (Zhou ve diğ., 2017) ve kütle spektrometrisi (MS) (de Bang ve diğ., 2014; Kullolli ve diğ., 2014) gibi tespit tekniklerinin birçoğu kullanılmış ve miRNA'ların son derece hassas belirlenmesi için amplifikasyon teknikleri ile bir araya getirilmiştir.

2.6.4.1. Northern Blotting

"*Northern blotting*", gen anlatımını ölçmek için iyi kurulmuş ve sağlam bir yöntemdir. İlk miRNA çalışmasından bu yana geleneksel ve standart bir yöntem olmuştur (Lagos-Quintana ve diğ., 2001; Bagga ve diğ., 2005; Lim ve diğ., 2005). Bununla birlikte, "*northern blotting*" genellikle çoklu yıkama prosedürlerinin yanı sıra; poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile ayırıştırma, membrana transfer ve radyoaktif işaretli oligonükleotid problemleri ile tespit edilmesini gerektirir. Hem miRNA hem de pre-miRNA'nın tespit edilmesine izin veren tek yöntemdir. Ancak zaman alıcıdır ve çok miktarda RNA gerektirir (genellikle 10-15 µg) (van Rooij, 2011). "*Northern blotting*"in karmaşık prosedürleri ve düşük hassasiyeti, kullanımını sınırlamaktadır. Bu nedenle, "*northern blotting*" tabanlı miRNA tespitini iyileştirmek için çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. Literatürde radyoaktif veya radyoaktif olmayan etiketli LNA (“*locked nucleic acid*”) içeren “*Northern blot*” problemleri kullanan birkaç metod bulunmaktadır (Várallyay, Burgyán ve Havelda, 2008; Obad ve diğ., 2011; van Rooij, 2011). MiRNA tespitinde LNA ile

modifiye edilmiş “*Northern blot*” problemleri kullanılması DNA oligonükleotidi kullanmaktan 10 kat daha hassas ve spesifik olduğu görülmüştür (Valoczi ve diğ., 2004).

2.6.4.2. Mikrodizilim

MiRNA profili, normal ve hastalıklı dokularda olduğu gibi farklı türlerde ve farklı organlarda veya aynı türdeki dokularda da miRNA'ların ekspresyon seviyelerini kapsamlı bir şekilde karşılaştırabilmektedir (Yin, Zhao ve Morris, 2008; Pritchard, Cheng ve Tewari, 2012). MiRNA mikrodizilimi, miRNA profillemesi analizini gerçekleştirmek için önemli bir tekniktir. MiRNA mikrodizilim analizi, genellikle yüksek yoğunluklu bilinen DNA prob dizisinin cam veya naylon membran gibi katı destek üzerine sabitlenmesi ile gerçekleştirilir, daha sonra hedef miRNA'lar ve bunlara karşılık gelen tamamlayıcı problemler arasındaki nükleik asit hibritleşmesine dayanan çeşitli miRNA hedef molekülleri ile etkileşime girer ve hibridizasyon problemlerinin sinyal yoğunluğu tespit edilir. Mikrodizilim aynı anda yüksek verim ve çoklu miRNA analizini gerçekleştirebilir. Ancak, mikrodizilimin üretim ve tespit maliyeti yüksektir. MiRNA'nın tespiti için duyarlılık, mikrodizilim için uygun örnek miktarının az olması nedeniyle nispeten düşüktür. Mikroarray yönteminin seçiciliği, kısa miRNA dizisi ve yüksek dizi benzerliği nedeniyle zayıftır. Bu nedenle, miRNA mikrodizi analizi için floresan, kemilüminesan, nanoparçacık bazlı ve elektrokimyasal tespit gibi hassas ve spesifik bir yöntem veya tekniğin kullanılması çok önemlidir (Nelson ve diğ., 2004; Fang ve diğ., 2006; Fan ve diğ., 2007; Cissell ve diğ., 2008).

2.6.4.3. Damlacıklı Dijital PZR

Damlacıklı Dijital PZR (ddPZR) teknolojisi, su-yağ emülsiyon damlacık sistemini kullanan dijital bir PZR yöntemidir. DdPZR Sistemi nükleik asit örneklerini binlerce nanolitre boyutlu damlacıklara böler ve her damlacıkta PZR reaksiyonu gerçekleştirilir. Bir kuyucuktaki reaksiyon 20.000 damlacığa bölünür ve şablon moleküllerin PZR çoğaltımı her bir damlacıkta gerçekleşir. Damlacıklar, esasen PZR reaksiyonunun gerçekleştiği bir “plate”teki ayrı test tüpleri veya kuyucuklar ile aynı işlevi görür. Ancak daha küçük bir formattadır. On binlerce damlacık oluşturulması, tek bir numunenin tek bir sonuçtan ziyade on binlerce veri noktası üretebileceği ve dijital PZR'deki pratik analizin gücünü pratik uygulamaya getirdiği anlamına gelir. Örneklerin binlerce damlacığa bölünmesi ddPZR tekniğinin kilit bir özelliğidir. DNA örneği her bir damlacığa rastgele miktarlarda dağılır. Bu teknik, maliyeti düşüren ve değerli

örnekleri koruyarak ticari olarak temin edilebilen diğer dijital PZR sistemlerinden daha küçük bir numune gereksinimine sahiptir. DdPZR teknolojisi, daha düşük numune ve reaktif hacimleri kullanan ve dijital PZR'nin belirleyici özellikleri olan duyarlılığı ve hassasiyeti korurken diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında toplam maliyeti azaltan daha yüksek verimli dijital PZR sağlar (Hindson ve diğ., 2011).

DdPZR, qPZR ile karşılaştırıldığında daha yüksek hassasiyete sahip PZR bazlı mutlak bir ölçüm tekniğidir. DdPZR, qPZR ile aynı primerleri ve problemleri kullanır, ancak daha yüksek hassasiyet sağlayabilir. QPZR'de, gen ifadesi farklılıkları veya 2 kattan küçük kopya sayısı değişiklikleri ayırt edilemez. Frekansları yaklaşık %1'den az olan alelleri belirlemek zordur. Çünkü benzer dizilere sahip oldukça bol ortak alelleri de tespit eder. ddPZR, gen ifadesindeki daha küçük farklılıkları ölçebilir ve binde bir frekansta bulunan alelleri tanımlayabilir (Manoj, 2014). Kanser ve viral enfeksiyonlar ile yapılan çeşitli çalışmalar qPZR ile kıyaslandığında ddPZR'nin duyarlılığının ve hassasiyetinin daha yüksek olduğunu göstermiştir (Kim, Jeong ve Cho, 2014). Bu avantajın asıl nedeni, reaksiyonların tek tek bölümlendirilebilmesidir (Hindson ve diğ., 2011). Geleneksel qPZR ile kıyaslandığında ddPZR teknik olarak çok daha basittir ve eşik değerlerini yorumlayabilmek için standart dilüsyon eğrilerine gerek duyulmamaktadır (Wiencke ve diğ., 2014). Bu nedenle qPZR ile tespit edilemeyen biyolojik ve translasyonel potansiyele sahip düşük düzeyde anlatım yapan genlerin varlığı ddPZR ile saptanabilmektedir. Ayrıca, ddPZR'nin diğer bir üstünlüğü de mutlak ölçüm ("*absolute quantitation*") sağlamasıdır. qPZR yöntemi ile tespit edilemeyen hedefleri tespit etmek için ddPZR kullanılması çalışmalara avantaj sağlamaktadır (Takahashi ve diğ., 2014). DdPZR'den daha kesin sonuç alınmasındaki en önemli özellik metot sağlamlığından ("*robustness*") kaynaklanmaktadır. QRT-PZR ddPZR'ye göre daha yüksek bir dinamik aralığa sahiptir ancak ddPZR örnekler arasındaki en küçük değişiklikleri bile saptamaya olanak sağlamaktadır. DdPZR qRT-PZR'nin aksine, düşük PZR verimliliği karşısında daha dirençlidir. qRT-PZR ile karşılaştırıldığında ddPCZR'nin daha düşük bir dinamik aralığı olması bir dezavantajdır (Jahn ve diğ., 2014). DdPZR'de yüksek verimlilik daha düşük maliyetlerde mümkündür (Kim, Jeong ve Cho, 2014). DdPZR sisteminde, hedefler floresan bazlı problemler kullanılarak çoğaltılır ve tespit edilir. Hedefin en az bir kopyasını içeren pozitif (1) damlacıklar, negatif (0) damlacıklara göre daha fazla floresan sergiler. DdPCR Sisteminde, QuantaSoft™ Yazılımı, her bir numunedeki her florofor için (örneğin, FAM ve HEX veya VIC) pozitif ve negatif olan damlacıkların sayısını belirler. Ardından, yeterli seyreltmeler ile standart bir eğriye ihtiyaç duyulmadan Poisson istatistikleri

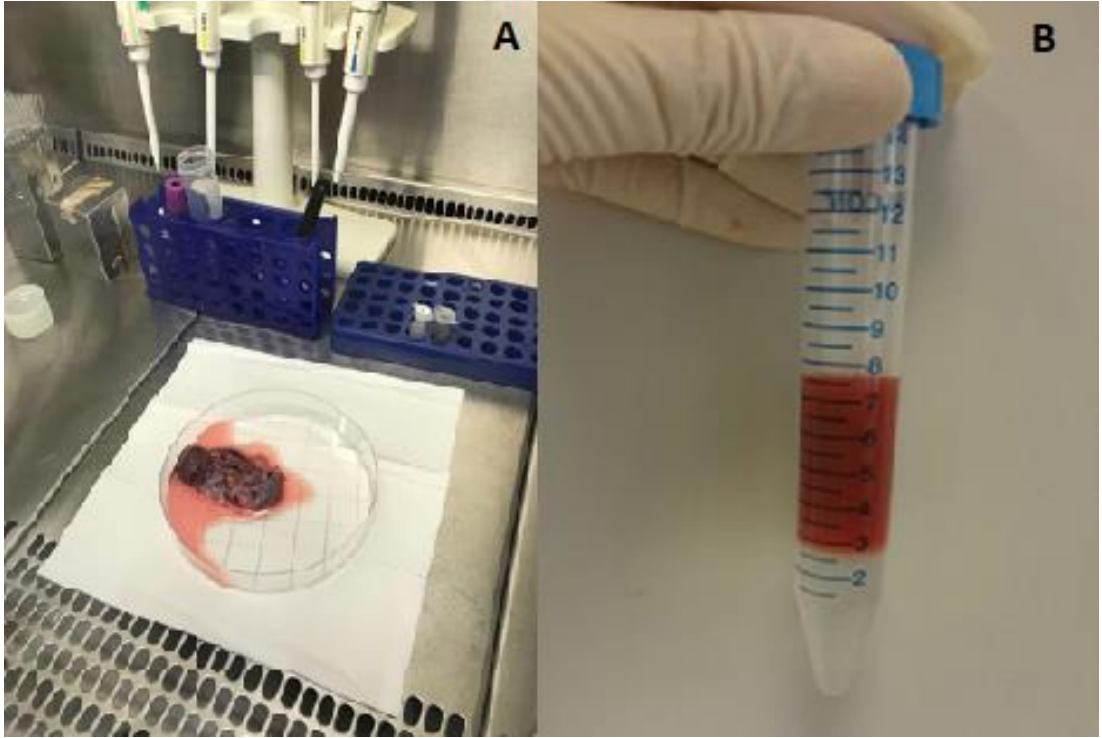
kullanılarak analiz edilir (Wiencke ve diğ., 2014). Bu metod analizin daha uygulanabilir ve tekrarlanabilir olmasına olanak sağlamaktadır (Usmani-Brown ve diğ., 2014). Teorik olarak ddPZR, tek bir hedef molekülün saptanabilmesine olanak sağlamaktadır ve bu nedenle yüksek hassasiyete sahip bir metottur (Jahn ve diğ., 2014). DdPZR, düşük RNA miktarına sahip hedeflerde bile gen anlatımının saptanmasına olanak sağlar (Takahashi ve diğ., 2014). ddPZR'nin nükleik asit miktar tayininde kullanılmasının temel sebebi qPZR'nin aksine, harici kalibratör kullanımına gerek duyulmaması ve enzim inhibisyonuna yol açacak maddeleri tolere edebilmesidir (White ve diğ., 2009; Dingle ve diğ., 2013).

DdPCR, faj-konak etkileşimi çalışmaları (Tadmor ve diğ., 2011), fetal tarama (Lo ve diğ., 2007), biyobelirteç analizi (Day, Dear ve McCaughan, 2013), viral saptama (Shen ve diğ., 2011), prognostik izleme (Belgrader ve diğ., 2013), hücre içi profillem (Sindelka ve diğ., 2008), gıdalardaki GDO'nun tespiti (Morisset ve diğ., 2013), yüksek verimli dizileme (White ve diğ., 2009), Alzheimer hastalığında mitokondrial DNA değişimi (Podlesniy ve diğ., 2013) ve mitokondriyal DNA mutasyonları (Taylor ve diğ., 2014) çalışmalarında kullanılmaktadır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA GRUPLARI

İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi’nde uzman hekim tarafından Preeklampsi tanısı koyulan ve sağlıklı olarak değerlendirilen gebelerden sezaryen ameliyatı sırasında alınan desidua parçası %1 antibiyotik-antimikotik içeren HBSS 1X (“*Hank's Balanced Salt Solution*”) (GIBCO®) solüsyonu içeren 50 mL’lik falkon tüp içine alındı. Ameliyattan hemen önce ise yine uzman hekim tarafından 10 mL periferik kan mor kapaklı BD Vacutainer® K2E (EDTA) tüplerine alındı. Örnekler Şekil 3.1’de gösterildi. Çalışmamızın etik kurul izni İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’ndan 09.06.2017 – 219819 tarih ve sayılı karar ile alındı ve 06.09.2018 – 52166 tarih ve sayılı kararı ile güncellendi. Alınan örnekler oda sıcaklığında taşınarak Koç Üniversitesi Translasyonel Tıp Araştırma Merkezi (KUTTAM)’ne transfer edildi.



Şekil 3.1: PE hastası ve sağlıklı gebelerden alınan desidua (A) ve kan (B) örnekleri.

3.2. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KÜLTÜRÜ

3.2.1. Besiyeri Hazırlama

Aşağıda maddeler halinde sıralanan malzemeler sırası ile steril cam şişede birleştirilip karıştırıldı ve son hacim dH₂O ile 1000 mL'ye tamamlandı. Elde edilen solüsyon filtre ile sterilize edildi.

1. 800 mL dH₂O
2. “*Dulbecco's Modified Eagle Medium*” (DMEM)/F-12 1:1 (Gibco®, UK) tozu
3. 1,2 g Sodyum Bikarbonat
4. 10 mL Penisilin-Streptomisin (PS), (10000 Unit/mL Penisilin, 10000 µg/mL Streptomisin), (Gibco®, UK)
5. 20 mL L-glutamin (Gibco®, UK)
6. 100 mL “*Fetal Bovine Serum*” (FBS) (Gibco®, UK)

3.2.2. Desiduadan Mezenkimal Kök Hücre Kültürü

1. Placenta örneği hemen HBSS solüsyonu içinden alındı ve kandan arındırılması için “*Phosphate Buffered Saline*” (PBS) ile birkaç kez yıkandı.
2. Daha önce hazırlanan besi yeri (DMEM/F-12 %10 FBS, %1 PS, %2 L-glu) %0,4 kollajenaz içerecek şekilde 40 mL hazırlandı.
3. Placenta bistüri ve pens yardımı ile 1 mm³ boyutunda parçalara kesildi.
4. Küçük parçalara ayrılan doku parçaları 50 mL'lik falkon tüp içerisine alındı, üzerine enzim solüsyonu eklendi ve karıştırıldı. Ardından karışım 37°C su banyosunda, çalkalayıcı üzerinde iyice homojen parçalanma görülene kadar yaklaşık 2 saat bekletildi.
5. Parçalanma aşamasından sonra enzimli hücre solüsyonu üçe bölündü ve üzerine iki katı kadar “*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*” (DPBS) (Gibco®, UK) eklenip ve karıştırıldı.
6. Elde edilen solüsyon 350 g, +4°C'de 20 dk santrifüj edildi.

7. Pellet ve süpernatant ayrı ayrı ekildi.

8. Süpernatant T75 kültür kabına ekildi ve üzerine gereken miktarda besi yeri eklendi.

9. Pellet hazırlanan besi yeri ile süspanse hale getirildi ve kültür kaplarına (2 x 100 mm) ekilerek 37°C inkübatöre kaldırıldı.

3.2.3. Periferel Kandan Mezenkimal Kök Hücre Kültürü

1. 10 mL kan 50 mL'lik falkona aktarıldı.

2. 1:3 oranında sulandırmak için üzerine 20 mL “*Roswell Park Memorial Institute*” (RPMI) (Gibco®, UK) besi yeri eklendi ve karıştırıldı.

3. 15 mL'lik falkonlara 3'er mL “*Ficoll™ Paque Premium*” (GE Healthcare) solüsyonu eklendi ve ardından üzerine 4'er mL kan yavaşça eklendi. Başlangıçta iki farkı faz oluşması için kanı yavaş eklemek önemlidir.

4. Elde edilen karışım 400 g, +4°C'de 30 dk santrifüj edildi.

5. Örnekler santrifüjden dikkatlice, oluşan fazları bozmadan alındı.

6. Tüm falkonlarda ortada bulunan bulutsu görünümdeki faz tek bir falkona toplandı.

7. Topladığımız faz üzerine 8 mL DPBS eklendi ve 400 g, +4°C'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve bu işlem tekrarlandı. Bu aşama yıkama aşaması olup, Ficoll'ü uzaklaştırmak için yapıldı.

8. Elde edilen pellet üzerine 2 mL besi yeri eklendi ve oluşan hücre süspansiyonu kültür kabına ekildi.

3.3. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE AYRIMI

1. %1 FBS ve %1 PS içeren DPBS solüsyonu hazırlandı ve filtreden geçirilerek sterilize edildi.

2. Hücreler %0,05 tripsin ile kaldırıldı ve %1 FBS ve %1 PS içeren DPBS solüsyonu ile 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek yıkandı. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı.

3. Santrifüjden sonra elde edilen pellet 100 µL %1 FBS ve %1 PS içeren DPBS solüsyonu içinde süspansiyon haline getirildi ve antikorlar ile boyamaya başlandı. µL başına 5000-10000 arası hücre kullanıldı.
4. Antikorlar (PerCP CD105, FITC CD73, APC CD45, PE CD34) firmanın önerdiği miktarda hücre solüsyonuna eklendi ve karanlıkta 15 dk buz üzerinde bekletildi.
5. Antikorlu hücre solüsyonu içine 500 µL %1 FBS ve %1 PS içeren DPBS solüsyonundan eklendi ve 1500 rpm’de 5 dk santrifüj edildi.
6. 2 adet “*sorting*” ve 1 adet “*collection*” tüp hazırlandı. “*Collection*” tüpe 4,5 mL besi yeri eklendi.
7. Pellet, süpernatant atıldıktan sonra 500 µL %1 FBS ve %1 PS içeren DPBS ile süspansiyon haline getirildi. Bu süspansiyon “*sorting*” tüpe aktarıldı ve buzda bekletildi.
8. Negatif kontrol için de ayrı bir “*sorting*” tüp hazırlandı. µL başına yaklaşık 2000 hücre kullanıldı.
9. Sorting bittikten sonra “*collection*” tüpteki süspansiyon 15 mL’lik falkon tüpe alındı ve 1500 rpm’de 5 dk santrifüj edildi.
10. Pellet besi yeri içinde süsyansiyon haline getirildi ve 6 kuyucuklu kültür kabına ekildi. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıklarında pasajlandı.

3.4. MEZENKİMAL KÖK HÜCREDEN MİKRORNA İZOLASYONU

Mezenkimal kök hücrelerden miRNA izolasyonu için “*NucleoSpin® miRNA kit*” (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Almanya) kullanıldı. Kitin hücre kültürleri için önerdiği prosedür aşağıdaki gibi uygulandı.

1. Kültür kabından besi yeri uzaklaştırıldı ve PBS eklendi. Kültür kabının tabanında PBS gezdirildi ve döküldü. Bu işlem besi yeri kalıntılarını uzaklaştırmak için yapıldı.
2. Ardından hücreler %0.05 tripsin ile kültür kabından kaldırıldı. Tüm hücreler kalktığında besiyeri eklenerek tripsin inhibe edildi ve kültür kabındaki hücre besi yeri karışımı falkon tüpe

alınarak 1500 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pelletin üzerine 300 µL “*ML Buffer*” eklendi, pipetaj yapıldı ve 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

3. Mor halkalı “*NucleoSpin Filter Column*” 2 mL, kapaklı “*Collection*” tüpe yerleştirildi ve lizat eklendi. 11.000 g’de 1 dk santrifüj edildi. Filtre atıldı ve altta kalan sıvı ile devam edildi.

4. 150 µL %96-100 etanol eklendi ve hemen 5 s vorteks yapıldı. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

5. Mavi halkalı “*NucleoSpin RNA Column*” 2 mL, kapaklı “*Collection*” tüpe yerleştirildi ve çökteltiyi de içeren örnek kolona yüklendi. 11.000 g’de 1 dk santrifüj edildi. Hem büyük RNA ve DNA’ların bağlandığı “*NucleoSpin RNA Column*” hem de küçük RNA ve proteinleri içeren sıvı sonraki adımlarda kullanılmak üzere saklandı. “*NucleoSpin RNA Column*” yeni bir 2 mL, kapaksız “*Collection*” tüpe yerleştirildi. Sıvıyı içeren “*Collection*” tüpün kapağı kapatıldı. “*NucleoSpin RNA Column*” ile devam edildi.

6. 350 µL “*MDB Buffer*”, “*NucleoSpin RNA Column*”a eklendi ve 11.000 g’de 1 dk santrifüj edildi. Altta kalan sıvı atıldı ve kolon tekrar “*Collection*” tüpe yerleştirildi.

7. Kolonun silika membranı üzerine 100 µL “*rDNase*” eklendi. Oda sıcaklığında 10. adım tamamlanana kadar en az 15 dk inkübe edildi.

8. 4. adımda elde edilen sıvıya 300 µL “*MP Buffer*” eklendi ve 5 s vorteks yapıldı. Proteinleri pellet haline getirmek için 11.000 g’de 3 dk santrifüj edildi.

9. Beyaz halkalı “*NucleoSpin Protein Removal Column*” 2mL, kapaklı “*Collection*” tüpe yerleştirildi ve 7. adımda elde edilen süpernatant kolona yüklendi. 11.000 g’de santrifüj edildi. “*NucleoSpin Protein Removal Column*” atıldı ve altta kalan sıvı ile devam edildi.

10. Elde edilen sıvıya 800 µL “*MX Buffer*” eklendi ve 5 s vorteks yapıldı.

11. 9. adımda elde edilen karışımın 600 µL’si 4. adımdan kalan ve büyük RNA’ları içeren “*NucleoSpin RNA Column*”a yüklendi. 11.000 g’de 30 s santrifüj edildi. Altta kalan sıvı atıldı ve kolon tekrar “*Collection*” tüpe yerleştirildi. Bu adım örnek bitene kadar tekrar edildi.

12. Birinci yıkama: “*NucleoSpin RNA Column*”a 600 µL “*MW1 Buffer*” eklendi ve 11.000 g’de 30 s santrifüj edildi. Altta kalan sıvı atıldı ve kolon tekrar “*Collection*” tüpe yerleştirildi.

İkinci yıkama: “*NucleoSpin RNA Column*”a 700 µL “*MW2 Buffer*” eklendi ve 11.000 g’de 30 s santrifüj edildi. Altta kalan sıvı atıldı ve kolon tekrar “*Collection*” tüpe yerleştirildi.

Üçüncü yıkama: “*NucleoSpin RNA Column*”a 250 µL “*MW2 Buffer*” eklendi ve silika membranı kurutmak için 11.000 g’de 2 dk santrifüj edildi. Altta kalan sıvı atıldı ve kolon tekrar “*Collection*” tüpe yerleştirildi. “*Collection*” tüp atıldı ve “*NucleoSpin RNA Column*” yeni bir 1.5 µL, kapaklı “*Collection*” tüpe yerleştirildi.

13. 30 µL (yüksek konsantrasyon için), 50 µL (orta derecede konsantrasyon ve miktar için) ya da 100 µL (düşük konsantrasyon ve fazla miktar için) RNazsız su, “*NucleoSpin RNA Column*”un tam ortasına eklendi. Oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildi ve sonra 11.000 g’de 30 s santrifüj edildi. Elde edilen RNA “*Nanodrop*” ölçümü için buz üzerine alındı. Ölçümden sonra örnekler; kısa süreli saklama için -20°C, uzun süreli saklama için -80°C dondurucuya koyuldu.

3.5. RNA KALİTE KONTROL

Tez kapsamında toplanan desidua ve periferel kan kökenli MKH’lerden izole edilen miRNA’ların, “*NanoDrop IMPLEN P-Class*” spektrofotometre cihazı kullanılarak kalite ve miktar tayinleri yapıldı. Örnekler izole edilirken kullanılan “*NucleoSpin® miRNA kit*” içerisindeki RNaz içermeyen su kör örnek (“*blank*”) olarak kullanıldı. Ölçüm sırasında her örnekten 1 µL kullanıldı.

3.6. MİKORNA’DAN CDNA SENTEZİ

Desidua ve periferel kan kökenli MKH’lerden izole edilen total RNA’ların cDNA sentezi, “*miRCURY LNA™ RT Kit*” (Qiagen, Germany) kullanılarak firmanın önerdiği protokole göre yapıldı. Kit bileşenleri -20°C, total RNA örnekleri ise -80°C dondurucudan alınarak buz üzerinde çözöldükten sonra masaüstü mini santrifüj cihazı (“*Beckman Coulter*”) kullanılarak hızlıca çevrilir ve çalışma solüsyonu (“*master mix*”) Tablo 3.1’deki sıra ile belirtilen miktarlarda bileşen eklenerek hazırlandı. Çalışma solüsyonu her bir örnek için hazırlanıp etiketlenen PZR tüplerine dağıtıldı ve ardından cDNA örnekleri de tüplere eklendi (Tablo 3.2). PZR tüpleri kısaca santrifüj edildikten sonra Tablo 3.3’teki termal koşullarda RT-PZR gerçekleştirildi.

Tablo 3.1: cDNA sentezi için hazırlanan çalışma solüsyonu bileşenleri.

BİLEŞEN	MİKTAR
Nükleaz içermeyen su	4,5 µL
5× miRCURY RT Reaction Buffer	2 µL
10x miRCURY RT Enzyme Mix	1 µL
Synthetic RNA spike-in	0,5 µL
TOTAL	8 µL

Tablo 3.2: RT-PZR bileşenleri.

BİLEŞEN	MİKTAR
Çalışma solüsyonu	8 µL
Total RNA (5 ng/ µL)	2 µL
TOTAL	10 µL

Tablo 3.3: RT-PZR termal döngüsü.

ZAMAN	SICAKLIK
60 dakika	42°C
5 dakika	95°C
∞	4°C

3.7. DAMLACIKLI DİJİTAL POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (DDPZR)

1. Kullanılan her primer [miRCURY LNA miRNA PCR Assay (Qiagen, Germany)] için reaksiyon sayısına göre karışım (“mix”) hazırlandı (Tablo 3.4) ve steril PZR tüplerine dağıtıldı. Karışım cDNA örneklerini içermemektedir.

Tablo 3.4: ddPZR için hazırlanan bir reaksiyon için gerekli “mix” bileşenleri ve miktarları.

BİLEŞEN	MİKTAR
“QX200™ ddPCR™ EvaGreen® Supermix”	10 µL
Primer (miRCURY LNA miRNA PCR Assay)	1 µL
cDNA örneği	2 µL
Nükleazsız su	7 µL
TOTAL	20 µL

- Final konsantrasyon 1 ng olacak şekilde cDNA örnekleri gerekli hacimlerde PCR tüplerine eklendi.
- Her bir primer için cDNA örneği içermeyen “no template control” (NTC) örnekleri de hazırlandı. cDNA yerine aynı miktarda nükleazsız su kullanıldı.
- PCR tüplerindeki örneklere spin atıldı ve içlerinde baloncuk kalmamasına dikkat edildi.
- Örnekler (20 µL) 8 kanallı pipet yardımıyla “DG8 cartridge”in “sample” kuyucuklarına yüklendi.
- Ardından “Droplet Generator Oil” (70 µL) “DG8 cartridge”in “oil” kuyucuklarına 8 kanallı pipet ile yüklendi.
- “Droplet” oluşumu için “DG8 cartridge”, “QX200™ Droplet Generator” cihazına yerleştirildi ve cihaz “droplets” kuyucuklarında “droplet”leri oluşturdu.

8. “DG8 cartridge”den “droplet”ler 8 kanallı pipet yardımıyla yavaşça “droplet”leri kırmamaya dikkat edilerek 40 µL alındı ve 96 kuyucuklu “plate”e aktarıldı.
9. Bu aşama tüm örnekler için tekrarlandı ve tüm örnekler 96 kuyucuklu “plate”e aktarıldıktan sonra “plate”in üzeri folyo ile “PX1™ PCR Plate Sealer” (Bio-Rad) cihazında 180°C’de kapatıldı.
10. Folyo ile kapatılan 96’lı “plate”, PCR aşaması için “T100™ Thermal Cycler” (Bio-Rad) cihazına aktarıldı. Termal döngü Tablo 3.5’te gösterildi.
11. PCR sırasında “QuantaSoft” yazılımı kullanılarak örneklerin tanımlayıcı özellikleri, kullanılan “supermix” ve kullanılan yöntem bilgileri sisteme girildi.
12. PCR işlemi tamamlandıktan sonra 96’lı “plate” “QX200™ Droplet Reader” cihazına aktarıldı. Cihaz kuyucuklardaki pozitif ve negatif dropletleri okudu ve ardından sonuçlar analiz edildi.

Tablo 3.5: ddPZR termal döngüsü.

Aşama	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık değişme süresi “Ramp rate”	Döngü sayısı
Enzim aktivasyonu	95°C	5 dk		1
Denatürasyon	95°C	30 sn		40
Bağlanma/Uzama	56°C	1 dk		40
Sinyal stabilizasyonu	4°C	5 dk	2°C/sn	1
	90°C	5 dk		1
Bekleme (opsiyonel)	4°C	∞		1

3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Tez kapsamında, “Eva Green” tabanlı ddPZR analizinde miRNA spesifik primerler ve örneklerin normalizasyonu için U6 snRNA kullanıldı. Örneklerle ait kopya/ μ L değerleri “QX200™ Droplet Reader” cihazında bulunan “QuantaSoft version 1.7.4” programında otomatik olarak belirlendi. Normalize edilen verilerin istatistiksel analizleri “Graphpad Prism 8.1.2” programında parametrik olmayan “Mann Whitney Test” ile yapıldı. İstatistiksel analiz sonucu p değeri 0,05’ten küçük olarak belirlenen sonuçlar anlamlı olarak kabul edildi.

Bir testin tanısal performansı veya kullanılan testin hastalıklı vakaları normal vakalardan ayırt etme gücü, “Receiver Operating Characteristic” (ROC) eğrisi analizi kullanılarak değerlendirilir. ROC eğrisinin altında kalan alan (AUC), bir parametrenin iki tanı grubu (hastalıklı / normal) arasında ne kadar iyi ayırım yapabileceğinin bir ölçüsüdür. (Metz, 1978; Zweig ve Campbell, 1993). Tez kapsamında, amaçlarımız arasında PE hastalığının erken tanısında kullanılmak üzere potansiyel biyobelirteç çalışması yapmak olduğu için elde edilen veriler ROC analizi ile değerlendirildi ve testin doğruluğu analiz edildi.

4. BULGULAR

4.1. KULLANILAN ÖRNEKLERİN ÖZELLİKLERİ

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda takip edilen 7 preeklampsi hastası (plasenta + kan) ve 7 sağlıklı (plasenta + kan) toplam 14 gebe, 28 örnek (14 plasenta, 14 kan) ile gerçekleştirildi. Hasta ve kontrol grubuna dahil edilen bireylerin tanıları uzman hekimler tarafından belirlendi. Çalışmaya katılan bireyleri klinik özellikleri Tablo 4.1'de gösterildi.

Tablo 4.1: Çalışmaya katılan gebelerin klinik özellikleri.

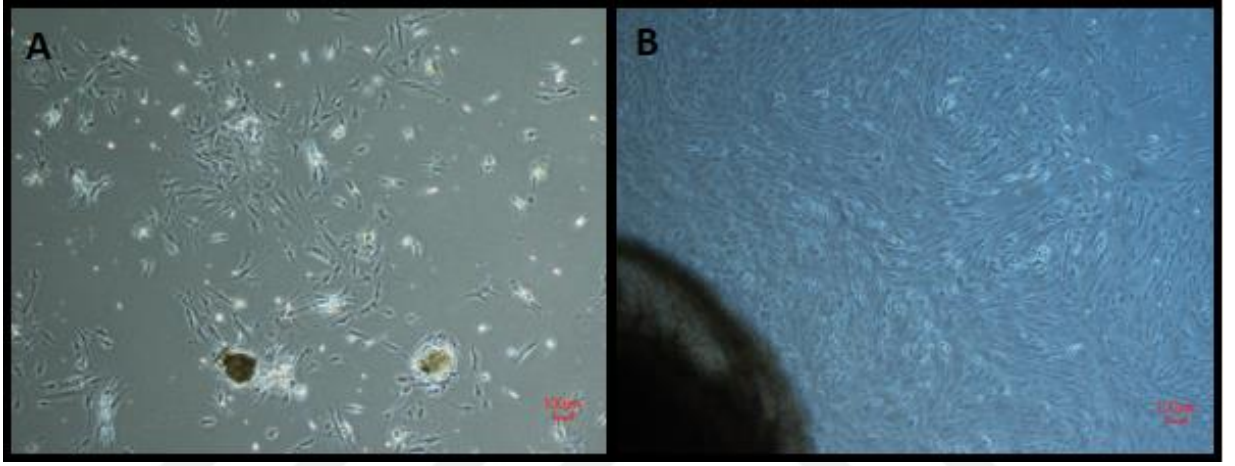
	PREEKLAMPSİ (n=7)	KONTROL (n=7)	p DEĞERİ
Yaş (yıl)	31,3 ± 5,02	28,2 ± 4,7	Anlamlı değil
Gebelik yaşı (hafta)	37,6 ± 1,53	38 ± 0,92	Anlamlı değil
BMI kg.m ⁻²	36,1 ± 5,33	31,1 ± 7,1	Anlamlı değil
Sistolik kan basıncı mmHg	143,5 ± 4,25	114,2 ± 5,07	p<0,05
Diastolik kan basıncı mmHg	93,3 ± 3,7	78,3 ± 6,1	p<0,05
İdrarda protein mg/24 saat	>3000	yok	p<0,05

4.2. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN PLASENTA VE KANDAN HÜCRE KÜLTÜRÜ İLE ELDESİ

4.2.1. Plasentadan Mezenkimal Kök Hücre Eldesi

Bölüm 3.2.2.'de anlatıldığı gibi desidua dokusunun enzimatik olarak parçalanmasıyla izole edilen hücreler, desidua kökenli mezenkimal kök hücre (dMKH) eldesi amacıyla kültür kabına ekildi. Hücre kültürünün ilk gününde, fibroblast benzeri hücrelere ek olarak parlak ve kültür kabına yapışmayan hematopoetik progenitör hücreler ve eritrositler görüldü (Şekil 4.1). dMKH'ler yeterli yoğunluğa ulaşana kadar besi yeri aspire edilip değiştirilerek bu tür istenmeyen hücreler kültür kabından arındırıldı. Yapılan besi yeri değişimi sırasında, plastiğe

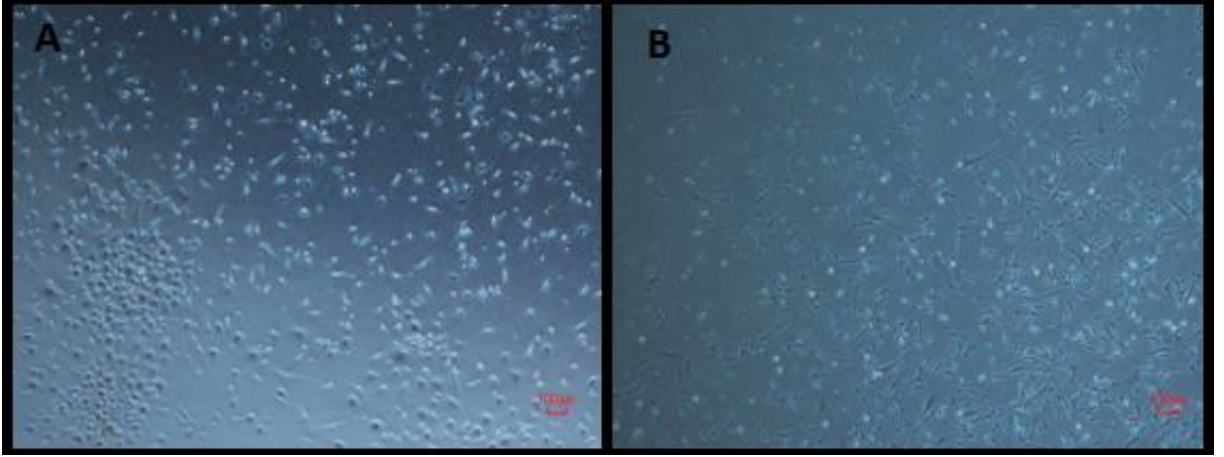
yapışma özelliği sayesinde dMKH'ler elde edildi. Bu aşamada elde edilen hücreler pasaj 0 olarak adlandırılır (Şekil 4.1). Hücreler kültür kabında yeterli yoğunluğa ulaştıklarında pasajlanarak kontaminant hücrelerden tamamen arındırıldı. 3-4 pasaj sonra hücreler donduruldu ve toplamda 14 farklı desidua kökenli MKH kültürüne ait hücre örneği akım sitometrisi ile MKH ayrımı için sıvı azotta bekletildi. 14 farklı desidual örnek kültürünün 1. günlerinin görüntüsü ve akış sitometrisine gitmeden önce yeterli yoğunluğa ulaşmış hücre kültürünün görüntüleri Şekil 4.1'te verildi.



Şekil 4.1: dMKH'lerin kültüre alındığı ilk gün (A) ve MKH ayrımından önce (B) alınan görüntüler.

4.2.2. Kandan Mezenkimal Kök Hücre Eldesi

Bölüm 3.2.3.'te anlatıldığı gibi kanda bulunan tek çekirdekli hücreler MKH eldesi amacıyla "ficoll" izolasyon yöntemi kullanılarak izole edildi. Hücre kültürünün ilk gününde, fibroblast benzeri hücrelere ek olarak parlak ve kültür kabına yapışmayan hematopoetik progenitör hücreler ve eritrositler dMKH'lere göre daha fazla oranda görüldü (Şekil 4.2). MKH'ler yeterli yoğunluğa ulaşana kadar besi yeri aspire edilip değiştirilerek bu tür istenmeyen hücreler kültür kabından arındırıldı. Yapılan besi yeri değişimi sırasında, plastiğe yapışma özelliği sayesinde dMKH'ler elde edildi. Bu aşamada elde edilen hücreler pasaj 0 olarak adlandırılır (Şekil 4.2). Hücreler kültür kabında yeterli yoğunluğa ulaştıklarında pasajlanarak kontaminant hücrelerden tamamen arındırıldı. 3-4 pasaj sonra hücreler donduruldu ve toplamda 14 farklı periferel kan kökenli MKH (kMKH) kültürüne ait hücre örneği MKH ayrımı için sıvı azotta bekletildi. 14 farklı periferel kan örneğinin kültürünün 1. günlerinin görüntüsü ve akış sitometrisine gitmeden önce yeterli yoğunluğa ulaşmış hücre kültürünün görüntüleri Şekil 4.2'de verildi.



Şekil 4.2: kMKH’lerin kültüre alındığı ilk gün (A) ve MKH ayırımından önce (B) alınan görüntüler.

4.3. HÜCRE KÜLTÜRÜNDEN MEZENKİMAL KÖK HÜCRE AYIRIMI

4.3.1. Desidua Kökenli Mezenkimal Kök Hücre Ayırımı

PE ve sağlıklı kontrollerden elde edilen 14 örneğin 3-4 pasaj sonunda yeterli yoğunluğa erişen desidua kökenli heterojen MKH’lerden saf MKH eldesi için kültür kabından hücre ayırımı yapıldı. Floresan işaretli PerCP CD105 ve FITC CD73 hücre yüzey belirteçleri açısından pozitif, APC CD45 ve PE CD34 hücre yüzey belirteçlerini açısından negatif olan MKH’lerin hücre kültüründen seçilmesi için “Sonny Cell Sorter” sistemi kullanıldı.

Akım sitometrisinden elde edilen veriler ölü hücreler ve debri gibi istenmeyen partiküllerden elimine edilmek üzere kapı alma (“gating”) işlemi yapıldı. Kapı alma ile bölgeler (“region”) oluşturuldu. Ayırımı yapılan örneklerle ait bilgiler “Flow Cytometry Standard” (FCS) dosyalarında saklandı.

4.3.2. Periferik Kan Kökenli Mezenkimal Kök Hücre Ayırımı

PE ve sağlıklı kontrollerden elde edilen 14 örneğin 3-4 pasaj sonunda yeterli yoğunluğa erişen periferik kan kökenli heterojen MKH’lerden saf MKH eldesi için kültür kabından hücre ayırımı yapıldı. Floresan işaretli PerCP CD105 ve FITC CD73 hücre yüzey belirteçleri açısından pozitif, APC CD45 ve PE CD34 hücre yüzey belirteçlerini açısından negatif olan MKH’lerin hücre kültüründen seçilmesi için “Sonny Cell Sorter” sistemi kullanıldı.

Akım sitometrisinden elde edilen veriler ölü hücreler ve debri gibi istenmeyen partiküllerden elimine edilmek üzere kapı alma (“gating”) işlemi yapıldı. Kapı alma ile bölgeler (“region”)

oluşturuldu. Kapı alma ile bölgeler (“*region*”) oluşturuldu. Ayırımı yapılan örneklerle ait bilgiler “*Flow Cytometry Standard*” (*FCS*) dosyalarında saklandı.

4.4. ÖRNEKLERİN KALİTE KONTROLÜ

Tez kapsamında 7 preeklampsi hastası ve 7 sağlıklı bireyden toplanan plasenta ve kan örneklerinden toplamda 28 örneğin mezenkimal kök hücre kültürü sonrasında “*NucleoSpin® miRNA kit*” (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Almanya) ile yapılan total RNA izolasyonlarının kalite ve miktar tayinleri “*NanoDrop IMPLEN P-Class*” spektrofotometre cihazı ile yapıldı. Total RNA’dan elde edilen konsantrasyonlar (ng/μL) ve $A_{260/280}$ oranları Tablo 4.2 ve Tablo 4.3’te gösterildi.

Tablo 4.2: PE hastalarından (P) izole edilen total RNA’ların kalite kontrol ve miktar tayinleri.

Örnek No.	PLASENTA		KAN	
	ng/μL	$A_{260/280}$	ng/μL	$A_{260/280}$
P1	380	2,07		
P2	387,6	2,09		
P3	399,5	2,11	430,7	2,09
P4	193,1	2,07		
P5	431,6	2,12		
P6	377,6	2,09		
P7	1573,9	2,1	465,2	2,06

Tablo 4.3: Sağlıklı gebelerden (S) izole edilen total RNA'ların kalite kontrol ve miktar tayinleri.

Örnek No.	PLASENTA		KAN	
	ng/ μ L	A _{260/280}	ng/ μ L	A _{260/280}
S1	1168,1	2,1	121	2,13
S2	1663,1	2,1	907,8	2,14
S3	614,1	2,11		
S4	395,5	2,09		
S5	251,4	2,06		
S6	1414,1	2,12		
S7	2545,5	2,1	711,8	2,11

4.5. MİKORNA ANLATIM ANALİZİ

Çalışma kapsamında, 7 PE hastası ve 7 sağlıklı gebeye ait 28 MKH örneğinde aday miRNA'ların (Tablo 4.4) anlatım seviyeleri analiz edildi. Bu amaçla her bir miRNA'ya spesifik primer ve normalizasyon için ise U6 kullanıldı. Örnekler PZR sonrasında “QX200 Droplet Reader” (Bio-Rad) cihazına aktarıldı ve istatistiksel analiz için kullanılan kopya/ μ L değerleri cihazda otomatik olarak belirlendi. Örneklerle ait istatistiksel analizler “GraphPad Prism 8.1.2” programında yapıldı. Anlamlılık analizi için parametrik olmayan “Mann Whitney Test”, duyarlılık ve özgüllük için ise ROC (“Receiver Operating Characteristic”) analizi yapıldı. Tüm istatistiksel analizlerde $p < 0,05$ değeri istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirildi.

4.5.1. Desidua Kökenli MKH'lerde miRNA Analizi

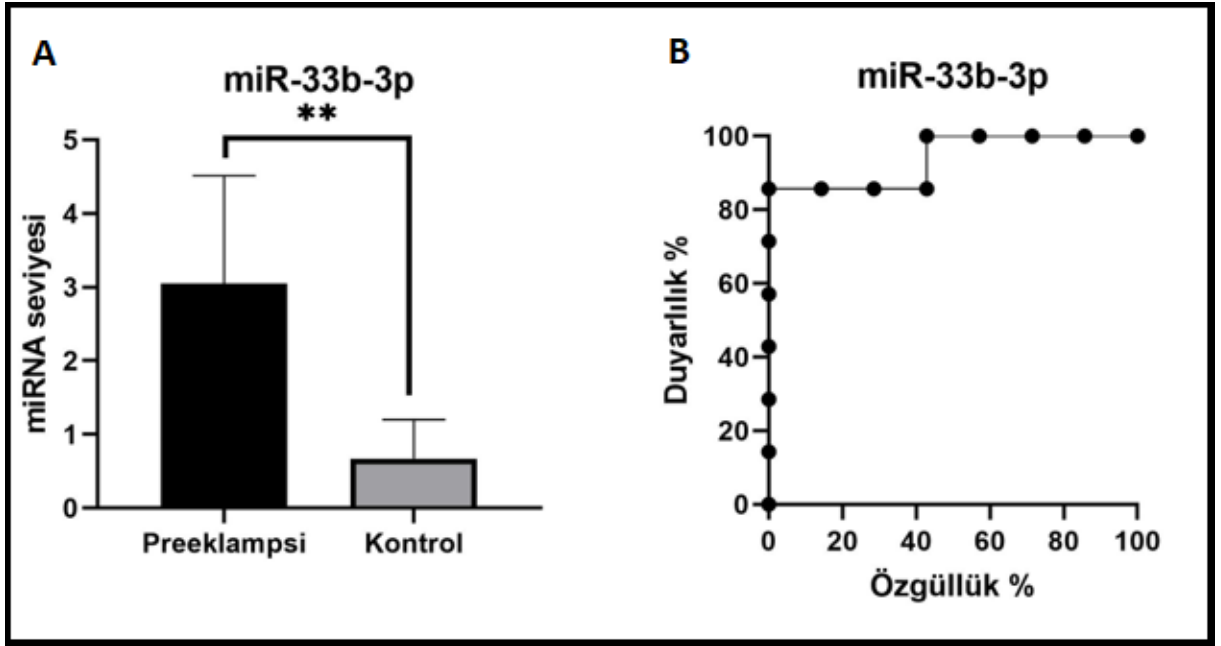
Desidua kökenli 14 örneğe ait MKH'lerden ddPZR ile analizi yapılan 6 miRNA'dan let-7b-3p'de 1,52, miR-191-3p'de 1,83, miR-550a-5p'de 1,95 ve miR-33b-3p'de 4,5 kat artış görülürken let-7f-1-3p ve miR-425-3p'de herhangi bir artış görülmedi (Şekil 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8). “Mann Whitney Test” ile yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda $p < 0,05$ değeri dikkate alınarak yalnızca miR-33b-3p ($p = 0,004$) anlamlı bulundu (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: dMKH’lerde ddPZR ile yapılan miRNA anlatım analizlerinin istatistiksel sonuçları.

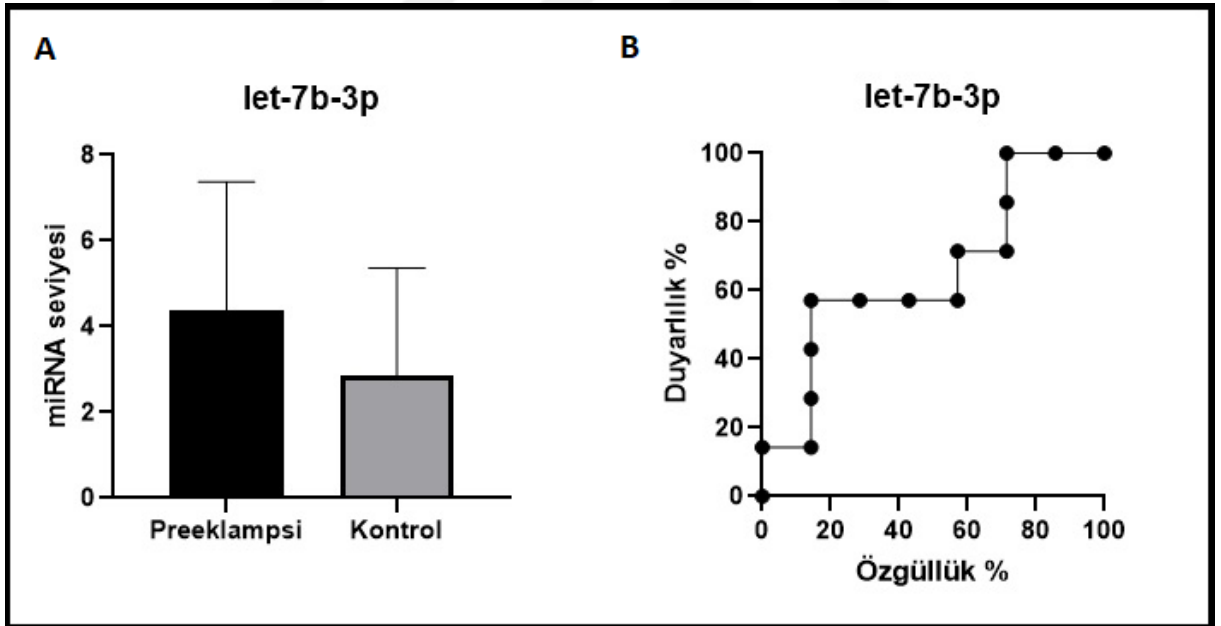
ADAY miRNA	"Mann Whitney Test"	ROC Analizi			
	<i>p</i> DEĞERİ	AUC	STANDART SAPMA	<i>p</i> DEĞERİ	%95 GÜVEN ARALIĞI
Let-7b-3p	0,38	0,65	0,15	0,33	0,35-0,95
Let-7f-1-3p	0,8	0,55	0,16	0,75	0,22-0,88
Hsa-miR-425-3p	0,71	0,57	0,16	0,65	0,25-0,89
Hsa-miR-191-3p	0,097	0,77	0,14	0,08	0,50-1,0
Hsa-miR-550a-5p	0,053	0,82	0,11	0,047	0,58-1,0
Hsa-miR-33b-3p	0,004	0,93	0,06	0,006	0,80-1,0

Hsa-miR-33b-3p anlatım seviyesi sağlıklı gebeler ile karşılaştırıldığında, PE hastalarının desidualarından elde edilen MKH’lerde 4,5 kat daha yüksek bulundu. “Mann Whitney Test” ile yapılan istatistiksel analiz sonucunda $p=0,004$ bulunarak anlamlı olarak değerlendirildi.

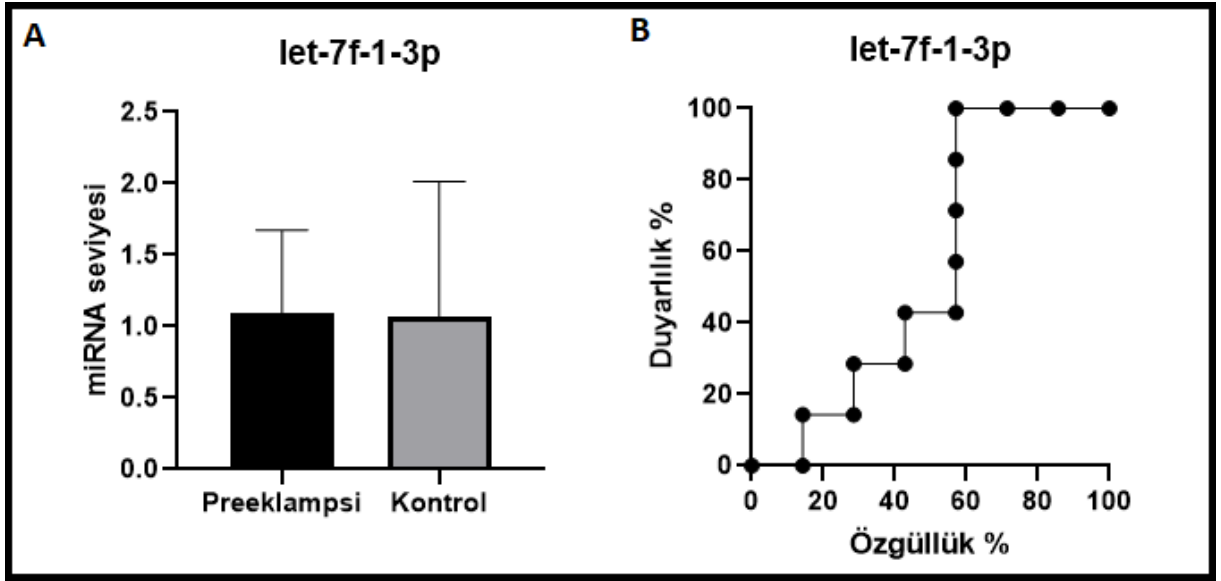
Elde edilen verilerin duyarlılık ve özgüllük değerlerini belirlemek ve hsa-miR-33b-3p’nin tanı için uygun olup olmadığını değerlendirmek için ROC analizi yapıldı. Hsa-miR-33b-3p için eğri altında kalan alan (“Area Under the Curve”, AUC) 0,93 ve p değeri 0,006 bulunarak yapılan analiz %95 güven aralığında anlamlı olarak değerlendirildi (Şekil 4.3).



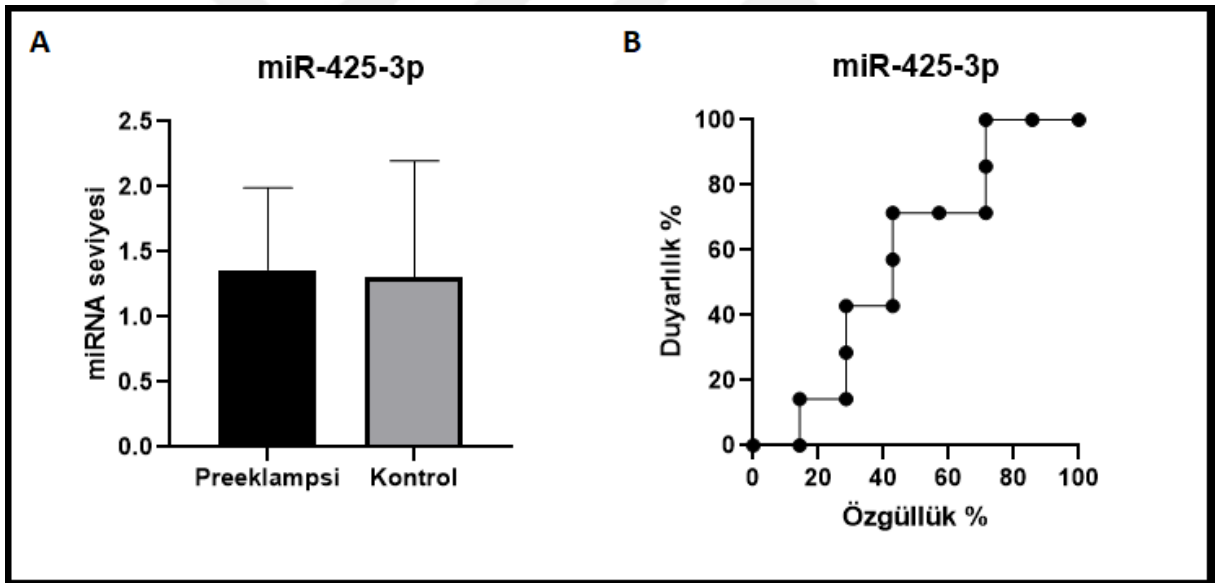
Şekil 4.3: Hsa-miR-33b-3p'nin rölatif miRNA anlatım seviyesi ve ROC eğrisi analizi.



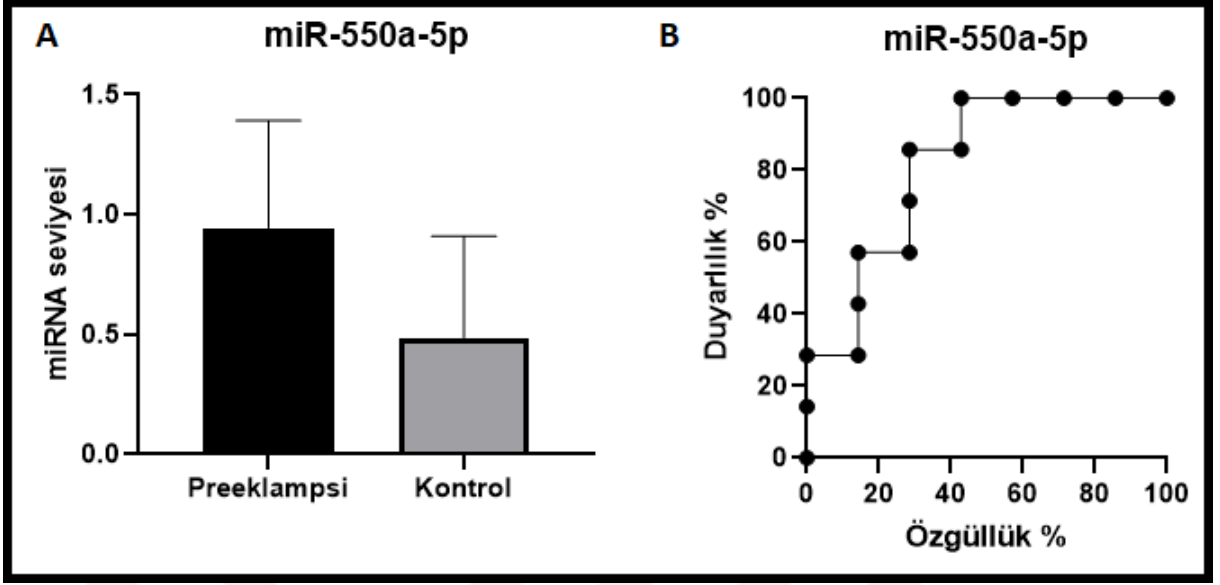
Şekil 4.4: Hsa-let-7b-3p'nin rölatif miRNA anlatım seviyesi ve ROC eğrisi analizi.



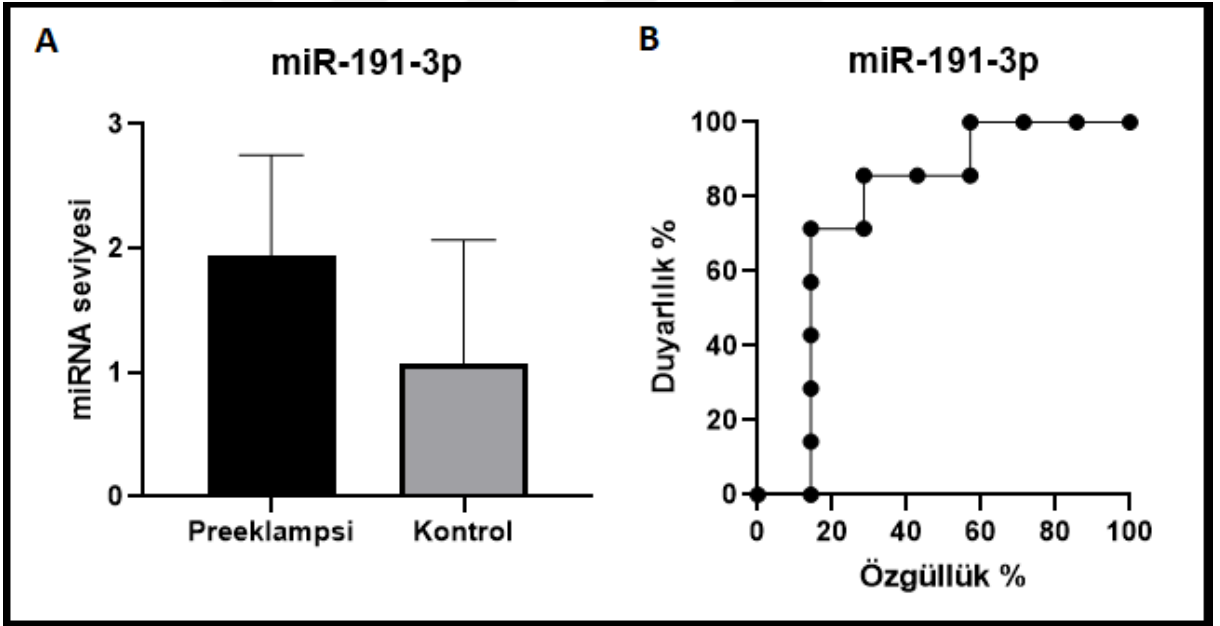
Şekil 4.5: Hsa-let-7f-1-3p'nin rölâtif miRNA anlatım seviyesi ve ROC eğrisi analizi.



Şekil 4.6: Hsa-miR-425-3p'nin rölâtif miRNA anlatım seviyesi ve ROC eğrisi analizi.



Şekil 4.7: Hsa-miR-550a-5p'nin rölatif miRNA anlatım seviyesi ve ROC eğrisi analizi.



Şekil 4.8: Hsa-miR-191-3p'nin rölatif miRNA anlatım seviyesi ve ROC eğrisi analizi.

4.5.2. Periferel Kan Kökenli MKH'lerde miRNA Analizi

Periferel kan kökenli 14 örneğe ait MKH kültürü, “*ficoll*” izolasyon yöntemi ile tek çekirdekli hücre izolasyonu sonrasında yapıldı. Hücreler 3-4 pasaj kültüre edildi. MKH ayırımı sırasında cihazdaki teknik aksaklıklar sebebiyle PE hastası 2, sağlıklı ise 3 gebeden alınan örneğin MKH ayırımı gerçekleştirilebildi. İzolasyonu gerçekleştirilen 5 periferel kan kökenli MKH örneğinde ddPZR ile miRNA anlatım analizi gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.5'te verildi.

Tablo 4.5: kMKH’lerde ddPZR ile yapılan miRNA anlatım analizleri. P: PE hastası, S: Sağlıklı.

Örnek no	hsa-let-7b-3p	hsa-let-7f-1-3p	hsa-miR-425-3p	hsa-miR-550a-3p	hsa-miR-191-3p	hsa-miR-33b-3p
P3	0,603563	0,200445	0,296214	0,111359	0,140312	0,115813
P7	4,768657	0,619403	0,813433	0,238806	0,38806	0,208955
S1	3,916667	0,722222	0,916667	0,444444	0,486111	0,305556
S2	4,514286	1,185714	1,328571	0,842857	0,9	0,714286
S7	1,692308	0,557692	0,605769	0,365385	0,596154	0,557692

4.5.3. Biyoinformatik Tabanlı Hedef Gen ve Yolak Analizi

Bu tez kapsamında, Gunel ve diğ. (2017) tarafından yapılan mikrodizilim çalışmasında valide edilen miRNA’lar (let-7b-3p, miR-191-3p, miR-550a-5p, miR-33b-3p, let-7f-1-3p ve miR-425-3p), “*miRO 2.0*” veritabanı kullanılarak yolak analizi çalışmaları için kullanılmıştır. Çalışma sonucu preeklampsi ve anlamlı olarak değerlendirilen miR-33b-3p’nin ortak olarak bulunduğu yolaklar Tablo 4.6’da, tüm miRNA’ların ortak olarak bulundukları yolaklar ise Tablo 4.7’de verilmiştir. Ayrıca miR-33b-3p’nin hedef gen analizi “*miRGator V 3.0*” veritabanı ile yapılmış ve sonuç Şekil 4.9’de verilmiştir.

Tablo 4.6: Preeklampsi ve aday miR-33b-3p'nin ortak olarak bulundukları yollar.

YOLAK ADI	ÖZGÜLLÜK	p DEĞERİ
LPS transferred from LBP carrier to CD14	1,29E+06	1,91E+02
BMAL1:CLOCK/NPAS2 Activates Gene Expression	3,35E+05	1,34E+01
Folate transformations	2,86E+05	8,32E+02
Circadian Clock	2,41E+05	3,53E+01
FGF signaling pathway	1,61E+05	1,10E+02
Amine ligand-binding receptors	1,51E+05	4,21E+02
Salivary secretion	1,16E+05	1,07E+02
Antigen Presentation: Folding; assembly and peptide loading of class I MHC	1,12E+05	1,99E+03
Calcium signaling pathway	1,02E+05	1,64E+01
Syndecan-2-mediated signaling events	1,00E+05	3,80E+02
NCAM signaling for neurite out-growth	9,18E+04	1,01E+03
Vascular smooth muscle contraction	9,02E+04	2,43E+02
S1P3 pathway	8,86E+04	2,44E+03
HIF-2-alpha transcription factor network	7,56E+04	2,80E+03
Phase II conjugation	6,76E+04	3,07E+03
Signaling events mediated by HDAC Class II	6,76E+04	3,07E+03
Platelet homeostasis	6,59E+04	3,14E+03
Integration of energy metabolism	6,43E+04	1,79E+03
Progesterone-mediated oocyte maturation	6,12E+04	1,93E+03
FOXA2 and FOXA3 transcription factor networks	5,98E+04	3,40E+03
ABC transporters	5,84E+04	3,46E+03
Toll-like receptor signaling pathway	5,14E+04	2,50E+03
E-cadherin signaling in the nascent adherens junction	4,69E+04	1,25E+03
VEGF and VEGFR signaling network	2,37E+04	5,98E+03
MAPK signaling pathway	2,97E+04	4,57E+03
mTOR signaling pathway	2,36E+04	6,05E+03
Class I PI3K signaling events mediated by Akt	2,40E+04	5,81E+03
Signaling events mediated by focal adhesion kinase	2,40E+04	5,81E+03

Tablo 4.7: Aday miRNA'ların ortak olarak bulunduğu yollar. “*miRO 2.0*” ile analiz edildi.

YOLAK ADI	ÖZGÜLLÜK	p DEĞERİ
BMAL1:CLOCK/NPAS2 Activates Gene Expression	2,43E+04	7,52E+01
Circadian Clock	2,22E+04	7,17E+01
E-cadherin signaling events	1,69E+04	4,06E-01
E-cadherin signaling in the nascent adherens junction	1,69E+04	5,69E-01
Stabilization and expansion of the E-cadherin adherens junction	1,69E+04	5,69E-01
Posttranslational regulation of adherens junction stability and disassembly	1,68E+04	2,65E+00
N-cadherin signaling events	1,65E+04	3,44E+00
Developmental Biology	1,53E+04	2,82E+00
Androgen-mediated signaling	1,52E+04	3,68E+02
CDC42 signaling events	1,51E+04	5,76E-02
Regulation of CDC42 activity	1,51E+04	6,67E-02
Regulation of Androgen receptor activity	1,51E+04	6,32E+02
Proteoglycan syndecan-mediated signaling events	1,48E+04	2,10E-04
AP-1 transcription factor network	1,48E+04	1,75E+00
VEGF and VEGFR signaling network	1,48E+04	7,25E-04
Signaling events mediated by Hepatocyte Growth Factor Receptor (c-Met)	1,47E+04	1,10E-03
Beta1 integrin cell surface interactions	1,47E+04	7,35E-04
Signaling events mediated by VEGFR1 and VEGFR2	1,47E+04	1,44E-03
Thrombin/protease-activated receptor (PAR) pathway	1,47E+04	1,45E-03
Syndecan-1-mediated signaling events	1,47E+04	1,45E-03
ErbB receptor signaling network	1,47E+04	1,36E-03
Alpha9 beta1 integrin signaling events	1,47E+04	1,59E-03
Integrin family cell surface interactions	1,47E+04	7,11E-04
ErbB1 downstream signaling	1,47E+04	2,00E-03
S1P1 pathway	1,47E+04	2,00E-03
Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and uPAR-mediated signaling	1,47E+04	2,00E-03
Signaling events mediated by focal adhesion kinase	1,47E+04	2,00E-03
Class I PI3K signaling events	1,47E+04	2,00E-03
Arf6 downstream pathway	1,47E+04	2,00E-03
Class I PI3K signaling events mediated by Akt	1,47E+04	2,00E-03

Tablo (devam) 4.7:

Insulin Pathway	1,47E+04	2,00E-03
Internalization of ErbB1	1,47E+04	2,00E-03
Arf6 signaling events	1,47E+04	2,00E-03
PDGFR-beta signaling pathway	1,47E+04	2,00E-03
EGF receptor (ErbB1) signaling pathway	1,47E+04	2,00E-03
Arf6 trafficking events	1,47E+04	2,00E-03
IL3-mediated signaling events	1,47E+04	1,86E-03
Nectin adhesion pathway	1,47E+04	1,86E-03
Integrin-linked kinase signaling	1,47E+04	2,07E+00
GMCSF-mediated signaling events	1,47E+04	2,01E-03
PAR1-mediated thrombin signaling events	1,47E+04	1,87E-03
EGFR-dependent Endothelin signaling events	1,46E+04	2,18E-03
mTOR signaling pathway	1,46E+04	1,75E-03
Glypican pathway	1,46E+04	1,31E-03
PDGF receptor signaling network	1,46E+04	2,19E-03
LKB1 signaling events	1,46E+04	2,07E-03
IGF1 pathway	1,46E+04	2,59E-03
IL5-mediated signaling events	1,46E+04	2,83E-03
Glypican 1 network	1,46E+04	2,63E-03
IFN-gamma pathway	1,46E+04	2,85E-03
Endothelins	1,46E+04	2,67E-03
Sphingosine 1-phosphate (S1P) pathway	1,46E+04	2,69E-03
TRAIL signaling pathway	1,46E+04	3,01E-03
Plasma membrane estrogen receptor signaling	1,45E+04	6,09E-03
Hematopoietic cell lineage	1,44E+04	1,49E+03
Metabolism	1,00E+04	9,89E+03

Şekil 4.9: Hsa-miR-33b-3p'nin hedef gen analizi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gebeliğin 20. haftasından sonra, tansiyonu 140/90 mmHg'den daha yüksek ve proteinürisi olan kadınlara preeklampsi (PE) tanısı koyulur (North ve diğ., 2011). Dünya çapında gebeliklerin %5'ini etkileyen ve yaygın bir hipertansif gebelik bozukluğu olan PE belirtileri plasentanın atılmasına kadar devam eder (Sibai, Dekker ve Kupferminc, 2005). PE'nin tam patolojik mekanizmaları bilinmemekle birlikte, genellikle plasenta düzensizliğinin gebelik bozukluklarına aracılık ettiği düşünülmektedir. PE'de anormal invazyon, damar anormallikleri, yapısal değişiklikler, kalsifikasyon, oksidatif hasar ve inflamasyon cevabı gibi plasental bozukluklar gözlenir (Song ve diğ., 2017).

Mezenkimal kök hücre (MKH) ler, farklılaşmış doku ve organlarda bulunan multipotent hücrelerdir ve son birkaç yıldır, araştırmacılar farklı kaynaklardan yetişkin MKH izolasyonu yapmaktadır. İlk olarak Friedenstein ve diğ. (1976) tarafından bildirilen kemik iliği kaynaklı kök hücreler halen en sık araştırılan hücre tipidir. Ancak adiipoz dokudan (Fraser ve diğ., 2006), plasentadan (de la Torre, Perez-Lorenzo ve Flores, 2018), periferik kandan (Cao, Dong ve Dong, 2005), akciğerden (Griffiths, Bonnet ve Janes, 2005) veya kalpten (Beltrami ve diğ., 2003) türetilmiş mezenkimal kök hücreler de farklı hücre tiplerinde çoğalma ve farklılaşma için iyi bir potansiyele sahiptir.

İnsan MKH'sini tanımlamak için önerilen asgari kriterler 2006 yılında Dominici ve diğerleri tarafından yayımlanmıştır. Bu önerilen kriterler arasında CD105 (SH2), CD73 (SH3), CD44 ve CD90'ın pozitif ifadesi ve CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79a veya CD19 ve HLA-DR yüzey moleküllerinin negatif ifadesi yer almaktadır. Ayrıca, MKH'ler standart kültür koşulları altında plastik kültür kabına yapışır. Osteoblastlara, kondroblastlara ve adipositlere *in vitro* farklılaşma konusunda yetkindirler (Dominici ve diğ., 2006).

MKH, plasenta, amniyon, göbek kordonu ve kordon kanı dahil olmak üzere doğumla ilişkili birkaç dokudan elde edilebilir. Neonatal dokuların önemli bir avantajı kullanıma hazır durumda olmalarıdır. Bu sayede invaziv prosedürleri ve etik problemleri önlemektedir. Ayrıca, doğumla ilişkili dokular; MKH, endotelial kök/progenitör hücreler ve hematopoetik kök hücreler (CD34+, CD133+) dahil olmak üzere çeşitli embriyonik veya erken hücre popülasyonlarını barındırır. Bu neonatal dokulardan alınan MKH'lerin, yetişkin kaynaklardan elde edilen MKH'lere kıyasla ek kapasitelere sahip olabileceği de önerilmektedir. Yapılan birçok çalışma,

doğumla ilişkili dokulardan elde edilen MKH'lerin kemik iliği kökenli MKH'lere göre gelişmiş proliferatif kapasite, yaşam süresi ve farklılaşma potansiyeli gibi özelliklerini bildirmiştir (in 't Anker ve diğ., 2004; Barlow ve diğ., 2008; Brooke ve diğ., 2008).

Plasentada, kök veya progenitör özelliklere sahip en az dört farklı hücre popülasyonu ayırt edilebilir: insan amniyotik epitel hücreleri, insan amniyotik mezenkimal stromal hücreleri, insan koryonik mezenkimal stromal hücreleri ve insan koryonik trofoblastik hücreleri (Parolini ve diğ., 2008). Amniyon zarı (Miki ve diğ., 2005; Tamagawa ve diğ., 2007; Marcus ve diğ., 2008; Wolbank ve diğ., 2010), koryon zarı (Portmann-Lanz ve diğ., 2006; Soncini ve diğ., 2007) ve koryonik villus dahil olmak üzere fetal dokulardan elde edilen plasenta kaynaklı MKH'lerin (Fukuchi ve diğ., 2004; Igura ve diğ., 2004; Chang ve diğ., 2007), ekstraembriyonik membranların maternal (desidua) kısmından elde edilen MKH (dMKH) popülasyonlarından daha sınırlı bir ömre sahip olduğu belirtilmiştir (Portmann-Lanz ve diğ., 2006; Okamoto ve diğ., 2007; Soncini ve diğ., 2007). Ayrıca, dMKH'nin klonal alt popülasyonları, her üç germ tabakasının dokularına da farklılaşma potansiyeli ile ilişkilendirilmiştir (Macias ve diğ., 2010).

Maternal-fetal arayüz, önemli bir MKH kaynağıdır (Atkinson ve diğ., 2005; Schwab ve Gargett, 2007; Cutler ve diğ., 2010). Yapılan çalışmalar; göbek kordonu ve desidua türevli MKH'lerin PE'de bozulmuş proliferasyon, anjiyogenez ve immünoregülasyon sebebiyle değişime uğradığını göstermiştir (Chen ve diğ., 2015; Nuzzo ve diğ., 2017). Bir diğer çalışma, PE hastası gebelerde sağlıklı gebelere kıyasla plasenta kökenli MKH'lerde sitokin seviyelerinde aşırı artış gözlemlendiğini bildirmiştir (Hwang ve diğ., 2010). Bu bulgular anormal MKH'lerin PE gelişimine neden olabileceğinin kanıtlarıdır.

Periferik kan kökenli MKH'ler, CD44, CD54, CD105 (SH2) ve CD166 yüzey moleküllerini ifade ederken, CD14, CD34, CD45 veya CD31 yüzey moleküllerini ifade etmemektedir (Cao, Dong ve Dong, 2005). Kassis ve diğ. CD90 ve CD105 (SH2) ifadesi için pozitif olan ve CD45 ve CD34 için negatif olan kan kökenli MKH'leri izole etmiştir (Jörn ve diğ., 2010). Tondreau ve diğ. kemik iliği kökenli MKH ve periferik kan kökenli MKH'nin akış sitometrisi analizlerini gerçekleştirmiş ve benzer anlatım modellerini, yani CD44, CD105 (SH2) ve CD73 (SH3) 'ün varlığı ve CD14, CD34, CD45 ve HLA-II'nin yokluğunu ortaya çıkarmıştır (Tondreau ve diğ., 2005).

Kök hücrelerin ana kaynağının esas olarak kemik iliğinden elde edildiği ve kemik iliğinin mevcut MKH'lerin büyük çoğunluğunu içeren vücuttaki tek doku olduğu literatürde yerini almıştır (Jiang ve diğ., 2002; Yoo ve diğ., 2005). İnsanda, kan dolaşımında MKH'lerin tespit edilip edilemeyeceği konusunda tartışmalar vardır. Roufosse ve diğerlerine göre, doku hasar gördüğünde MKH'ler yenilenmeyi desteklemek için kan yoluyla kemik iliğinden hasarlı bölgeye taşınırlar (Roufosse ve diğ., 2004). Normal gebelik, implantasyon gerçekleşmeden önce adet döngüsünün luteal fazında belirgin hale gelen ve gebelik ilerledikçe gelişen hafif sistemik inflamatuvar yanıt ile karakterize edilir. Preeklampside ise normal gebelikte meydana gelen inflamatuvar yanıt daha büyük bir yoğunlukta meydana geldiği (Redman ve Sargent, 2003) dolayısıyla MKH sayısında da artış olabileceği düşünülmektedir.

MikroRNA'lar (miRNA'lar), 21-25 nükleotid uzunluğunda küçük, kodlama yapmayan endojen RNA molekülleridir (Lee ve Ambros, 2001). Tek bir miRNA birden fazla geni hedefleyebilirken birkaç miRNA da aynı geni düzenleyebilmektedir. Bu karmaşık ağ, tek bir miRNA ile çoklu genlerin anlatımlarını düzenler. Çeşitli miRNA kombinasyonları, gen anlatımının düzenlenmesinde de rol almaktadır (Vasudevan, 2012). MiRNA'lar, 5' şapkalı ve poliadenillenmiş primer transkriptlerin (pri-miRNA'lar) bir parçası olarak RNA polimeraz II tarafından kopyalanır (Ha ve Kim, 2014). Özellikle mRNA'nın 3' anlatım yapmayan bölgesi (3'-UTR) ile doğrudan etkileşime girerek, hedef genin ana fonksiyonunun transkripsiyon/translasyon baskısı ile engellenmesinde önemli roller oynamaktadır. Ayrıca, bazı mRNA'lar, farklı miRNA'lar için çoklu bağlanma bölgelerine sahip olup karmaşık bir düzenleme ağı içinde yer alırlar (Wu ve diğ., 2018). Genel olarak, miRNA'ların hücreSEL büyüme, organogenez, invazyon, göç, apoptoz gibi birçok patolojik ve fizyolojik sürece dahil olduğu bilinmektedir (Sergi ve diğ., 2017). Var olan bulgular, miRNA'ların analizinin, diyabetten (Amr ve diğ., 2018) tümörögeneze kadar çeşitli hastalıkların incelenmesinde faydalı olacağını göstermektedir (Al-Haidari ve diğ., 2018; Farran ve diğ., 2018). Ayrıca, miRNA çalışmaları RNA-bazlı tedavilerde teknolojik ilerlemeleri hızlandırmıştır. MiRNA'lar artık potansiyel yeni nesil ilaçlar olarak çalışılmaktadır. PE hastalarının plazmalarında yapılan bir miRNA anlatım profili çalışması, PE ile ilişkili farklılaşmış miRNA'ların çoğunu araştırmıştır (Zhu ve diğ., 2009). Bugüne kadar birçok çalışma, miRNA'ların plasenta gelişiminde özel bir rol oynadığını ve PE'nin erken dönemde taranmasında daha fazla miRNA'nın biyobelirteçler için aday olabileceğini ortaya koymuştur (Noack ve diğ., 2011; Niu ve diğ., 2018).

Bu tez kapsamında amacımız, PE hastası ve sağlıklı gebelerden elde edilen plasenta ve kan kökenli MKH’lerde miRNA anlatım farklılıklarını belirlemek ve ardından biyoinformatik programlar yardımı ile aday miRNA’ların hedef gen analizini yapmaktır. Bu amaç doğrultusunda, çalışma grubumuzun daha önce PE hastaları ve sağlıklı gebelerin plazma ve plasenta örnekleri ile yaptığı mikrodizilim çalışmasında hem plazma hem de plasentada ortak olarak anlamlı farklılık görülen ve qRT-PZR ile valide edilen miRNA’lar (let-7b-3p, miR-191-3p, miR-550a-5p, miR-33b-3p, let-7f-1-3p ve miR-425-3p) kullanılmıştır (Günel ve diğ., 2017).

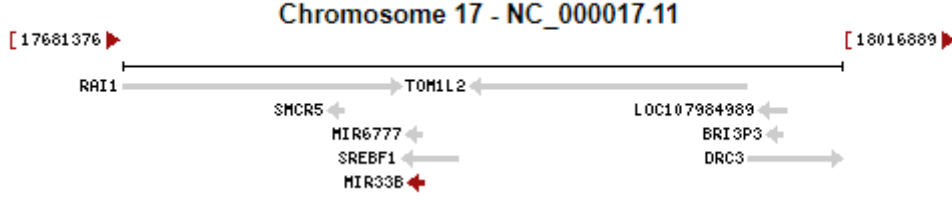
Tez çalışmasında, 7 PE hastası ve 7 sağlıklı gebeden alınan toplamda 14 plasenta (desidua tabakası) ve 14 periferel kan örneği ile çalışılmıştır. Desidua ve periferel kan örnekleri MKH kültürüne alınarak 3-4 pasaj boyunca kültüre edilmiş ve ardından saf MKH eldesi için kök hücre ayırımı (“sorting”) işlemi gerçekleştirilmiştir. Kök hücre ayırımı sırasında floresan işaretli PerCP CD105 ve FITC CD73 hücre yüzey belirteçleri açısından pozitif, APC CD45 ve PE CD34 hücre yüzey belirteçlerini açısından negatif MKH’ler seçilmiştir. Elde edilen hücrelerle yapılan total RNA izolasyonunun ardından cDNA sentezi gerçekleştirilmiş ve ddPZR tabanlı miRNA analizi yapılmıştır.

Desidua kökenli 14 örneğe ait MKH’nin ddPZR sonuçları parametrik olmayan “*Mann Whitney Test*” ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Analiz sonucunda, miR-33b-3p ($p=0,004$, AUC=0,93) anlamlı olarak değerlendirilirken, let-7b-3p ($p=0,38$, AUC=0,65), let-7f-1-3p ($p=0,8$, AUC=0,55), miR-191-3p ($p=0,09$, AUC=0,77), miR-550a-5p ($p=0,053$, AUC=0,81) ve miR-425-3p ($p=0,71$, AUC=0,57) anlamlı bulunmamıştır. Analizi yapılan 6 miRNA’dan let-7b-3p’de 1,52, miR-191-3p’de 1,83, miR-550a-5p’de 1,95 ve miR-33b-3p’de 4,5 kat artış görülürken let-7f-1-3p ve miR-425-3p’de herhangi bir artış görülmemiştir.

Periferel kan kökenli MKH’lerin akış sitometrisi ile ayırımı sırasında cihazda oluşan teknik bir aksaklıktan dolayı sadece 3 sağlıklı ve 2 PE hastası örneğin ayrımları gerçekleştirilmiştir. Bu sebeple, örnek sayısı yetersiz olduğundan ddPZR analizi sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizi yapılamamıştır. ddPZR ile miRNA analizi sonucu U6 snRNA ile normalize edilen veriler Tablo 4.5’te verilmiştir.

Hsa-miR-33b, insan miR-33 ailesinin bir üyesidir ve insan SREBP-1 geninin intron 17 bölgesinde bulunur (Rayner ve diğ., 2010; Horie ve diğ., 2013). miR-33b’nin ABCA1, AMPK

ve SIRT6 genlerini hedefleyerek lipid metabolizmasını ve kolesterol homeostazisini düzenlediği bildirilmiştir (Rottiers ve diğ., 2011).



Şekil 5.1: miR-33b-3p'nin insan genomundaki lokalizasyonu.

Aday miRNA'lar için “*miRO 2.0*” veritabanı kullanılarak biyoinformatik tabanlı hedef gen ve yolak analizi çalışmaları da yapılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.6, Tablo 4.7 ve Şekil 4.11'de verilmiştir. Yapılan analizde, aday miRNA'ların (let-7b-3p, miR-191-3p, miR-550a-5p, miR-33b-3p, let-7f-1-3p ve miR-425-3p) ortak olarak bulundukları yolaklar, anlamlı olarak bulunan miR-33b-3p ile preeklampsinin ortak olarak bulundukları yolaklar ve miR-33b-3p'nin hedef genleri veri tabanında analiz edilmiştir. Analiz sonucunda, TGFB1'in miR-33b-3p'nin hedefi olduğu ve biyoinformatik analiz sonucunda preeklampside de etkili olduğu görülen syndecan-2 aracılı sinyal yolağında, VEGF ve VEGFR sinyallenme ağında, MAPK sinyal yolağında, mTOR sinyal yolağında, Akt aracılı sınıf I PI3K sinyallenmede ve fokal adezyon kinaz aracılı sinyallenmede rol aldığı bulunmuştur.

Aday miR-33b-3p'nin hedefi olan TGFB1 geni, protein süper ailelerinden olan transforme edici büyüme faktörü betadan (TGFB) salgılanan ligandlardan biridir. Bu ailenin ligandları çeşitli TGFB reseptörlerine bağlanırlar ve gen anlatımını düzenleyen SMAD ailesi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu sağlarlar. Kodlanmış preproprotein, “*latency-associated peptide*” (LAP) ve olgun bir peptid üretmek için proteolitik olarak işlenir. Bir olgun peptid homodimerinden, bir LAP homodimerinden ve bir gizli TGFB bağlayıcı proteinden oluşan latent bir formda veya sadece olgun peptid homodimerinden oluşan aktif bir formda bulunur. Olgun peptid ayrıca diğer TGFB ailesi üyeleriyle heterodimerler oluşturabilir. Bu kodlanmış protein, hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve büyümesini düzenler ve ayrıca interferon gama ve tümör nekroz faktörü alfa dahil diğer büyüme faktörlerinin anlatımını ve aktivasyonunu düzenleyebilir. Bu genin anlatımı, tümör hücrelerinde sıklıkla artar (NCBI).

İnsan plasenta dokusunun bir TGFB kaynağı olduğu ve yüksek TGFB mRNA aktivitesi ifade ettiği gösterilmiştir (Dungy, Siddiqi ve Khan, 1991). TGFB'nin trofoblast-endometriyal etkileşim ve trofoblast farklılaşmasının parakrin düzenlemesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Caniggia ve diğ., 1999). Dolayısıyla, büyüme faktörlerinin TGFB süper ailesinin üyelerinin, trofoblastların invazif bir fenotipe doğru farklılaşmasını önleyerek preeklampsi patogeneğinde rol oynayabileceği tahmin edilmektedir.

Hücre yüzeyi proteoglikanları, hücre dışı mikro çevrenin bileşenleri ile etkileşimler dahil olmak üzere birçok fonksiyonda yer alır ve hücre şekli, yapışması, çoğalması ve farklılaşmasında etkilidir. Ayrıca çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinlerin etkilerini bağlamaya ve düzenlemeye yardımcı olmak için koreseptörler olarak hareket edebilirler. Sindekan ailesi üyeleri (sindekan-1 ve sindekan-2), bir hücre yüzeyi proteoglikan sınıfıdır (Bernfield ve diğ., 1992). Syndecan-2, kemik gelişimi ve osteoblast farklılaşması sırasında ifade edilir ve ana kaynağı mezenkimal hücreler olarak görülmektedir (David ve diğ., 1993; Essner, Chen ve Ekker, 2006). Worapamorn ve diğerleri; çeşitli proinflatuar sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin, hücre yüzeyi proteoglikan ifadesini düzenleyebileceği hipotezine dayanarak bir çalışma gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada periodontal ligament fibroblast hücreleri, osteoblastlar ve diş eti fibroblast hücrelerinin *in vitro* stimülasyonunun syndecan-1 ve syndecan-2 sentezi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. TGFB'ye cevaben osteoblastlarda syndecan-2 mRNA seviyelerinin arttığı bulgusunun, osteoblastlarda ve periodontiyumun gelişmesi sırasında devam eden kemik oluşumu bölgelerinde görülen sindekan-2'nin farklılaşmış anlatımına ve dağılımına uyduğu belirtilmiştir (Worapamorn ve diğ., 2000, 2002).

PI3K/Akt/mTOR; doğrudan hücre proliferasyonu, hücre döngüsü, karsinogenez ve uzun ömürlülük ile ilgili önemli bir hücre içi sinyal yolağıdır (Vadlakonda, Pasupuleti ve Pallu, 2013; Wang ve diğ., 2015). PI3K fosforilasyonundan sonra, Akt aktive edilir ve plazma zarına yerleştirilir. Sinyal Akt vasıtasıyla; CREB (siklik adenosin 3,5-monofosfat duyarlı element bağlama proteini) aktivasyonu, p27 inhibisyonu, sitoplazmada FOXO'nun (Forkhead Box O) lokalizasyonu ve mTOR aktivasyonu (p70 veya 4EBP1'in transkripsiyonunu etkileyerek) gibi farklı hedeflere iletilir (Dienstmann ve diğ., 2014).

Serin/treonin protein kinaz olan MAPK'ler; sitokinler, nörotransmitterler, hormonlar, hücre stresi ve hücre yapışması gibi farklı hücre dışı uyarılarla aktive edilir (Han ve diğ., 2018). Aktive edilmiş MAPK'ler nükleer transkripsiyon faktörünü fosforile edebilir ve daha sonra

doku fibrozisine katılan ilgili genlerin transkripsiyonunu düzenleyebilir (Lee ve diğ., 2013). Memeliler için, MAPK süper ailesinin üyeleri temel olarak ERK, p38 MAPK ve c - JUN, NH2 - terminal protein kinazı (JNK) içerir (Wang ve diğ., 2014). Tian ve diğerlerinin (2019) yaptığı çalışma, MAPK sinyal yolunun TGFB1 ile indüklenen pulmoner fibrozisin sinyal iletiminde aktive edilebileceğini göstermesine rağmen, yine de türler ve hücre tipleri arasında farklılıklar olduğu belirtilmiştir (Xi ve diğ., 2013).

Ji ve diğ. (2017)'nin PE hastalarının desidua dokularıyla yaptığı çalışmada, anlatımı artan miR-136'nın antiapoptotik bir hedef olan BCL-2'yi baskılayarak MKH apoptozunun artmasına neden olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda miR-136'nın anjiyogenezin en yaygın promotörlerinden biri olan VEGF'yi hedefleyerek MKH'lerde trofoblast hücrelerinin invazyonunu inhibe ettiği ve PE patogeneğinde rol aldığı da aynı grup tarafından ortaya çıkarılmıştır.

PE hastalarında MKH ve miR-495 arasındaki ilişkiyi araştıran Li ve diğ. (2017), göbek kordonu dokusunda ve MKH'lerinde miR-495'in anlatımının arttığı sonucuna varmıştır. Anlatımı artan miRNA'nın hücre döngüsünü S fazında durdurduğunu ve hücre apoptozunu teşvik ettiğini göstermiştir.

Chen ve diğ. (2015) PE gelişiminde fazla anlatım yapan miRN'ların rolünü açıklamak için MKH'ler ve miR-494 arasındaki ilişki üzerine çalışmalar yapmış ve anlatımı artan miR-494'ün CDK6, CCND1 ve VEGF'nin anlatımını azaltarak MKH'lerin büyüme ve parakrin fonksiyonlarını inhibe ettiğini göstermiştir. Yapılan çalışma, miR-494'ün hücre döngüsünü G1/S fazında durdurduğunu ve MKH'lerin VEGF salgılama fonksiyonunu etkilediğini ortaya çıkarmıştır.

Zhao ve diğ. (2014)'nin PE hastası ve sağlıklı gebelerin desidua dokularından izole edilen MKH'ler ile yaptığı mikrodizilim çalışmasında 21 miRNA'nın anlatımı artarken 28 miRNA'nın anlatımı azalmıştır. İstatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirilen sonuçlarda miRNA'ların farklılaşma oranları 2 kattan daha fazladır. MiR-136, miR-495, miR-16, miR-29b, miR-140-5p, miR-30a, miR-100, miR-494 ve miR-221'in dahil olduğu anlatımı artan 9 miRNA ve anlatımı azalan miR-1207-5p qPZR ile valide edilmiştir.

Wang ve diğ. (2012), PE hastası ve sağlıklı gebelerden elde edilen dMKH'ler ile yaptıkları mikrodizilim çalışmasında, PE dMKH'lerde miR-16 anlatım seviyesinin normal gebelere göre

arttığını bildirmiştir. Araştırmacılar aynı zamanda PE dMKH'lerde proliferasyon aktivitesinde azalma görüldüğünü ve miR-16'nın dMKH'lerde proliferasyonu inhibe ettiğini ve hücrelerin G₀/G₁ fazında duraklamasına sebep olduğunu bildirmiştir. Yapılan diğer çalışmalar da miR-16'nın hücre proliferasyonunu düzenlediğini (Balakrishnan ve diğ., 2010; Wang ve diğ., 2011) ve hücre döngüsünde görevli genler aracılığıyla hücre döngüsünü G₀/G₁ fazında duraklatarak bu süreci kontrol ettiğini kanıtlamıştır (Linsley ve diğ., 2007; Liu ve diğ., 2008; Bandi ve diğ., 2009). Wang ve diğ. (2012) yaptıkları çalışmada G₁-S geçişini düzenleyen CCNE1, CCND1, CDK2 ve CDK6'nın anlatım seviyelerini incelemiş ancak yalnızca CCNE1'in miR-16 tarafından baskılandığını gözlemlemiştir. dMKH'ler tarafından salgılanan VEGF-A, trofoblast hücrelerinin göçünde etkilidir ve aynı zamanda miR-16'nın da olası hedefleri arasındadır. Wang ve diğ. (2012), dMKH'lerden VEGF-A salınmasının miR-16'nın anlatımındaki artış sebebiyle inhibe edildiğini kanıtlamıştır.

Liu ve diğ. (2012), PE hastaları ile yaptıkları çalışmada normal gebelerle karşılaştırıldığında miR-181a'nın MKH'lerde anlatımının arttığını belirtmektedir. Araştırmacılar aynı zamanda, TGFB sinyal yolağı düzenleyicilerinden olan TGFBR1 ve TGFBRAP1'in miR-181a tarafından düzenlendiğini bulmuşlardır. Yapılan deneylerde miR-181a'nın TGFB sinyal yolağı üzerinde inhibe edici bir rol oynadığı ve MKH proliferasyonunu engellediği görülmüştür. MiR-181a ayrıca, mitojen-aktifleştirilmiş protein kinaz ("*mitogen-activated protein kinase*") (MAPK) yolağını ve *in vitro* ve *in vivo* olarak zayıflatılmış MKH'lerin immün baskılayıcı özelliklerini aktive ederek IL-6, VEGF ve indoleamin 2,3-dioksijenaz (IDO) ifadesini arttırdığı görülmüştür. Bu nedenle Liu ve diğerlerinin elde ettiği veriler, miR-181a aktivitesinin PE'de etkili olduğunu ve miR-181a'nın anormal şekilde anlatımının artmasının, PE hastalarında TGFB sinyallenmesinin azalmasına ve MAPK sinyalinin ise artmasına yol açtığını göstermektedir.

Tez kapsamında yapılan analizlere göre, miR-33b-3p'nin ($p=0,004$, AUC=0,93) PE hastalığının tespitinde MKH'lerde biyobelirteç olarak kullanılabileceği öngörülmektedir. Ayrıca, analizi yapılan let-7b-3p'de 1,52, miR-191-3p'de 1,83, miR-550a-5p'de 1,95 kat artış görülmesine rağmen yapılan biyoinformatik analizlerde bu miRNA'lar anlamlı bulunmamıştır. Bunun sebebinin örnek sayısının az olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- ACOG, 2019, *Hyperthension in Pregnancy*. [https://www.acog.org/~media/Task Force and Work Group Reports/public/HypertensioninPregnancy.pdf](https://www.acog.org/~media/Task_Force_and_Work_Group_Reports/public/HypertensioninPregnancy.pdf) (Ziyaret tarihi: 10 Haziran 2019).
- Agatisa, P. K., Ness, R. B., Roberts, J. M., Costantino, J. P., Kuller, L. H. ve McLaughlin, M. K., 2004, Impairment of endothelial function in women with a history of preeclampsia: an indicator of cardiovascular risk, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 286(4), H1389–H1393.
- Al-Haidari, A., Algaber, A., Madhi, R., Syk, I. ve Thorlacius, H., 2018, MiR-155-5p controls colon cancer cell migration via post-transcriptional regulation of Human Antigen R (HuR), *Cancer Letters*, 421, 145–151.
- Al-Mufti, R., Hambley, H., Albaiges, G., Lees, C. ve Nicolaides, K. H., 2000, Increased fetal erythroblasts in women who subsequently develop pre-eclampsia, *Human Reproduction*, Narnia, 15(7), 1624–1628.
- Al, R. A., Baykal, C., Karacay, O., Geyik, P. O., Altun, S. ve Dolen, I., 2004, Random urine protein-creatinine ratio to predict proteinuria in new-onset mild hypertension in late pregnancy, *Obstetrics and Gynecology*, 367–371.
- Alfirevic, Z., Roberts, D. ve Martlew, V., 2002, How strong is the association between maternal thrombophilia and adverse pregnancy outcome? A systematic review, *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 6–14.
- Almeida, M. I., Reis, R. M. ve Calin, G. A., 2011, MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 717(1–2), 1–8.
- Ambros, V. ve Horvitz, H. R., 1987, The lin-14 locus of *Caenorhabditis elegans* controls the time of expression of specific postembryonic developmental events., *Genes & development*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1(4), 398–414.
- Ami, D., Neri, T., Natalello, A., Mereghetti, P., Doglia, S. M., Zanoni, M., Zuccotti, M., Garagna, S. ve Redi, C. A., 2008, Embryonic stem cell differentiation studied by FT-IR spectroscopy, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1783(1), 98–106.
- Amr, K., Abdelmawgoud, H., Ali, Z., Shehata, S. ve Raslan, H., 2018, Potential value of circulating microRNA-126 and microRNA-210 as biomarkers for type 2 diabetes with coronary artery disease, *British Journal of Biomedical Science*, 75(2), 82–87.
- in 't Anker, P. S., Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., de Groot-Swings, G. M. J. S., Claas, F. H. J., Fibbe, W. E. ve Kanhai, H. H. H., 2004, Isolation of Mesenchymal Stem Cells of Fetal or Maternal Origin from Human Placenta, *Stem Cells*, 22(7), 1338–1345.
- Arab, S., Gramolini, A. O., Ping, P., Kislinger, T., Stanley, B., van Eyk, J., Ouzounian, M., MacLennan, D. H., Emili, A. ve Liu, P. P., 2006, Cardiovascular Proteomics: Tools to Develop Novel Biomarkers and Potential Applications, *Journal of the American College of Cardiology*, Elsevier, 48(9), 1733–1741.

- Atkinson, K., Chatterjee, K., Barlow, S. ve Brooke, G., 2005, Potential for Mesenchymal Stem Cell Isolation from Human Placenta., *Blood*, 106(11).
- Babiarz, J. E., Ruby, J. G., Wang, Y., Bartel, D. P. ve Blelloch, R., 2008, Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs, *Genes & Development*, 22(20), 2773–2785.
- Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R. ve Pasquinelli, A. E., 2005, Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs Results in Target mRNA Degradation, *Cell*, 122(4), 553–563.
- Bai, Y., Yang, W., Yang, H., Liao, Q., Ye, G., Fu, G., Ji, L., Xu, P., Wang, H., Li, Y., Peng, C. ve Wang, Y., 2012, Downregulated miR-195 Detected in Preeclamptic Placenta Affects Trophoblast Cell Invasion via Modulating ActRIIA Expression, *PLoS ONE*, Edited by K. Sun, 7(6), e38875.
- Bailo, M., Soncini, M., Vertua, E., Signoroni, P. B., Sanzone, S., Lombardi, G., Arienti, D., Calamani, F., Zatti, D., Paul, P., Albertini, A., Zorzi, F., Cavagnini, A., Candotti, F., Wengler, G. S. ve Parolini, O., 2004, Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta., *Transplantation*, 78(10), 1439–48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15599307>.
- Balakrishnan, A., Stearns, A. T., Park, P. J., Dreyfuss, J. M., Ashley, S. W., Rhoads, D. B. ve Tavakkolizadeh, A., 2010, MicroRNA mir-16 is anti-proliferative in enterocytes and exhibits diurnal rhythmicity in intestinal crypts., *Experimental cell research*, NIH Public Access, 316(20), 3512–21.
- Bandi, N., Zbinden, S., Gugger, M., Arnold, M., Kocher, V., Hasan, L., Kappeler, A., Brunner, T. ve Vassella, E., 2009, miR-15a and miR-16 Are Implicated in Cell Cycle Regulation in a Rb-Dependent Manner and Are Frequently Deleted or Down-regulated in Non–Small Cell Lung Cancer, *Cancer Research*, 69(13), 5553–5559.
- de Bang, T. C., Shah, P., Cho, S. K., Yang, S. W. ve Husted, S., 2014, Multiplexed microRNA Detection Using Lanthanide-Labeled DNA Probes and Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, American Chemical Society, 86(14), 6823–6826.
- Barlow, S., Brooke, G., Chatterjee, K., Price, G., Pelekanos, R., Rossetti, T., Doody, M., Venter, D., Pain, S., Gilshenan, K. ve Atkinson, K., 2008, Comparison of Human Placenta- and Bone Marrow–Derived Multipotent Mesenchymal Stem Cells, *Stem Cells and Development*, 17(6), 1095–1108.
- Beermann, J., Piccoli, M.-T., Viereck, J. ve Thum, T., 2016, Non-coding RNAs in Development and Disease: Background, Mechanisms, and Therapeutic Approaches, *Physiological Reviews*, 96(4), 1297–1325.
- Belgrader, P., Tanner, S. C., Regan, J. F., Koehler, R., Hindson, B. J. ve Brown, A. S., 2013, Droplet Digital PCR Measurement of HER2 Copy Number Alteration in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Breast Carcinoma Tissue, *Clinical Chemistry*, 59(6), 991–994.
- Beltrami, A. P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B. ve Anversa, P., 2003, Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration,

Cell, 114(6), 763–776.

- Benian, A., Uzun, H., Aydın, S., Albayrak, M., Uludağ, S. ve Madazli, R., 2008, Placental stem cell markers in pre-eclampsia, *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 100(3), 228–233.
- Bernfield, M., Götte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J. ve Zako, M., 1999, Functions of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans, *Annual Review of Biochemistry*, 68(1), 729–777.
- Bernfield, M., Kokenyesi, R., Kato, M., Hinkes, M. T., Spring, J., Gallo, R. L. ve Lose, E. J., 1992, Biology of the Syndecans: A Family of Transmembrane Heparan Sulfate Proteoglycans, *Annual Review of Cell Biology*, 8(1), 365–393.
- Bhaskaran, M. ve Mohan, M., 2014, MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease, *Veterinary Pathology*, 51(4), 759–774.
- Blumenfeld, J. D. ve Laragh, J. H., 2001, Management of hypertensive crises: the scientific basis for treatment decisions., *American journal of hypertension*, 14(11 Pt 1), 1154–67.
- Blumenstein, M., McMaster, M. T., Black, M. A., Wu, S., Prakash, R., Cooney, J., McCowan, L. M. E., Cooper, G. J. S. ve North, R. A., 2009, A proteomic approach identifies early pregnancy biomarkers for preeclampsia: Novel linkages between a predisposition to preeclampsia and cardiovascular disease, *Proteomics*, John Wiley & Sons, Ltd, 9(11), 2929–2945.
- Boggess, K. A., Lieff, S., Murtha, A. P., Moss, K., Beck, J. ve Offenbacher, S., 2003, Maternal periodontal disease is associated with an increased risk for preeclampsia., *Obstetrics and gynecology*, 101(2), 227–31.
- Bohn, H., Kraus, W. ve Winckler, W., 1983, Purification and characterization of two new soluble placental tissue proteins (PP13 and PP17)., *Oncodevelopmental biology and medicine : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 4(5), 343–50.
- Bonomi, A., Silini, A., Vertua, E., Signoroni, P. B., Coccè, V., Cavicchini, L., Sisto, F., Alessandri, G., Pessina, A. ve Parolini, O., 2015, Human amniotic mesenchymal stromal cells (hAMSCs) as potential vehicles for drug delivery in cancer therapy: an in vitro study., *Stem cell research & therapy*, BioMed Central, 6(1), 155.
- Bork, S., Pfister, S., Witt, H., Horn, P., Korn, B., Ho, A. D. ve Wagner, W., 2010, DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells, *Aging Cell*, Wiley-Blackwell, 9(1), 54.
- Brandl, A., Meyer, M., Bechmann, V., Nerlich, M. ve Angele, P., 2011, Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells, *Experimental Cell Research*, 317(11), 1541–1547.
- Brooke, G., Tong, H., Levesque, J.-P. ve Atkinson, K., 2008, Molecular Trafficking Mechanisms of Multipotent Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Bone Marrow and Placenta, *Stem Cells and Development*, 17(5), 929–940.
- Brosens, I. A., Robertson, W. B. ve Dixon, H. G., 1972, The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia., *Obstetrics and gynecology annual*, 1, 177–91.

- Broughton, J. P., Lovci, M. T., Huang, J. L., Yeo, G. W. ve Pasquinelli, A. E., 2016, Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity, *Molecular Cell*, 64(2), 320–333.
- Brown, M. A., Hague, W. M., Higgins, J., Lowe, S., McCowan, L., Oats, J., Peek, M. J., Rowan, J. A. ve Walters, B. N., 2000, The detection, investigation and management of hypertension in pregnancy: executive summary, *The Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 40(2), 133–138.
- Brown, M. A., Zammit, V. C., Mitar, D. A. ve Whitworth, J. A., 1992, Renin-aldosterone relationships in pregnancy-induced hypertension., *American journal of hypertension*, 5(6 Pt 1), 366–71.
- Buchbinder, A., Sibai, B. M., Caritis, S., MacPherson, C., Hauth, J., Lindheimer, M. D., Klebanoff, M., VanDorsten, P., Landon, M., Paul, R., Miodovnik, M., Meis, P. ve Thurnau, G., 2002, Adverse perinatal outcomes are significantly higher in severe gestational hypertension than in mild preeclampsia, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Mosby, 186(1), 66–71.
- Buhimschi, I. A., Zhao, G., Funai, E. F., Harris, N., Sasson, I. E., Bernstein, I. M., Saade, G. R. ve Buhimschi, C. S., 2008, Proteomic profiling of urine identifies specific fragments of SERPINA1 and albumin as biomarkers of preeclampsia, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Mosby, 199(5), 551.e1–551.e16.
- Burger, O., Pick, E., Zwickel, J., Klayman, M., Meiri, H., Slotky, R., Mandel, S., Rabinovitch, L., Paltieli, Y., Admon, A. ve Gonen, R., 2004, Placental protein 13 (PP-13): effects on cultured trophoblasts, and its detection in human body fluids in normal and pathological pregnancies, *Placenta*, W.B. Saunders, 25(7), 608–622.
- Burton ve Watson, 1997, The Structure of the Human Placenta: Implications for Initiating and Defending Against Virus Infections., *Reviews in medical virology*, 7(4), 219–228.
- Bushati, N. ve Cohen, S. M., 2007, microRNA Functions, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23(1), 175–205.
- Caniggia, I., Grisaru-Gravnosky, S., Kuliszewsky, M., Post, M. ve Lye, S. J., 1999, Inhibition of TGF- β 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies, *Journal of Clinical Investigation*, 103(12), 1641–1650.
- Cao, C., Dong, Yinghai ve Dong, Yuqi, 2005, Study on culture and in vitro osteogenesis of blood-derived human mesenchymal stem cells, *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*, 19(8), 642–7.
- Caplan, A. I., 2007, Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine, *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), 341–347.
- Caplan, A., 2009, Why are MSCs therapeutic? New data: new insight, *The Journal of Pathology*, 217(2), 318–324.
- Carey, D. J., 1997, Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors, *Biochemical Journal*, 327(1), 1–16.
- Caritis, S., Sibai, B., Hauth, J., Lindheimer, M., Klebanoff, M., Thom, E., VanDorsten, P., Landon, M., Paul, R., Miodovnik, M., Meis, P. ve Thurnau, G., 1998, Low-Dose Aspirin

- to Prevent Preeclampsia in Women at High Risk, *The New England journal of medicine*, Massachusetts Medical Society, 338(11), 701–705.
- Castrechini, N. M., Murthi, P., Gude, N. M., Erwich, J. J. H. M., Gronthos, S., Zannettino, A., Brennecke, S. P. ve Kalionis, B., 2010, Mesenchymal stem cells in human placental chorionic villi reside in a vascular Niche, *Placenta*, 31(3), 203–212.
- Cedergren, M. I., 2004, Maternal morbid obesity and the risk of adverse pregnancy outcome., *Obstetrics and gynecology*, 103(2), 219–224.
- Chafetz, I., Kuhnreich, I., Sammar, M., Tal, Y., Gibor, Y., Meiri, H., Cuckle, H. ve Wolf, M., 2007, First-trimester placental protein 13 screening for preeclampsia and intrauterine growth restriction, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Mosby, 197(1), 35.e1-35.e7.
- Chalfie, M., Horvitz, H. R. ve Sulston, J. E., 1981, Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*., *Cell*, 24(1), 59–69.
- Chang, C.-M., Kao, C.-L., Chang, Y.-L., Yang, M.-J., Chen, Y.-C., Sung, B.-L., Tsai, T.-H., Chao, K.-C., Chiou, S.-H. ve Ku, H.-H., 2007, Placenta-derived multipotent stem cells induced to differentiate into insulin-positive cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357(2), 414–420.
- Chen, A., Li, C., Wang, J., Sha, H., Piao, S. ve Liu, S., 2015, Role of Toll-Like Receptor 3 Gene Polymorphisms in Preeclampsia, *Cellular Physiology and Biochemistry*, Karger Publishers, 37(5), 1927–1933.
- Chen, C.-H., Budas, G. R., Churchill, E. N., Disatnik, M.-H., Hurley, T. D. ve Mochly-Rosen, D., 2008, Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart., *Science (New York, N.Y.)*, American Association for the Advancement of Science, 321(5895), 1493–5.
- Chen, L., Tredget, E. E., Wu, P. Y. G. ve Wu, Y., 2008, Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing, *PLoS ONE*, Public Library of Science, 3(4), e1886.
- Chen, S., Zhao, G., Miao, H., Tang, R., Song, Y., Hu, Y., Wang, Z. ve Hou, Y., 2015, MicroRNA-494 inhibits the growth and angiogenesis-regulating potential of mesenchymal stem cells, *FEBS Letters*, 589(6), 710–717.
- Cheng, Y., Lei, J., Chen, Y. ve Ju, H., 2014, Highly selective detection of microRNA based on distance-dependent electrochemiluminescence resonance energy transfer between CdTe nanocrystals and Au nanoclusters, *Biosensors and Bioelectronics*, 51, 431–436.
- Chim, S. S. C., Shing, T. K. F., Hung, E. C. W., Leung, T.-Y., Lau, T.-K., Chiu, R. W. K. ve Lo, Y. M. D., 2008, Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma., *Clinical chemistry*, Clinical Chemistry, 54(3), 482–90.
- Chiu, R. W. K. ve Lo, Y. M. D., 2004, The Biology and Diagnostic Applications of Fetal DNA and RNA in Maternal Plasma, *Current Topics in Developmental Biology*, Academic Press, 61, 81–111.
- Cho, W. C. ve Cheng, C. H., 2007, Oncoproteomics: current trends and future perspectives, *Expert Review of Proteomics*, 4(3), 401–410.

- Chong, P.-P., Selvaratnam, L., Abbas, A. A. ve Kamarul, T., 2012, Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells, *Journal of Orthopaedic Research*, 30(4), 634–642.
- Christensen, J. L., Wright, D. E., Wagers, A. J. ve Weissman, I. L., 2004, Circulation and Chemotaxis of Fetal Hematopoietic Stem Cells, *PLoS Biology*, Edited by Douglas Melton, Public Library of Science, 2(3), e75.
- Christianson, R. E., 1976, Studies on blood pressure during pregnancy. I. Influence of parity and age., *American journal of obstetrics and gynecology*, 125(4), 509–13.
- Cissell, K. A., Rahimi, Y., Shrestha, S., Hunt, E. A. ve Deo, S. K., 2008, Bioluminescence-Based Detection of MicroRNA, miR21 in Breast Cancer Cells, *Analytical Chemistry*, 80(7), 2319–2325.
- Coen, G., Cugini, P., Gerlini, G., Finistauri, D. ve Cinotti, G. A., 1985, Successful treatment of long-lasting severe hypertension with captopril during a twin pregnancy., *Nephron*, Karger Publishers, 40(4), 498–500.
- Conde-Agudelo, A. ve Romero, R., 2009, Tests to Predict Preeclampsia, *Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy*, Academic Press, 189–211.
- Conde-Agudelo, A., Villar, J. ve Lindheimer, M., 2004, World Health Organization Systematic Review of Screening Tests for Preeclampsia, *Obstetrics & Gynecology*, 104(6), 1367–1391.
- Cope, I., 1961, Plasma and blood volume changes in pregnancies complicated by pre-eclampsia, *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 68(3), 413–416.
- Cornelis, T., Odutayo, A., Keunen, J. ve Hladunewich, M., 2011, The Kidney in Normal Pregnancy and Preeclampsia, *Seminars in Nephrology*, 31(1), 4–14.
- Cotter, A. M., Martin, C. M., O'Leary, J. J. ve Daly, S. F., 2004, Increased fetal DNA in the maternal circulation in early pregnancy is associated with an increased risk of preeclampsia, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Mosby, 191(2), 515–520.
- Cotter, A. M., Martin, C. M., O'Leary, J. J. ve Daly, S. F., 2005, Increased fetal RhD gene in the maternal circulation in early pregnancy is associated with an increased risk of pre-eclampsia, *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 112(5), 584–587.
- Cross, J. C., Werb, Z. ve Fisher, S. J., 1994, *Implantation and the placenta: Key pieces of the development puzzle*, Science.
- Crowley, A., Martin, C., Fitzpatrick, P., Sheils, O., O'Herlihy, C., O'Leary, J. J. ve Byrne, B. M., 2007, Free fetal DNA is not increased before 20 weeks in intrauterine growth restriction or pre-eclampsia, *Prenatal Diagnosis*, John Wiley & Sons, Ltd, 27(2), 174–179.
- Cutler, A. J., Limbani, V., Girdlestone, J. ve Navarrete, C. V., 2010, Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells Modulate Monocyte Function to Suppress T Cell Proliferation, *The Journal of Immunology*, 185(11), 6617–6623.

- D'Anna, R., Baviera, G., Giordano, D., Russo, S., Dugo, N., Santamaria, A. ve Corrado, F., 2009, First trimester serum PAPP-A and NGAL in the prediction of late-onset pre-eclampsia, *Prenatal Diagnosis*, John Wiley & Sons, Ltd, 29(11), 1066–1068.
- Von Dadelszen, P. ve Magee, L. A., 2002, Could an infectious trigger explain the differential maternal response to the shared placental pathology of preeclampsia and normotensive intrauterine growth restriction ?, *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 81, 642–648.
- David, G., Bai, X. M., Van der Schueren, B., Marynen, P., Cassiman, J. J. ve Van den Berghe, H., 1993, Spatial and temporal changes in the expression of fibroglycan (syndecan-2) during mouse embryonic development., *Development (Cambridge, England)*, 119(3), 841–854.
- Davis, B. N. ve Hata, A., 2010, Mechanisms of control of microRNA biogenesis, *Journal of Biochemistry*, 148(4), 381–92.
- Davis, E. F., Lazdam, M., Lewandowski, A. J., Worton, S. A., Kelly, B., Kenworthy, Y., Adwani, S., Wilkinson, A. R., McCormick, K., Sargent, I., Redman, C. ve Leeson, P., 2012, Cardiovascular Risk Factors in Children and Young Adults Born to Preeclamptic Pregnancies: A Systematic Review, *Pediatrics*, 129(6), e1552–e1561.
- Day, E., Dear, P. H. ve McCaughan, F., 2013, Digital PCR strategies in the development and analysis of molecular biomarkers for personalized medicine, *Methods*, 59(1), 101–107.
- Dekker, G. ve Robillard, P. Y., 2003, The birth interval hypothesis-does it really indicate the end of the primipaternity hypothesis., *Journal of reproductive immunology*, 59(2), 245–51.
- Dekker, G. ve Sibai, B., 2001, Primary, secondary, and tertiary prevention of pre-eclampsia, *Lancet*, 209–215.
- Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F. ve Hannon, G. J., 2004, Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex, *Nature*, 432(7014), 231–235.
- Dennis Lo, Y. M. ve Chiu, R. W. K., 2007, Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids, *Nature Reviews Genetics*, Nature Publishing Group, 8(1), 71–77.
- Dienstmann, R., Rodon, J., Serra, V. ve Tabernero, J., 2014, Picking the Point of Inhibition: A Comparative Review of PI3K/AKT/mTOR Pathway Inhibitors, *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(5), 1021–1031.
- Dingle, T. C., Sedlak, R. H., Cook, L. ve Jerome, K. R., 2013, Tolerance of Droplet-Digital PCR vs Real-Time Quantitative PCR to Inhibitory Substances, *Clinical Chemistry*, 59(11), 1670–1672.
- Djuranovic, S., Nahvi, A. ve Green, R., 2012, miRNA-Mediated Gene Silencing by Translational Repression Followed by mRNA Deadenylation and Decay, *Science*, 336(6078), 237–240.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. ., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J. ve Horwitz, E. M., 2006, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, 8(4), 315–317.

- Dong, H., Lei, J., Ding, L., Wen, Y., Ju, H. ve Zhang, X., 2013, MicroRNA: Function, Detection, and Bioanalysis, *Chemical Reviews*, 113(8), 6207–6233.
- Douglas, K. A. ve Redman, C. W., 1994, Eclampsia in the United Kingdom., *BMJ (Clinical research ed.)*, 309(6966), 1395–400.
- Duley, L., 2009, The Global Impact of Pre-eclampsia and Eclampsia, *Seminars in Perinatology*, 33(3), 130–137.
- Dungy, L. J., Siddiqi, T. A. ve Khan, S., 1991, Transforming growth factor-beta 1 expression during placental development., *American journal of obstetrics and gynecology*, 165(4 Pt 1), 853–7.
- Dunn, W. B., Brown, M., Worton, S. A., Crocker, I. P., Broadhurst, D., Horgan, R., Kenny, L. C., Baker, P. N., Kell, D. B. ve Heazell, A. E. P., 2009, Changes in the Metabolic Footprint of Placental Explant-Conditioned Culture Medium Identifies Metabolic Disturbances Related to Hypoxia and Pre-Eclampsia, *Placenta*, W.B. Saunders, 30(11), 974–980.
- Durnwald, C. ve Mercer, B., 2003, A prospective comparison of total protein/creatinine ratio versus 24-hour urine protein in women with suspected preeclampsia, in *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Mosby, 848–852.
- Duvekot, J. J., Cheriex, E. C., Pieters, F. A., Menheere, P. P. ve Peeters, L. H., 1993, Early pregnancy changes in hemodynamics and volume homeostasis are consecutive adjustments triggered by a primary fall in systemic vascular tone., *American journal of obstetrics and gynecology*, 169(6), 1382–92.
- Egusa, H., Sonoyama, W., Nishimura, M., Atsuta, I. ve Akiyama, K., 2012, Stem cells in dentistry – Part I: Stem cell sources, *Journal of Prosthodontic Research*, 56(3), 151–165.
- Einarsson, J. I., Sangi-Haghpeykar, H. ve Gardner, M. O., 2003, Sperm exposure and development of preeclampsia., *American journal of obstetrics and gynecology*, 188(5), 1241–3.
- Enquobahrie, D. A., Abetew, D. F., Sorensen, T. K., Willoughby, D., Chidambaram, K. ve Williams, M. A., 2011, Placental microRNA expression in pregnancies complicated by preeclampsia, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 204(2), 178.e12-178.e21.
- Eremina, V., Jefferson, J. A., Kowalewska, J., Hochster, H., Haas, M., Weisstuch, J., Richardson, C., Kopp, J. B., Kabir, M. G., Backx, P. H., Gerber, H.-P., Ferrara, N., Barisoni, L., Alpers, C. E. ve Quaggin, S. E., 2008, VEGF Inhibition and Renal Thrombotic Microangiopathy, *New England Journal of Medicine*, 358(11), 1129–1136.
- Eremina, V. ve Quaggin, S. E., 2004, The role of VEGF-A in glomerular development and function., *Current opinion in nephrology and hypertension*, 13(1), 9–15.
- Eremina, V., Sood, M., Haigh, J., Nagy, A., Lajoie, G., Ferrara, N., Gerber, H.-P., Kikkawa, Y., Miner, J. H. ve Quaggin, S. E., 2003, Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases, *Journal of Clinical Investigation*, 111(5), 707–716.
- Erlebacher, A., 2013, Immunology of the Maternal-Fetal Interface, *Annual Review of Immunology*, 31(1), 387–411.

- Esplin, M. S., Fausett, M. B., Fraser, A., Kerber, R., Mineau, G., Carrillo, J. ve Varner, M. W., 2001, Paternal and Maternal Components of the Predisposition to Preeclampsia, *New England Journal of Medicine*, Massachusetts Medical Society, 344(12), 867–872.
- Esquela-Kerscher, A. ve Slack, F. J., 2006, Oncomirs — microRNAs with a role in cancer, *Nature Reviews Cancer*, 6(4), 259–269.
- Fan, A. C., Deb-Basu, D., Orban, M. W., Gotlib, J. R., Natkunam, Y., O'Neill, R., Padua, R.-A., Xu, L., Taketa, D., Shirer, A. E., Beer, S., Yee, A. X., Voehringer, D. W. ve Felsher, D. W., 2009, Nanofluidic proteomic assay for serial analysis of oncoprotein activation in clinical specimens, *Nature Medicine*, Nature Publishing Group, 15(5), 566–571.
- Fan, Y., Chen, X., Trigg, A. D., Tung, C., Kong, J. ve Gao, Z., 2007, Detection of MicroRNAs Using Target-Guided Formation of Conducting Polymer Nanowires in Nanogaps, *Journal of the American Chemical Society*, 129(17), 5437–5443.
- Fang, S., Lee, H. J., Wark, A. W. ve Corn, R. M., 2006, Attomole Microarray Detection of MicroRNAs by Nanoparticle-Amplified SPR Imaging Measurements of Surface Polyadenylation Reactions, *Journal of the American Chemical Society*, 128(43), 14044–14046.
- Farh, K. K.-H., Grimson, A., Jan, C., Lewis, B. P., Johnston, W. K., Lim, L. P., Burge, C. B. ve Bartel, D. P., 2005, The Widespread Impact of Mammalian MicroRNAs on mRNA Repression and Evolution, *Science*, 310(5755), 1817–1821.
- Farina, A., Sekizawa, A., Iwasaki, M., Matsuoka, R., Ichizuka, K. ve Okai, T., 2004, Total cell-free DNA(β -globin gene) distribution in maternal plasma at the second trimester: a new prospective for preeclampsia screening, *Prenatal Diagnosis*, John Wiley & Sons, Ltd, 24(9), 722–726.
- Farina, A., Sekizawa, A., Purwosunu, Y., Rizzo, N., Banzola, I., Concu, M., Morano, D., Giommi, F., Bevin, M., Mabrook, M., Carinci, P. ve Okai, T., 2006, Quantitative distribution of a panel of circulating mRNA in preeclampsia versus controls, *Prenatal Diagnosis*, John Wiley & Sons, Ltd, 26(12), 1115–1120.
- Farran, B., Dyson, G., Craig, D., Dombkowski, A., Beebe-Dimmer, J. L., Powell, I. J., Podgorski, I., Heilbrun, L., Bolton, S. ve Bock, C. H., 2018, A study of circulating microRNAs identifies a new potential biomarker panel to distinguish aggressive prostate cancer, *Carcinogenesis*, 39(4), 556–561.
- Ferguson, E. L., Sternberg, P. W. ve Horvitz, H. R., 1987, A genetic pathway for the specification of the vulval cell lineages of *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, 326(6110), 259–267.
- Fraser, J. K., Wulur, I., Alfonso, Z. ve Hedrick, M. H., 2006, Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology, *Trends in Biotechnology*, 24(4), 150–154.
- Friedenstein, A. J., Deriglasova, U. F., Kulagina, N. N., Panasuk, A. F., Rudakowa, S. F., Luriá, E. A. ve Ruadkow, I. A., 1974, Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method., *Experimental hematology*, 2(2), 83–92.
- Friedländer, M. R., Lizano, E., Houben, A. J., Bezdan, D., Báñez-Coronel, M., Kudla, G.,

- Mateu-Huertas, E., Kagerbauer, B., González, J., Chen, K. C., LeProust, E. M., Martí, E. ve Estivill, X., 2014, Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs, *Genome Biology*, 15(4), R57.
- Fu, G., Brkić, J., Hayder, H. ve Peng, C., 2013, MicroRNAs in Human Placental Development and Pregnancy Complications, *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 5519–5544.
- Fu, G., Ye, G., Nadeem, L., Ji, L., Manchanda, T., Wang, Y., Zhao, Y., Qiao, J., Wang, Y.-L., Lye, S., Yang, B. B. ve Peng, C., 2013, MicroRNA-376c Impairs Transforming Growth Factor- β and Nodal Signaling to Promote Trophoblast Cell Proliferation and Invasion, *Hypertension*, 61(4), 864–872.
- Fukuchi, Y., Nakajima, H., Sugiyama, D., Hirose, I., Kitamura, T. ve Tsuji, K., 2004, Human Placenta-Derived Cells Have Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Potential, *Stem Cells*, 22(5), 649–658.
- Gant, N. F., Daley, G. L., Chand, S., Whalley, P. J. ve MacDonald, P. C., 1973, A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy, *Journal of Clinical Investigation*, 52(11), 2682–2689.
- Gao, X., Li, H. ve Wei, J.-X., 2018, MiR-4421 regulates the progression of preeclampsia by regulating CYP11B2., *European review for medical and pharmacological sciences*, 22(6), 1533–1540.
- Gao, Y., She, R., Wang, Q., Li, Y. ve Zhang, H., 2018, Up-regulation of miR-299 suppressed the invasion and migration of HTR-8/SVneo trophoblast cells partly via targeting HDAC2 in pre-eclampsia, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 1222–1228.
- Genbacev, O., Joslin, R., Damsky, C. H., Polliotti, B. M. ve Fisher, S. J., 1996, Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia, *Journal of Clinical Investigation*, American Society for Clinical Investigation, 97(2), 540–550.
- Giudice, L. C., Conover, C. A., Bale, L., Faessen, G. H., Ilg, K., Sun, I., Imani, B., Suen, L.-F., Irwin, J. C., Christiansen, M., Overgaard, M. T. ve Oxvig, C., 2002, Identification and Regulation of the IGFBP-4 Protease and Its Physiological Inhibitor in Human Trophoblasts and Endometrial Stroma: Evidence for Paracrine Regulation of IGF-II Bioavailability in the Placental Bed during Human Implantation, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Narnia, 87(5), 2359–2366.
- Gnecchi, M., Zhang, Z., Ni, A. ve Dzau, V. J., 2008, Paracrine Mechanisms in Adult Stem Cell Signaling and Therapy, *Circulation Research*, 103(11), 1204–1219.
- Goldman-Wohl, D. S. ve Yagel, S., 2007, *Examination of distinct fetal and maternal molecular pathways suggests a mechanism for the development of preeclampsia*, *Journal of Reproductive Immunology*, Elsevier.
- Gonen, R., Shahar, R., Grimpel, Y., Chefetz, I., Sammar, M., Meiri, H. ve Gibor, Y., 2008, Placental protein 13 as an early marker for pre-eclampsia: a prospective longitudinal study, *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 115(12), 1465–1472.

- Graybill, R. M. ve Bailey, R. C., 2016, Emerging Biosensing Approaches for microRNA Analysis, *Analytical Chemistry*, 88(1), 431–450.
- Griffiths, M. J., Bonnet, D. ve Janes, S. M., 2005, Stem cells of the alveolar epithelium, *The Lancet*, 366(9481), 249–260.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G. ve Shi, S., 2000, Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and invivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), 13625–13630.
- Gunel, T., Hosseini, M. K., Gumusoglu, E., Kisakesen, H. I., Benian, A. ve Aydinli, K., 2017, Expression profiling of maternal plasma and placenta microRNAs in preeclamptic pregnancies by microarray technology, *Placenta*, 52, 77–85.
- Ha, M. ve Kim, V. N., 2014, Regulation of microRNA biogenesis, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Nature Publishing Group, 15(8), 509–524.
- Hamilton, G. S., Lysiak, J. J., Han, V. K. M. ve Lala, P. K., 1998, Autocrine-Paracrine Regulation of Human Trophoblast Invasiveness by Insulin-like Growth Factor (IGF)-II and IGF-Binding Protein (IGFBP)-1, *Experimental Cell Research*, Academic Press, 244(1), 147–156.
- Han, A., Zou, L., Gan, X., Li, Y., Liu, F., Chang, X., Zhang, X., Tian, M., Li, S., Su, L. ve Sun, Y., 2018, ROS generation and MAPKs activation contribute to the Ni-induced testosterone synthesis disturbance in rat Leydig cells, *Toxicology Letters*, 290, 36–45.
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S. ve Jacobs, R., 2011, Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC, *Cell Communication and Signaling*, 9(1), 12.
- Hauth, J. C., Ewell, M. G., Levine, R. J., Esterlitz, J. R., Sibai, B., Curet, L. B., Catalano, P. M. ve Morris, C. D., 2000, Pregnancy outcomes in healthy nulliparas who developed hypertension. Calcium for Preeclampsia Prevention Study Group., *Obstetrics and gynecology*, 95(1), 24–8.
- Hayes, J., Peruzzi, P. P. ve Lawler, S., 2014, MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy, *Trends in Molecular Medicine*, 20(8), 460–469.
- Heazell, A. E. P., Brown, M., Dunn, W. B., Worton, S. A., Crocker, I. P., Baker, P. N. ve Kell, D. B., 2008, Analysis of the Metabolic Footprint and Tissue Metabolome of Placental Villous Explants Cultured at Different Oxygen Tensions Reveals Novel Redox Biomarkers, *Placenta*, W.B. Saunders, 29(8), 691–698.
- Heinrich, E.-M. ve Dimmeler, S., 2012, MicroRNAs and Stem Cells, *Circulation Research*, Edited by D. Losordo, 110(7), 1014–1022.
- Helewa, M. E., Burrows, R. F., Smith, J., Williams, K., Brain, P. ve Rabkin, S. W., 1997, Report of the Canadian Hypertension Society Consensus Conference: 1. Definitions, evaluation and classification of hypertensive disorders in pregnancy., *CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 157(6), 715–25.
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., Bright, I. J., Lucero, M. Y., Hiddessen, A. L., Legler, T. C., Kitano, T. K., Hodel, M. R., Petersen, J. F., Wyatt, P. W., Steenblock, E. R., Shah, P. H., Bousse, L. J., Troup, C.

- B., Mellen, J. C., *et al.*, 2011, High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number, *Analytical Chemistry*, 83(22), 8604–8610.
- Hnat, M. D., Sibai, B. M., Caritis, S., Hauth, J., Lindheimer, M. D., MacPherson, C., VanDorsten, J. P., Landon, M., Miodovnik, M., Paul, R., Meis, P., Thurnau, G., Dombrowski, M. ve National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine-Units, 2002, Perinatal outcome in women with recurrent preeclampsia compared with women who develop preeclampsia as nulliparas., *American journal of obstetrics and gynecology*, 186(3), 422–6.
- Holzgreve, W., Ghezzi, F., Di Naro, E., Gänshirt, D., Maymon, E. ve Hahn, S., 1998, Disturbed Feto-Maternal Cell Traffic in Preeclampsia, *Obstetrics & Gynecology*, No longer published by Elsevier, 91(5), 669–672.
- Holzgreve, W., Li, J. C., Steinborn, A., Külz, T., Sohn, C., Hodel, M. ve Hahn, S., 2001, Elevation in erythroblast count in maternal blood before the onset of preeclampsia, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Mosby, 184(2), 165–168.
- Hong, F., Li, Y. ve Xu, Y., 2014, Decreased placental miR-126 expression and vascular endothelial growth factor levels in patients with pre-eclampsia, *Journal of International Medical Research*, 42(6), 1243–1251.
- Horie, T., Nishino, T., Baba, O., Kuwabara, Y., Nakao, T., Nishiga, M., Usami, S., Izuhara, M., Sowa, N., Yahagi, N., Shimano, H., Matsumura, S., Inoue, K., Marusawa, H., Nakamura, T., Hasegawa, K., Kume, N., Yokode, M., Kita, T., ve diğ., 2013, MicroRNA-33 regulates sterol regulatory element-binding protein 1 expression in mice, *Nature Communications*, Nature Publishing Group, 4(1), 2883.
- Horvitz, H. R. ve Sulston, J. E., 1980, Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*., *Genetics*, 96(2), 435–54.
- Hu, L., Stasheuski, A. S., Wegman, D. W., Wu, N., Yang, B. B., Hayder, H., Peng, C., Liu, S. K., Yousef, G. M. ve Krylov, S. N., 2017, Accurate MicroRNA Analysis in Crude Cell Lysate by Capillary Electrophoresis-Based Hybridization Assay in Comparison with Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, *Analytical Chemistry*, 89(8), 4743–4748.
- Hu, Y., Li, P., Hao, S., Liu, L., Zhao, J. ve Hou, Y., 2009, Differential expression of microRNAs in the placenta of Chinese patients with severe pre-eclampsia, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 47(8).
- Huang, W., 2017, MicroRNAs: Biomarkers, Diagnostics, and Therapeutics, in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 57–67.
- Hunt, E. A., Broyles, D., Head, T. ve Deo, S. K., 2015, MicroRNA Detection: Current Technology and Research Strategies, *Annual Review of Analytical Chemistry*, 8(1), 217–237.
- Huppertz, B., Sammar, M., Chefetz, I., Neumaier-Wagner, P., Bartz, C. ve Meiri, H., 2008, Longitudinal Determination of Serum Placental Protein 13 during Development of Preeclampsia, *Fetal Diagnosis and Therapy*, Karger Publishers, 24(3), 230–236.
- Hurault de Lignya, B., Ryckelynck, Jp., Mintzh Levyh, P. G. ve Muller, G., 1987, *Captopril*

Therapy in Preeclampsia, S. Karger AG.

- Hwang, J. H., Lee, M. J., Seok, O. S., Paek, Y. C., Cho, G. J., Seol, H. J., Lee, J. K. ve Oh, M. J., 2010, Cytokine expression in placenta-derived mesenchymal stem cells in patients with pre-eclampsia and normal pregnancies, *Cytokine*, 49(1), 95–101.
- Igura, K., Zhang, X., Takahashi, K., Mitsuru, A., Yamaguchi, S. ve Takashi, T. A., 2004, Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta., *Cytotherapy*, 6(6), 543–53.
- Iozzo, R. V. ve Schaefer, L., 2015, Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans, *Matrix Biology*, 42, 11–55.
- Jahn, M., Vorpahl, C., Türkowsky, D., Lindmeyer, M., Bühler, B., Harms, H. ve Müller, S., 2014, Accurate Determination of Plasmid Copy Number of Flow-Sorted Cells using Droplet Digital PCR, *Analytical Chemistry*, 86(12), 5969–5976.
- Jauniaux, E., Hempstock, J., Greenwold, N. ve Burton, G. J., 2003, Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies, *American Journal of Pathology*, American Society for Investigative Pathology, 162(1), 115–125.
- Ji, L., Zhang, L., Li, Y., Guo, L., Cao, N., Bai, Z., Song, Y., Xu, Z., Zhang, J., Liu, C. ve Ma, X., 2017, MiR-136 contributes to pre-eclampsia through its effects on apoptosis and angiogenesis of mesenchymal stem cells, *Placenta*, Elsevier Ltd, 50, 102–109.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A. ve Verfaillie, C. M., 2002, Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow, *Nature*, 418(6893), 41–49.
- Jin, H., Ma, K., Hu, R., Chen, Y., Yang, F., Yao, J., Li, X. ve Yang, P., 2008, Analysis of expression and comparative profile of normal placental tissue proteins and those in preeclampsia patients using proteomic approaches, *Analytica Chimica Acta*, Elsevier, 629(1–2), 158–164.
- Joong Shin Park, J. S., Oh, K.-J., Norwitz, E. R., Han, J.-S., Choi, H.-J., Hyo Suk Seong, H. S., Yoon Dan Kang, Y. D., Park, C.-W., Byoung Jae Kim, B. J., Jong Kwan Jun, J. K. ve Hee Chul Syn, H. C., 2008, Identification of Proteomic Biomarkers of Preeclampsia in Amniotic Fluid Using SELDI-TOF Mass Spectrometry, *Reproductive Sciences*, 15(5), 457–468.
- Jörn, W., Kuhbier, B. W., Radtke, C., Peter M., Kasper, C. ve Reimers, K., 2010, Isolation, Characterization, Differentiation, and Application of Adipose-Derived Stem Cells, in *Bioreactor Systems for Tissue Engineering II*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 55–105.
- Kanasaki, K. ve Kalluri, R., 2009, The biology of preeclampsia, *Kidney International*, Elsevier, 76(8), 831–837.
- Karahuseyinoglu, S., Cinar, O., Kilic, E., Kara, F., Akay, G. G., Demiralp, D. Ö., Tukun, A., Uckan, D. ve Can, A., 2007, Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and In Vitro Surveys, *Stem Cells*, 25(2), 319–331.

- Karimu, A. L. ve Burton, G. J., 1994, The effects of maternal vascular pressure on the dimensions of the placental capillaries., *British journal of obstetrics and gynaecology*, 101(1), 57–63.
- Karlsson, H., Erkers, T., Nava, S., Ruhm, S., Westgren, M. ve Ringdén, O., 2012, Stromal cells from term fetal membrane are highly suppressive in allogeneic settings in vitro., *Clinical and experimental immunology*, Wiley-Blackwell, 167(3), 543–55.
- Kassis, I., Zangi, L., Rivkin, R., Levdansky, L., Samuel, S., Marx, G. ve Gorodetsky, R., 2006, Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads, *Bone Marrow Transplantation*, 37(10), 967–976.
- Kelly, E. B., 2007, *Stem cells*, Greenwood Press. https://books.google.com.tr/books/about/Stem_Cells.html?id=1CxDarcSR6cC&redir_esc=y (Ziyaret tarihi: 15 Nisan 2019).
- Kenny, L. C., Broadhurst, D., Brown, M., Dunn, W. B., Redman, C. W. G., Kell, D. B. ve Baker, P. N., 2008, Detection and Identification of Novel Metabolomic Biomarkers in Preeclampsia, *Reproductive Sciences*, SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA, 15(6), 591–597.
- Kenny, L. C., Broadhurst, D. I., Dunn, W., Brown, M., North, R. A., McCowan, L., Roberts, C., Cooper, G. J. S., Kell, D. B. ve Baker, P. N., 2010, Robust Early Pregnancy Prediction of Later Preeclampsia Using Metabolomic Biomarkers, *Hypertension*, Lippincott Williams & Wilkins, 56(4), 741–749.
- Kenny, L. C., Dunn, W. B., Ellis, D. I., Myers, J., Baker, P. N. ve Kell, D. B., 2005, Novel biomarkers for pre-eclampsia detected using metabolomics and machine learning, *Metabolomics*, 1(3), 227–234.
- Khowaja, A. R., Mitton, C., Bryan, S., Magee, L. A., Bhutta, Z. A. ve von Dadelszen, P., 2015, Economic evaluation of Community Level Interventions for Pre-eclampsia (CLIP) in South Asian and African countries: a study protocol, *Implementation Science*, 10(1), 76.
- Khvorova, A., Reynolds, A. ve Jayasena, S. D., 2003, Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias., *Cell*, 115(2), 209–16.
- Kim, T. G., Jeong, S.-Y. ve Cho, K.-S., 2014, Comparison of droplet digital PCR and quantitative real-time PCR for examining population dynamics of bacteria in soil, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(13), 6105–6113.
- Kim, Y.-K. ve Kim, V. N., 2007, Processing of intronic microRNAs, *The EMBO Journal*, John Wiley & Sons, Ltd, 26(3), 775–783.
- Kirschstein, R., 2001, *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions* | stemcells.nih.gov.
- Klonisch, T. ve Drouin, R., 2009, Fetal–maternal exchange of multipotent stem/progenitor cells: microchimerism in diagnosis and disease, *Trends in Molecular Medicine*, Elsevier Current Trends, 15(11), 510–518.
- Koga, K., Osuga, Y., Yoshino, O., Hirota, Y., Ruimeng, X., Hirata, T., Takeda, S., Yano, T., Tsutsumi, O. ve Taketani, Y., 2003, Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) levels in women with preeclampsia, *Journal of Clinical*

- Endocrinology and Metabolism*, Narnia, 88(5), 2348–2351.
- Kullolli, M., Knouf, E., Arampatzidou, M., Tewari, M. ve Pitteri, S. J., 2014, Intact MicroRNA Analysis Using High Resolution Mass Spectrometry, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 25(1), 80–87.
- Kupferminc, M. J., 2003, Thrombophilia and pregnancy, *Reproductive Biology and Endocrinology*, BioMed Central, 1(1), 111.
- Kurtzberg, J., Laughlin, M., Graham, M. L., Smith, C., Olson, J. F., Halperin, E. C., Ciocchi, G., Carrier, C., Stevens, C. E. ve Rubinstein, P., 1996, Placental Blood as a Source of Hematopoietic Stem Cells for Transplantation into Unrelated Recipients, *New England Journal of Medicine*, 335(3), 157–166.
- Kyle, P. M., Campbell, S., Buckley, D., Kissane, J., Swiet, M., Albano, J., Millar, J. G. ve Redman, C. W. G., 1996, A comparison of the inactive urinary kallikrein:creatinine ratio and the angiotensin sensitivity test for the prediction of pre-eclampsia, *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 103(10), 981–987.
- de la Torre, P., Perez-Lorenzo, M. J. ve Flores, A. I., 2018, Human Placenta-Derived Mesenchymal Stromal Cells: A Review from Basic Research to Clinical Applications, in *Stromal Cells*, IntechOpen, 227–49.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. ve Tuschl, T., 2001, Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs, *Science*, 294(5543), 853–858.
- Lawrence, J. B., Oxvig, C., Overgaard, M. T., Sottrup-Jensen, L., Gleich, G. J., Hays, L. G., Yates, J. R. ve Conover, C. A., 1999, The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, National Academy of Sciences, 96(6), 3149–53.
- Lee, I. C., Kim, K. H., Kim, S. H., Baek, H. S., Moon, C., Kim, S. H., Yun, W. K., Nam, K. H., Kim, H. C. ve Kim, J. C., 2013, Apoptotic cell death in rat epididymis following epichlorohydrin treatment, *Human & Experimental Toxicology*, 32(6), 640–646.
- Lee, J. M., Jung, J., Lee, H.-J., Jeong, S. J., Cho, K. J., Hwang, S.-G. ve Kim, G. J., 2012, Comparison of immunomodulatory effects of placenta mesenchymal stem cells with bone marrow and adipose mesenchymal stem cells, *International Immunopharmacology*, 13(2), 219–224.
- Lee, R. C. ve Ambros, V., 2001, An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*, *Science*, 294(5543), 862–864.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. ve Ambros, V., 1993, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell*, 75(5), 843–54.
- Lee, R., Feinbaum, R. ve Ambros, V., 2004, A short history of a short RNA, *Cell*, Cell Press, 116, S89–S92.
- Leonardo, T. R., Schultheisz, H. L., Loring, J. F. ve Laurent, L. C., 2012, The functions of microRNAs in pluripotency and reprogramming, *Nature Cell Biology*, 14(11), 1114–1121.

- Leung, T. N., Zhang, J., Lau, T. K., Chan, L. Y. ve Lo, Y. M., 2001, Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia., *Clinical chemistry*, 47(1), 137–9.
- Levine, R. J., Lam, C., Qian, C., Yu, K. F., Maynard, S. E., Sachs, B. P., Sibai, B. M., Epstein, F. H., Romero, R., Thadhani, R. ve Karumanchi, S. A., 2006, Soluble Endoglin and Other Circulating Antiangiogenic Factors in Preeclampsia, *New England Journal of Medicine*, Massachusetts Medical Society , 355(10), 992–1005.
- Levine, Richard J., Maynard, S. E., 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. ve Karumanchi, S. A., 2004, Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia., *The New England journal of medicine*, Massachusetts Medical Society, 350(7), 672–683.
- Levine, Richard J, Qian, C., LeShane, E. S., Yu, K. F., England, L. J., Schisterman, E. F., Wataganara, T., Romero, R. ve Bianchi, D. W., 2004, Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Mosby, 190(3), 707–713.
- Li, S.-C., Chan, W.-C., Hu, L.-Y., Lai, C.-H., Hsu, C.-N. ve Lin, W., 2010, Identification of homologous microRNAs in 56 animal genomes, *Genomics*, 96(1), 1–9.
- Li, X., Song, Y., Liu, D., Zhao, J., Xu, J., Ren, J., Hu, Y., Wang, Z., Hou, Y. ve Zhao, G., 2017, MiR-495 Promotes Senescence of Mesenchymal Stem Cells by Targeting Bmi-1, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 42(1), 780–796.
- Lie, R. T., Rasmussen, S., Brunborg, H., Gjessing, H. K., Lie-Nielsen, E. ve Irgens, L. M., 1998, Fetal and maternal contributions to risk of pre-eclampsia: population based study., *BMJ (Clinical research ed.)*, 316(7141), 1343–7.
- Lim, K.-H., Friedman, S. A., Ecker, J. L., Kao, L. ve Kilpatrick, S. J., 1998, The clinical utility of serum uric acid measurements in hypertensive diseases of pregnancy, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Mosby, 178(5), 1067–1071.
- Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engle, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., Bartel, D. P., Linsley, P. S. ve Johnson, J. M., 2005, Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs, *Nature*, 433(7027), 769–773.
- Lin, T. C. Y. ve Lee, O. K. S., 2008, Stem cells: a primer., *The Chinese journal of physiology*, 51(4), 197–207.
- Linsley, P. S., Schelter, J., Burchard, J., Kibukawa, M., Martin, M. M., Bartz, S. R., Johnson, J. M., Cummins, J. M., Raymond, C. K., Dai, H., Chau, N., Cleary, M., Jackson, A. L., Carleton, M. ve Lim, L., 2007, Transcripts Targeted by the MicroRNA-16 Family Cooperatively Regulate Cell Cycle Progression, *Molecular and Cellular Biology*, 27(6), 2240–2252.
- Liu, L., Wang, Y., Fan, H., Zhao, X., Liu, D., Hu, Y., Kidd, A. R., Bao, J. ve Hou, Y., 2012, MicroRNA-181a regulates local immune balance by inhibiting proliferation and immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells, *Stem Cells*, 30(8), 1756–1770.
- Liu, L., Zhao, X., Li, P., Zhao, G., Wang, Y., Hu, Y. ve Hou, Y., 2012, A novel way to isolate MSCs from umbilical cords, *European Journal of Immunology*, John Wiley & Sons, Ltd,

42(8), 2190–2193.

- Liu, Q., Fu, H., Sun, F., Zhang, H., Tie, Y., Zhu, J., Xing, R., Sun, Z. ve Zheng, X., 2008, miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes, *Nucleic Acids Research*, 36(16), 5391–5404.
- Livingston, J. C., Barton, J. R., Park, V., Haddad, B., Phillips, O. ve Sibai, B. M., 2001, Maternal and fetal inherited thrombophilias are not related to the development of severe preeclampsia, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 185(1), 153–157.
- Lo, Y. M. D., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., Rai, V., Sargent, I. L., Redman, C. W. ve Wainscoat, J. S., 1997, Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum, *The Lancet*, Elsevier, 350(9076), 485–487.
- Lo, Y. M. D., Leung, T. N., Tein, M. S. C., Sargent, I. L., Zhang, J., Lau, T. K., Haines, C. J. ve Redman, C. W. G., 1999, Quantitative Abnormalities of Fetal DNA in Maternal Serum in Preeclampsia, *Clinical Chemistry*, 45(2), 184–8.
- Lo, Y. M. D., Lun, F. M. F., Chan, K. C. A., Tsui, N. B. Y., Chong, K. C., Lau, T. K., Leung, T. Y., Zee, B. C. Y., Cantor, C. R. ve Chiu, R. W. K., 2007, Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(32), 13116–13121.
- Locke, M., Feisst, V. ve Dunbar, P. R., 2011, Concise Review: Human Adipose-Derived Stem Cells: Separating Promise from Clinical Need, *STEM CELLS*, 29(3), 404–411.
- Luense, L. J., Carletti, M. Z. ve Christenson, L. K., 2009, Role of Dicer in female fertility, *Trends in Endocrinology & Metabolism*, Elsevier Current Trends, 20(6), 265–272.
- Lunell, N. O., Nylund, L. E., Lewander, R. ve Sarby, B., 1982, Uteroplacental blood flow in pre-eclampsia measurements with indium-113m and a computer-linked gamma camera., *Clinical and experimental hypertension. Part B, Hypertension in pregnancy*, 1(1), 105–17.
- Luo, L., Ye, G., Nadeem, L., Fu, G., Yang, B. B., Honarparvar, E., Dunk, C., Lye, S. ve Peng, C., 2012, MicroRNA-378a-5p promotes trophoblast cell survival, migration and invasion by targeting Nodal, *Journal of Cell Science*, 125(13), 3124–3132.
- Luo, S.-S., Ishibashi, O., Ishikawa, G., Ishikawa, T., Katayama, A., Mishima, T., Takizawa, T. T., Shigihara, T., Goto, T., Izumi, A., Ohkuchi, A., Matsubara, S., Takeshita, T. ve Takizawa, T. T., 2009, Human Villous Trophoblasts Express and Secrete Placenta-Specific MicroRNAs into Maternal Circulation via Exosomes¹, *Biology of Reproduction*, Narnia, 81(4), 717–729.
- Luo, S., Cao, N., Tang, Y. ve Gu, W., 2017, Identification of key microRNAs and genes in preeclampsia by bioinformatics analysis, *PLOS ONE*, Edited by S. Gebhardt, 12(6), e0178549.
- Mabie, W. C., DiSessa, T. G., Crocker, L. G., Sibai, B. M. ve Arheart, K. L., 1994, A longitudinal study of cardiac output in normal human pregnancy, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 170(3), 849–852.
- MacGillivray, I., Rose, G. A. ve Rowe, B., 1969, Blood pressure survey in pregnancy., *Clinical science*, 37(2), 395–407.

- Macias, M. I., Grande, J., Moreno, A., Domínguez, I., Bornstein, R. ve Flores, A. I., 2010, Isolation and characterization of true mesenchymal stem cells derived from human term decidua capable of multilineage differentiation into all 3 embryonic layers, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 203(5), 495.e9-495.e23.
- Maddocks, D. G., Alberry, M. S., Attilakos, G., Madgett, T. E., Choi, K., Soothill, P. W. ve Avent, N. D., 2009, The SAFE project: towards non-invasive prenatal diagnosis., *Biochemical Society transactions*, Portland Press Limited, 37(Pt 2), 460–5.
- Magnussen, E. B., Vatten, L. J., Smith, G. D. ve Romundstad, P. R., 2009, Hypertensive disorders in pregnancy and subsequently measured cardiovascular risk factors., *Obstetrics and gynecology*, 114(5), 961–70.
- Makarova, J. A., Shkurnikov, M. U., Wicklein, D., Lange, T., Samatov, T. R., Turchinovich, A. A. ve Tonevitsky, A. G., 2016, Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role, *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 51(3–4), 33–49.
- Maleki, M., Ghanbarvand, F., Behvarz, M. R., Ejtemaei, M. ve Ghadirkhomi, E., 2014, Comparison of Mesenchymal Stem Cell Markers in Multiple Human Adult Stem Cells, *International Journal of Stem Cells*, 7(2), 118–126.
- Manoj, P., 2014, Droplet digital PCR technology promises new applications and research areas, *Mitochondrial DNA*, 27(1), 742–746.
- Marcus, A. J., Coyne, T. M., Rauch, J., Woodbury, D. ve Black, I. B., 2008, Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane, *Differentiation*, 76(2), 130–144.
- Mashini, I. S., Albazzaz, S. J., Fadel, H. E., Abdulla, A. M., Hadi, H. A., Harp, R. ve Devoe, L. D., 1987, Serial noninvasive evaluation of cardiovascular hemodynamics during pregnancy., *American journal of obstetrics and gynecology*, 156(5), 1208–13.
- Mattot, V., Moons, L., Lupu, F., Chernavsky, D., Gómez, R. A., Collen, D. ve Carmeliet, P., 2002, Loss of the VEGF(164) and VEGF(188) isoforms impairs postnatal glomerular angiogenesis and renal arteriogenesis in mice., *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 13(6), 1548–60.
- 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. H., Sukhatme, V. P. ve Karumanchi, S. A., 2003, Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia, *Journal of Clinical Investigation*, American Society for Clinical Investigation, 111(5), 649–658.
- Medawar, P., 1953, Some immunological and endocrinological problems raised by evolution of viviparity in vertebrates, *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 7, 320–338.
- Meekins, J. W., Pijnenborg, R., Hanssens, M., MCFadyen, I. R. ve van Asshe, A., 1994, A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies, *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 101(8), 669–674.

- Meijer, H. A., Smith, E. M. ve Bushell, M., 2014, Regulation of miRNA strand selection: follow the leader?, *Biochemical Society Transactions*, 42(4), 1135–1140.
- Miki, T., Lehmann, T., Cai, H., Stolz, D. B. ve Strom, S. C., 2005, Stem Cell Characteristics of Amniotic Epithelial Cells, *Stem Cells*, 23(10), 1549–1559.
- Millar, J. G. B., Campbell, S. K., Albano, J. D. M., Higgins, B. R. ve Clark, A. D., 1996, Early prediction of pre-eclampsia by measurement of kallikrein and creatinine on a random urine sample, *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 103(5), 421–426.
- Miotke, L., Lau, B. T., Rumma, R. T. ve Ji, H. P., 2014, High sensitivity detection and quantitation of DNA copy number and single nucleotide variants with single color droplet digital PCR., *Analytical chemistry*, American Chemical Society, 86(5), 2618–24.
- Mongraw-Chaffin, M. L., Cirillo, P. M. ve Cohn, B. A., 2010, Preeclampsia and Cardiovascular Disease Death, *Hypertension*, 56(1), 166–171.
- Moodley, Y., Vaghjiani, V., Chan, J., Baltic, S., Ryan, M., Tchongue, J., Samuel, C. S., Murthi, P., Parolini, O. ve Manuelpillai, U., 2013, Anti-Inflammatory Effects of Adult Stem Cells in Sustained Lung Injury: A Comparative Study, *PLoS ONE*, Edited by E. Mezey, 8(8), e69299.
- Morisset, D., Štebih, D., Milavec, M., Gruden, K. ve Žel, J., 2013, Quantitative Analysis of Food and Feed Samples with Droplet Digital PCR, *PLoS ONE*, Edited by J. L. Heazlewood, 8(5), e62583.
- Morris, R. K., Cnossen, J. S., Langejans, M., Robson, S. C., Kleijnen, J., ter Riet, G., Mol, B. W., van der Post, J. A. ve Khan, K. S., 2008, Serum screening with Down's syndrome markers to predict pre-eclampsia and small for gestational age: Systematic review and meta-analysis, *BMC Pregnancy and Childbirth*, 8(1), 33.
- Morris, R. K., Riley, R. D., Doug, M., Deeks, J. J. ve Kilby, M. D., 2012, Diagnostic accuracy of spot urinary protein and albumin to creatinine ratios for detection of significant proteinuria or adverse pregnancy outcome in patients with suspected pre-eclampsia: systematic review and meta-analysis., *BMJ (Clinical research ed.)*, British Medical Journal Publishing Group, 345, e4342.
- Morrison, E. R., Miedzybrodzka, Z. H., Campbell, D. M., Haites, N. E., Wilson, B. J., Watson, M. S., Greaves, M. ve Vickers, M. A., 2002, Prothrombotic genotypes are not associated with pre-eclampsia and gestational hypertension: Results from a large population-based study and systematic review, *Thrombosis and Haemostasis*, 87(5), 779–785.
- Moutquin, J. M., Rainville, C., Giroux, L., Raynauld, P., Amyot, G., Bilodeau, R. ve Pelland, N., 1985, A prospective study of blood pressure in pregnancy: prediction of preeclampsia., *American journal of obstetrics and gynecology*, 151(2), 191–6.
- Mütze, S., Rudnik-Schöneborn, S., Zerres, K. ve Rath, W., 2008, Genes and the preeclampsia syndrome., *Journal of perinatal medicine*, 36(1), 38–58.
- Nelson, P. T., Baldwin, D. A., Searce, L. M., Oberholtzer, J. C., Tobias, J. W. ve Mourelatos, Z., 2004, Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs, *Nature Methods*, 1(2), 155–161.

- Ng, E. K. O., Tsui, N. B. Y., Lau, T. K., Leung, T. N., Chiu, R. W. K., Panesar, N. S., Lit, L. C. W., Chan, K.-W. ve Lo, Y. M. D., 2003, mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, National Academy of Sciences, 100(8), 4748–53.
- Nishizawa, H., Pryor-Koishi, K., Kato, T., Kowa, H., Kurahashi, H. ve Udagawa, Y., 2007, Microarray Analysis of Differentially Expressed Fetal Genes in Placental Tissue Derived from Early and Late Onset Severe Pre-eclampsia, *Placenta*, W.B. Saunders, 28(5–6), 487–497.
- Niu, Z., Han, T., Sun, X., Luan, L., Gou, W. ve Zhu, X., 2018, MicroRNA-30a-3p is overexpressed in the placentas of patients with preeclampsia and affects trophoblast invasion and apoptosis by its effects on IGF-1, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 218(2), 249.e1-249.e12.
- Noack, F., Ribbat-Idel, J., Thorns, C., Chiriac, A., Axt-Flidner, R., Diedrich, K. ve Feller, A. C., 2011, miRNA expression profiling in formalin-fixed and paraffin-embedded placental tissue samples from pregnancies with severe preeclampsia., *Journal of perinatal medicine*, 39(3), 267–71.
- Noori, M., Donald, A. E., Angelakopoulou, A., Hingorani, A. D. ve Williams, D. J., 2010, Prospective Study of Placental Angiogenic Factors and Maternal Vascular Function Before and After Preeclampsia and Gestational Hypertension, *Circulation*, Lippincott Williams & Wilkins, 122(5), 478–487.
- North, R. A., McCowan, L. M. E., Dekker, G. A., Poston, L., Chan, E. H. Y., Stewart, A. W., Black, M. A., Taylor, R. S., Walker, J. J., Baker, P. N. ve Kenny, L. C., 2011, Clinical risk prediction for pre-eclampsia in nulliparous women: development of model in international prospective cohort, *BMJ*, 342(apr07 4), d1875–d1875.
- Nuzzo, A. M., Giuffrida, D., Masturzo, B., Mele, P., Piccoli, E., Eva, C., Todros, T. ve Rolfo, A., 2017, Altered expression of G1/S phase cell cycle regulators in placental mesenchymal stromal cells derived from preeclamptic pregnancies with fetal-placental compromise, *Cell Cycle*, 16(2), 200–212.
- O'Brien, T. E., Ray, J. G. ve Chan, W. S., 2003, Maternal body mass index and the risk of preeclampsia: A systematic overview, *Epidemiology*, 368–374.
- Obad, S., dos Santos, C. O., Petri, A., Heidenblad, M., Broom, O., Ruse, C., Fu, C., Lindow, M., Stenvang, J., Straarup, E. M., Hansen, H. F., Koch, T., Pappin, D., Hannon, G. J. ve Kauppinen, S., 2011, Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs, *Nature Genetics*, Nature Publishing Group, 43(4), 371–378.
- Ogden, E., Hildebrand, G. J. ve Page, E. W., 1940, Rise of Blood Pressure During Ischemia of the Gravid Uterus., *Experimental Biology and Medicine*, SAGE PublicationsSage UK: London, England, 43(1), 49–51.
- Okada, C., Yamashita, E., Lee, S. J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Yoneda, Y. ve Tsukihara, T., 2009, A High-Resolution Structure of the Pre-microRNA Nuclear Export Machinery, *Science*, 326(5957), 1275–1279.
- Okamoto, K., Miyoshi, S., Toyoda, M., Hida, N., Ikegami, Y., Makino, H., Nishiyama, N., Tsuji, H., Cui, C.-H., Segawa, K., Uyama, T., Kami, D., Miyado, K., Asada, H.,

- Matsumoto, K., Saito, H., Yoshimura, Y., Ogawa, S., Aeba, R., *et al.*, 2007, Working' cardiomyocytes exhibiting plateau action potentials from human placenta-derived extraembryonic mesodermal cells, *Experimental Cell Research*, Academic Press, 313(12), 2550–2562.
- Okazaki, S., Sekizawa, A., Purwosunu, Y., Farina, A., Wibowo, N. ve Okai, T., 2007, Placenta-Derived, Cellular Messenger RNA Expression in the Maternal Blood of Preeclamptic Women, *Obstetrics & Gynecology*, 110(5), 1130–1136.
- Orlic, D., Bock, T. A., Kanz, L. ve New York Academy of Sciences., 1999, *Hematopoietic stem cells : biology and transplantation*, New York Academy of Sciences.
- Owen, M., 1988, Marrow stromal stem cells, *Journal of Cell Science*, The Company of Biologists Ltd, 1988(Supplement 10), 63–76.
- Oxvig, C., Sand, O., Kristensen, T., Gleich, G. J. ve Sottrup-Jensen, L., 1993, Circulating human pregnancy-associated plasma protein-A is disulfide-bridged to the proform of eosinophil major basic protein., *The Journal of biological chemistry*, 268(17), 12243–6.
- van Pampus, M. G., Dekker, G. A., Wolf, H., Huijgens, P. C., Koopman, M. M., von Blomberg, B. M. ve Büller, H. R., 1999, High prevalence of hemostatic abnormalities in women with a history of severe preeclampsia., *American journal of obstetrics and gynecology*, 180(5), 1146–50.
- Panno, J., 2005, *Stem cell research : medical applications and ethical controversy*, Facts On File.
https://books.google.com.tr/books/about/Stem_Cell_Research.html?id=14BJuAAACA-AJ&redir_esc=y (Ziyaret tarihi: 9 June 2019).
- Parham, P., 2004, NK cells and trophoblasts: partners in pregnancy., *The Journal of experimental medicine*, 200(8), 951–5.
- Parolini, O., Alviano, F., Bagnara, G. P., Bilic, G., Bühring, H.-J., Evangelista, M., Hennerbichler, S., Liu, B., Magatti, M., Mao, N., Miki, T., Marongiu, F., Nakajima, H., Nikaido, T., Portmann-Lanz, C. B., Sankar, V., Soncini, M., Stadler, G., Surbek, D., *et al.*, 2008, Concise Review: Isolation and Characterization of Cells from Human Term Placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells, *Stem Cells*, 26(2), 300–311.
- Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., Hayward, D. C., Ball, E. E., Degnan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E. ve Ruvkun, G., 2000, Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA, *Nature*, 408(6808), 86–89.
- Paul, P., Chakraborty, A., Sarkar, D., Langthasa, M., Rahman, M., Bari, M., Singha, R. S., Malakar, A. K. ve Chakraborty, S., 2018, Interplay between miRNAs and human diseases, *Journal of Cellular Physiology*, 233(3), 2007–2018.
- Perkins, A. C. ve AC, 1998, Enrichment of blood from embryonic stem cells in vitro, *Reproduction, Fertility and Development*, 10(8), 563.
- Pijnenborg, R., Anthony, J., Davey, D. A., Rees, A., Tiltman, A., Vercruysse, L. ve Van Assche,

- A., 1991, Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy, *British journal of obstetrics and gynaecology*, 98(7), 648–55.
- Pijnenborg, R., Dixon, G., Robertson, W. B. ve Brosens, I., 1980, Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy., *Placenta*, 1(1), 3–19.
- Pineles, B. L., Romero, R., Montenegro, D., Tarca, A. L., Han, Y. M., Kim, Y. M., Draghici, S., Espinoza, J., Kusanovic, J. P., Mittal, P., Hassan, S. S. ve Kim, C. J., 2007, Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Mosby, 196(3), 261.e1-261.e6.
- Ping, P., 2009, Getting to the Heart of Proteomics, *New England Journal of Medicine*, 360(5), 532–534.
- Pinheiro, L. B., Coleman, V. A., Hindson, C. M., Herrmann, J., Hindson, B. J., Bhat, S. ve Emslie, K. R., 2012, Evaluation of a Droplet Digital Polymerase Chain Reaction Format for DNA Copy Number Quantification, *Analytical Chemistry*, 84(2), 1003–1011.
- Podlesniy, P., Figueiro-Silva, J., Llado, A., Antonell, A., Sanchez-Valle, R., Alcolea, D., Lleo, A., Molinuevo, J. L., Serra, N. ve Trullas, R., 2013, Low cerebrospinal fluid concentration of mitochondrial DNA in preclinical Alzheimer disease, *Annals of Neurology*, 74(5), 655–668.
- Poon, L. L., Leung, T. N., Lau, T. K. ve Lo, Y. M., 2001, Circulating fetal RNA in maternal plasma., *Annals of the New York Academy of Sciences*, 945, 207–10.
- Portmann-Lanz, C. B., Schoeberlein, A., Huber, A., Sager, R., Malek, A., Holzgreve, W. ve Surbek, D. V., 2006, Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 194(3), 664–673.
- Pritchard, C. C., Cheng, H. H. ve Tewari, M., 2012, MicroRNA profiling: approaches and considerations, *Nature Reviews Genetics*, 13(5), 358–369.
- Purwosunu, Y., Sekizawa, A., Okazaki, S., Farina, A., Wibowo, N., Nakamura, M., Rizzo, N., Saito, H. ve Okai, T., 2009, Prediction of preeclampsia by analysis of cell-free messenger RNA in maternal plasma, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Mosby, 200(4), 386.e1-386.e7.
- Quackenbush, J., 2006, Microarray Analysis and Tumor Classification, *New England Journal of Medicine*, 354(23), 2463–2472.
- Raymond, C. K., Roberts, B. S., Garrett-Engele, P., Lim, L. P. ve Johnson, J. M., 2005, Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs, *RNA*, 11(11), 1737–1744.
- Rayner, K. J., Suárez, Y., Dávalos, A., Parathath, S., Fitzgerald, M. L., Tamehiro, N., Fisher, E. A., Moore, K. J. ve Fernández-Hernando, C., 2010, MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis., *Science*, American Association for the Advancement of Science, 328(5985), 1570–3.
- Redline, R. W. ve Patterson, P., 1995, Pre-eclampsia is associated with an excess of proliferative immature intermediate trophoblast., *Human pathology*, 26(6), 594–600.

- Redman, C. W., 1984, Maternal plasma volume and disorders of pregnancy., *British medical journal (Clinical research ed.)*, BMJ Publishing Group, 288(6422), 955–6.
- Redman, C. W. G. ve Sargent, I. L., 2003, Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response--a review., *Placenta*, 24 Suppl A, S21-7.
- de Rie, D., Abugessaisa, I., Alam, T., Arner, E., Arner, P., Ashoor, H., Åström, G., Babina, M., Bertin, N., Burroughs, A. M., Carlisle, A. J., Daub, C. O., Detmar, M., Deviatiiarov, R., Fort, A., Gebhard, C., Goldowitz, D., Guhl, S., Ha, T. J., *et al.*, 2017, An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse, *Nature Biotechnology*, 35(9), 872–878.
- Roberts, J. M. ve Lain, K. Y., 2002, Recent Insights into the Pathogenesis of Pre-eclampsia, *Placenta*, 23(5), 359–372.
- Roberts, J. M. M. ve Hubel, C. A. A., 2009, The Two Stage Model of Preeclampsia: Variations on the Theme, *Placenta*, 30(SUPPL.), 32–37.
- Robertson, W. B., Brosens, I. ve Dixon, H. G., 1967, The pathological response of the vessels of the placental bed to hypertensive pregnancy., *The Journal of pathology and bacteriology*, 93(2), 581–592.
- Robson, S. C., Hunter, S., Boys, R. J. ve Dunlop, W., 1989, Serial study of factors influencing changes in cardiac output during human pregnancy, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 256(4), H1060–H1065.
- Roccella, E. J., 2000, Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Mosby, 183(1), s1–s22.
- Rolfo, A., Giuffrida, D., Nuzzo, A. M., Pierobon, D., Cardaropoli, S., Piccoli, E., Giovarelli, M. ve Todros, T., 2013, Pro-Inflammatory Profile of Preeclamptic Placental Mesenchymal Stromal Cells: New Insights into the Etiopathogenesis of Preeclampsia, *PLoS ONE*, Edited by X.-M. Shi, 8(3), e59403.
- van Rooij, E., 2011, The Art of MicroRNA Research, *Circulation Research*, Lippincott Williams & WilkinsHagerstown, MD, 108(2), 219–234.
- Rottiers, V., Najafi-Shoushtari, S. H., Kristo, F., Gurumurthy, S., Zhong, L., Li, Y., Cohen, D. E., Gerszten, R. E., Bardeesy, N., Mostoslavsky, R. ve Näär, A. M., 2011, MicroRNAs in metabolism and metabolic diseases, *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 76, 225–33.
- Roufosse, C. A., Direkze, N. C., Otto, W. R. ve Wright, N. A., 2004, Circulating mesenchymal stem cells, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(4), 585–597.
- Ruby, J. G., Jan, C. H. ve Bartel, D. P., 2007, Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing, *Nature*, 448(7149), 83–86.
- Ruster, B., Gottig, S., Ludwig, R. J., Bistran, R., Muller, S., Seifried, E., Gille, J. ve Henschler, R., 2006, Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells, *Blood*, 108(12), 3938–3944.
- Saftlas, A. F., Levine, R. J., Klebanoff, M. A., Martz, K. L., Ewell, M. G., Morris, C. D. ve

- Sibai, B. M., 2003, Abortion, changed paternity, and risk of preeclampsia in nulliparous women., *American journal of epidemiology*, 157(12), 1108–14.
- Saito, S., Nakashima, A., Shima, T. ve Ito, M., 2010, Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy, *American Journal of Reproductive Immunology*, 601–610.
- Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K. ve Muneta, T., 2005, Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source, *Arthritis & Rheumatism*, 52(8), 2521–2529.
- Sandrim, V. C., Dias, M. C., Bovolato, A. L. de C., Tanus-Santos, J. E., Deffune, E. ve Cavalli, R. C., 2016, Plasma from pre-eclamptic patients induces the expression of the anti-angiogenic miR-195-5p in endothelial cells, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 20(6), 1198–1200.
- Sandrim, V. C., Eleuterio, N., Pílan, E., Tanus-Santos, J. E., Fernandes, K. ve Cavalli, R., 2016, Plasma levels of increased miR-195-5p correlates with the sFLT-1 levels in preeclampsia, *Hypertension in Pregnancy*, Taylor & Francis, 35(2), 150–158.
- Schwab, K. E. ve Gargett, C. E., 2007, Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium, *Human Reproduction*, Narnia, 22(11), 2903–2911.
- Sergi, C. M., Caluseriu, O., McColl, H. ve Eisenstat, D. D., 2017, Hirschsprung's disease: clinical dysmorphology, genes, micro-RNAs, and future perspectives, *Pediatric Research*, 81(1–2), 177–191.
- Shen, F., Sun, B., Kreutz, J. E., Davydova, E. K., Du, W., Reddy, P. L., Joseph, L. J. ve Ismagilov, R. F., 2011, Multiplexed Quantification of Nucleic Acids with Large Dynamic Range Using Multivolume Digital RT-PCR on a Rotational SlipChip Tested with HIV and Hepatitis C Viral Load, *Journal of the American Chemical Society*, 133(44), 17705–17712.
- Shi, Y., Hu, G., Su, J., Li, W., Chen, Q., Shou, P., Xu, C., Chen, X., Huang, Y., Zhu, Z., Huang, X., Han, X., Xie, N. ve Ren, G., 2010, Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair, *Cell Research*, 20(5), 510–518.
- Shigeno, Y. ve Ashton, B. A., 1995, Human bone-cell proliferation in vitro decreases with human donor age., *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 77(1), 139–42.
- Sibai, B., Dekker, G. ve Kupferminc, M., 2005, Pre-eclampsia, *The Lancet*, 365(9461), 785–799.
- Sibai, B. M., 2002, Chronic hypertension in pregnancy., *Obstetrics and gynecology*, 100(2), 369–77.
- Sibai, B. M., 2004, Diagnosis, Controversies, and Management of the Syndrome of Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, and Low Platelet Count, *Obstetrics & Gynecology*, 103(5, Part 1), 981–991.
- Sibai, B. M., Hauth, J., Caritis, S., Lindheimer, M. D., MacPherson, C., Klebanoff, M., VanDorsten, J. P., Landon, M., Miodovnik, M., Paul, R., Meis, P., Thurnau, G., Dombrowski, M., Roberts, J. ve McNellis, D., 2000, Hypertensive disorders in twin versus singleton gestations. National Institute of Child Health and Human Development

- Network of Maternal-Fetal Medicine Units., *American journal of obstetrics and gynecology*, 182(4), 938–42.
- Sibai BM, 2003, Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. - PubMed - NCBI, *Obstetrics & Gynecology*, 102(1), 181–92.
- Siiteri, P. K. ve Stites, D. P., 1982, Immunologic and Endocrine Interrelationships in Pregnancy, *Biology of Reproduction*, 26(1), 1–14.
- Sindelka, R., Jonák, J., Hands, R., Bustin, S. A. ve Kubista, M., 2008, Intracellular expression profiles measured by real-time PCR tomography in the *Xenopus laevis* oocyte, *Nucleic Acids Research*, 36(2), 387–392.
- Sitras, V., Paulssen, R. H., Grønnaas, H., Leirvik, J., Hanssen, T. A., Vårtun, Å. ve Acharya, G., 2009, Differential Placental Gene Expression in Severe Preeclampsia, *Placenta*, W.B. Saunders, 30(5), 424–433.
- Soncini, M., Vertua, E., Gibelli, L., Zorzi, F., Denegri, M., Albertini, A., Wengler, G. S. ve Parolini, O., 2007, Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1(4), 296–305.
- Song, X., Luo, X., Gao, Quansheng, Wang, Y., Gao, Qing ve Long, W., 2017, Dysregulation of LncRNAs in Placenta and Pathogenesis of Preeclampsia, *Current Drug Targets*, 18(10).
- Spencer, C. A., Allen, V. M., Flowerdew, G., Dooley, K. ve Dodds, L., 2008, Low levels of maternal serum PAPP-A in early pregnancy and the risk of adverse outcomes, *Prenatal Diagnosis*, John Wiley & Sons, Ltd, 28(11), 1029–1036.
- Spencer, K., Cowans, N. J., Chefetz, I., Tal, J., Kuhnreich, I. ve Meiri, H., 2007, Second-trimester uterine artery Doppler pulsatility index and maternal serum PP13 as markers of pre-eclampsia, *Prenatal Diagnosis*, John Wiley & Sons, Ltd, 27(3), 258–263.
- Spencer, K., Cowans, N. J. ve Nicolaides, K. H., 2008, Low levels of maternal serum PAPP-A in the first trimester and the risk of pre-eclampsia, *Prenatal Diagnosis*, John Wiley & Sons, Ltd, 28(1), 7–10.
- Su, M.-T., Tsai, P.-Y., Tsai, H.-L., Chen, Y.-C. ve Kuo, P.-L., 2017, miR-346 and miR-582-3p-regulated EG-VEGF expression and trophoblast invasion via matrix metalloproteinases 2 and 9, *BioFactors*, 43(2), 210–219.
- Sze, M. A., Abbasi, M., Hogg, J. C. ve Sin, D. D., 2014, A Comparison between Droplet Digital and Quantitative PCR in the Analysis of Bacterial 16S Load in Lung Tissue Samples from Control and COPD GOLD 2, *PLoS ONE*, Edited by R. Manganelli, 9(10), e110351.
- Tadmor, A. D., Ottesen, E. A., Leadbetter, J. R. ve Phillips, R., 2011, Probing Individual Environmental Bacteria for Viruses by Using Microfluidic Digital PCR, *Science*, 333(6038), 58–62.
- Takahashi, K., Yan, I. K., Kim, C., Kim, J. ve Patel, T., 2014, Analysis of extracellular RNA by digital PCR., *Frontiers in oncology*, Frontiers Media SA, 4, 129.
- Tamagawa, T., Oi, S., Ishiwata, I., Ishikawa, H. ve Nakamura, Y., 2007, Differentiation of mesenchymal cells derived from human amniotic membranes into hepatocyte-like cells

- in vitro, *Human Cell*, 20(3), 77–84.
- Tanzer, A. ve Stadler, P. F., 2004, Molecular Evolution of a MicroRNA Cluster, *Journal of Molecular Biology*, 339(2), 327–335.
- Tavazoie, S. F., Alarcón, C., Oskarsson, T., Padua, D., Wang, Q., Bos, P. D., Gerald, W. L. ve Massagué, J., 2008, Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis, *Nature*, 451(7175), 147–152.
- Taylor, S. D., Ericson, N. G., Burton, J. N., Prolla, T. A., Silber, J. R., Shendure, J. ve Bielas, J. H., 2014, Targeted enrichment and high-resolution digital profiling of mitochondrial DNA deletions in human brain, *Aging Cell*, 13(1), 29–38.
- Than, N. G., Pick, E., Bellyei, S., Szigeti, A., Burger, O., Berente, Z., Janaky, T., Boronkai, A., Kliman, H., Meiri, H., Bohn, H., Than, G. N. ve Sumegi, B., 2004, Functional analyses of placental protein 13/galectin-13, *European Journal of Biochemistry*, John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 271(6), 1065–1078.
- Thangaratinam, S., Ismail, K., Sharp, S., Coomarasamy, A. ve Khan, K., 2006, Accuracy of serum uric acid in predicting complications of pre-eclampsia: a systematic review, *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 113(4), 369–378.
- Thumanu, K., Tanthanuch, W., Ye, D., Sangmalee, A., Lorthongpanich, C., Parnpai, R. ve Heraud, P., 2011, Spectroscopic signature of mouse embryonic stem cell-derived hepatocytes using synchrotron Fourier transform infrared microspectroscopy, *Journal of Biomedical Optics*, International Society for Optics and Photonics, 16(5), 057005.
- Tomiyama, H. ve Yamashina, A., 2010, Non-invasive vascular function tests: their pathophysiological background and clinical application., *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, 74(1), 24–33.
- Tondreau, T., Meuleman, N., Delforge, A., Dejeneffe, M., Leroy, R., Massy, M., Mortier, C., Bron, D. ve Lagneaux, L., 2005, Mesenchymal Stem Cells Derived from CD133-Positive Cells in Mobilized Peripheral Blood and Cord Blood: Proliferation, Oct4 Expression, and Plasticity, *Stem Cells*, 23(8), 1105–1112.
- Tsatsaris, V., Goffin, F., Munaut, C., Brichant, J.-F., Pignon, M.-R., Noel, A., Schaaps, J.-P., Cabrol, D., Franken, F. ve Foidart, J.-M., 2003, Overexpression of the Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor in Preeclamptic Patients: Pathophysiological Consequences, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(11), 5555–5563.
- Tsui, D. W. Y., Chan, K. C. A., Chim, S. S. C., Chan, L., Leung, T., Lau, T., Lo, Y. M. D. ve Chiu, R. W. K., 2007, Quantitative aberrations of hypermethylated RASSF1A gene sequences in maternal plasma in pre-eclampsia, *Prenatal Diagnosis*, John Wiley & Sons, Ltd, 27(13), 1212–1218.
- Tsui, N. B. Y. ve Lo, Y. M. D., 2008, A Microarray Approach for Systematic Identification of Placental-Derived RNA Markers in Maternal Plasma, in, Humana Press, 275–289.
- Tüfekci, K. U., Öner, M. G., Meuwissen, R. L. J. ve Genç, Ş., 2014, The Role of MicroRNAs in Human Diseases, in, 33–50.

- Usmani-Brown, S., Lebastchi, J., Steck, A. K., Beam, C., Herold, K. C. ve Ledizet, M., 2014, Analysis of β -Cell Death in Type 1 Diabetes by Droplet Digital PCR, *Endocrinology*, 155(9), 3694–3698.
- Vadlakonda, L., Pasupuleti, M. ve Pallu, R., 2013, Role of PI3K-AKT-mTOR and Wnt Signaling Pathways in Transition of G1-S Phase of Cell Cycle in Cancer Cells, *Frontiers in Oncology*, 3, 85.
- Valoczi, A., Hornyik, C., Varga, N., Burgyán, J., Kauppinen, S. ve Havelda, Z., 2004, Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes, *Nucleic Acids Research*, 32(22), e175–e175.
- Várallyay, É., Burgyán, J. ve Havelda, Z., 2008, MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes, *Nature Protocols*, Nature Publishing Group, 3(2), 190–196.
- Vasudevan, S., 2012, Posttranscriptional Upregulation by MicroRNAs, *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3(3), 311–330.
- Vatten, L. J. ve Skjaerven, R., 2004, Is pre-eclampsia more than one disease?, *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*, 111(4), 298–302.
- Vegh, I., Grau, M., Gracia, M., Grande, J., de la Torre, P. ve Flores, A. I., 2013, Decidua mesenchymal stem cells migrated toward mammary tumors in vitro and in vivo affecting tumor growth and tumor development, *Cancer Gene Therapy*, 20(1), 8–16.
- Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., Kim, Y. M., Bdolah, Y., Lim, K.-H., Yuan, H.-T., Libermann, T. A., Stillman, I. E., Roberts, D., D'Amore, P. A., Epstein, F. H., Sellke, F. W., Romero, R., Sukhatme, V. P., Letarte, M. ve Karumanchi, S. A., 2006, Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia, *Nature Medicine*, 12(6), 642–649.
- Verlohren, S., Stepan, H. ve Dechend, R., 2012, Angiogenic growth factors in the diagnosis and prediction of pre-eclampsia, *Clinical Science*, 122(2), 43–52.
- Visegrády, B., Than, N. G., Kilár, F., Sümegi, B., Than, G. N. ve Bohn, H., 2001, Homology modelling and molecular dynamics studies of human placental tissue protein 13 (galectin-13), *Protein Engineering, Design and Selection*, Narnia, 14(11), 875–880.
- Visser, W. ve Wallenburg, H. C. S., 1995, Maternal and perinatal outcome of temporizing management in 254 consecutive patients with severe pre-eclampsia remote from term, *European Journal of Obstetrics and Gynecology*, Elsevier, 63(2), 147–154.
- Wagner, W., Bork, S., Horn, P., Krunic, D., Walenda, T., Diehlmann, A., Benes, V., Blake, J., Huber, F.-X., Eckstein, V., Boukamp, P. ve Ho, A. D., 2009, Aging and Replicative Senescence Have Related Effects on Human Stem and Progenitor Cells, *PLoS ONE*, Edited by M. Capogrossi, 4(6), e5846.
- Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W. ve Ho, A. D., 2005, Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood, *Experimental Hematology*, 33(11), 1402–1416.
- Walknowska, J., Conte, F. ve Grumbach, M., 1969, Practical and theoretical implications of

- fetal/maternal lymphocyte transfer, *The Lancet*, Elsevier, 293(7606), 1119–1122.
- Wang, H., Qin, J., Gong, S., Feng, B., Zhang, Y. ve Tao, J., 2014, Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor-Mediated Inhibition of A-type K (+) Current Induces Sensory Neuronal Hyperexcitability Through the Phosphatidylinositol 3-Kinase and Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Pathways, Independently of Akt, *Endocrinology*, 155(1), 168–179.
- Wang, H. S., Hung, S. C., Peng, S. T., Huang, C. C., Wei, H. M., Guo, Y. J., Fu, Y. S., Lai, M. C. ve Chen, C. C., 2004, Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord, *Stem Cells*, 22(7), 1330–1337.
- Wang, J., Chen, J. ve Sen, S., 2016, MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics, *Journal of Cellular Physiology*, 231(1), 25–30.
- Wang, J. X., Knottnerus, A.-M., Schuit, G., Norman, R. J., Chan, A. ve Dekker, G. A., 2002, Surgically obtained sperm , and risk of gestational hypertension and pre-eclampsia Congenital rubella syndrome : a risk in immigrant populations, *The Lancet*, 359, 673–674.
- Wang, K., Li, P., Dong, Y., Cai, X., Hou, D., Guo, J., Yin, Y., Zhang, Y., Li, J., Liang, H., Yu, B., Chen, J., Zen, K., Zhang, J., Zhang, C.-Y. ve Chen, X., 2011, A microarray-based approach identifies ADP ribosylation factor-like protein 2 as a target of microRNA-16, *Journal of Biological Chemistry*, 286(11), 9468–9476.
- Wang, L., Jianzhong, W., Jianwei, L., Rong, M., Dawei, S. ve Jinhai, T., 2015, Regulation of the cell cycle and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway by tanshinone I in human breast cancer cell lines, *Molecular Medicine Reports*, 11(2), 931–939.
- Wang, W., Feng, L., Zhang, H., Hachy, S., Satohisa, S., Laurent, L. C., Parast, M., Zheng, J. ve Chen, D., 2012, Preeclampsia Up-Regulates Angiogenesis-Associated MicroRNA (i.e., miR-17, -20a, and -20b) That Target Ephrin-B2 and EPHB4 in Human Placenta, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(6), E1051–E1059.
- Wang, Y., Fan, H., Zhao, G., Liu, D., Du, L., Wang, Z., Hu, Y. ve Hou, Y., 2012, MiR-16 inhibits the proliferation and angiogenesis-regulating potential of mesenchymal stem cells in severe pre-eclampsia, *FEBS Journal*, 279(24), 4510–4524.
- Wang, Ying, Zhang, Yang, Wang, H., Wang, J., Zhang, Yiyuan, Wang, Yingzhe, Pan, Z. ve Luo, S., 2014, Aberrantly up-regulated mir-20a in pre-eclampsic placenta compromised the proliferative and invasive behaviors of trophoblast cells by targeting forkhead box protein A1, *International Journal of Biological Sciences*, 10(9), 973–982.
- Watanabe, H., Hamada, H., Yamada, N., Sohda, S., Yamakawa-Kobayashi, K., Yoshikawa, H. ve Arinami, T., 2004, Proteome analysis reveals elevated serum levels of clusterin in patients with preeclampsia, *Proteomics*, John Wiley & Sons, Ltd, 4(2), 537–543.
- Waugh, J. J. S., Clark, T. J., Divakaran, T. G., Khan, K. S. ve Kilby, M. D., 2004, Accuracy of Urinalysis Dipstick Techniques in Predicting Significant Proteinuria in Pregnancy, *Obstetrics & Gynecology*, 103(4), 769–777.
- Wen, S. W., Demissie, K., Yang, Q. ve Walker, M. C., 2004, Maternal morbidity and obstetric complications in triplet pregnancies and quadruplet and higher-order multiple pregnancies, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 191(1), 254–258.

- White, R. A., Blainey, P. C., Fan, H. C. ve Quake, S. R., 2009, Digital PCR provides sensitive and absolute calibration for high throughput sequencing, *BMC Genomics*, 10(1), 116.
- Wiencke, J. K., Bracci, P. M., Hsuang, G., Zheng, S., Hansen, H., Wrensch, M. R., Rice, T., Eliot, M. ve Kelsey, K. T., 2014, A comparison of DNA methylation specific droplet digital PCR (ddPCR) and real time qPCR with flow cytometry in characterizing human T cells in peripheral blood, *Epigenetics*, 9(10), 1360–1365.
- Wightman, B., Ha, I. ve Ruvkun, G., 1993, Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*., *Cell*, 75(5), 855–62.
- Wolbank, S., Griensven, M., Grillari-Voglauer, R. ve Peterbauer-Scherb, A., 2010, Alternative Sources of Adult Stem Cells: Human Amniotic Membrane, in *Bioreactor Systems for Tissue Engineering II*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1–27.
- De Wolf, F., De Wolf-Peeters, C., Brosens, I. ve Robertson, W. B., 1980, The human placental bed: electron microscopic study of trophoblastic invasion of spiral arteries., *American journal of obstetrics and gynecology*, 137(1), 58–70.
- Wolf, M., Kettle, E., Sandler, L., Ecker, J. L., Roberts, J. ve Thadhani, R., 2001, Obesity and preeclampsia: the potential role of inflammation., *Obstetrics and gynecology*, 98(5 Pt 1), 757–62.
- Wolf, M., Sandler, L., Muñoz, K., Hsu, K., Ecker, J. L. ve Thadhani, R., 2002, First trimester insulin resistance and subsequent preeclampsia: A prospective study, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(4), 1563–1568.
- Wolfberg, A. J., Lee-Parritz, A., Peller, A. J. ve Lieberman, E. S., 2004, Association of rheumatologic disease with preeclampsia, *Obstetrics and Gynecology*, 103(6), 1190–1193.
- Worapamorn, W., Li, H., Haase, H. R., Pujic, Z., Girjes, A. A. ve Bartold, P. M., 2000, Cell Surface Proteoglycan Expression by Human Periodontal Cells, *Connective Tissue Research*, 41(1), 57–68.
- Worapamorn, W., Tam, S. P., Li, H., Haase, H. R. ve Bartold, P. M., 2002, Cytokine regulation of syndecan-1 and -2 gene expression in human periodontal fibroblasts and osteoblasts, *Journal of Periodontal Research*, John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 37(4), 273–278.
- Wu, L., Song, W., Xie, Y., Hu, L., Hou, X., Wang, R., Gao, Y., Zhang, J., Zhang, L., Li, W., Zhu, C., Gao, Z. ve Sun, Y., 2018, miR-181a-5p suppresses invasion and migration of HTR-8/SVneo cells by directly targeting IGF2BP2, *Cell Death & Disease*, Nature Publishing Group, 9(2), 16.
- Wu, L., Zhou, H., Lin, H., Qi, J., Zhu, C., Gao, Z. ve Wang, H., 2012, Circulating microRNAs are elevated in plasma from severe preeclamptic pregnancies, *Reproduction*, 143(3), 389–397.
- Xi, Y., Tan, K., Brumwell, A. N., Chen, S., Kim, Y.-H., Kim, T. J., Wei, Y. ve Chapman, H. A., 2013, Inhibition of Epithelial to Mesenchymal Transition and Pulmonary Fibrosis by Methacycline, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 50(1), 130814142613007.

- Yen, B. L., Huang, H.-I., Chien, C.-C., Jui, H.-Y., Ko, B.-S., Yao, M., Shun, C.-T., Yen, M., Lee, M.-C. ve Chen, Y.-C., 2005, Isolation of Multipotent Cells from Human Term Placenta, *Stem Cells*, 23(1), 3–9.
- Yin, J. Q., Zhao, R. C. ve Morris, K. V., 2008, Profiling microRNA expression with microarrays, *Trends in Biotechnology*, 26(2), 70–76.
- Yoda, M., Kawamata, T., Paroo, Z., Ye, X., Iwasaki, S., Liu, Q. ve Tomari, Y., 2010, ATP-dependent human RISC assembly pathways, *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(1), 17–23.
- Yoo, H. J., Yoon, S. S., Park, S., Park, W. S., Kim, D. J., Lee, E. B. ve Song, Y. W., 2005, Production and Characterization of Monoclonal Antibodies to Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Bone Marrow, *Hybridoma*, 24(2), 92–97.
- Zhang, H., Kolb, F. A., Jaskiewicz, L., Westhof, E. ve Filipowicz, W., 2004, Single Processing Center Models for Human Dicer and Bacterial RNase III, *Cell*, 118(1), 57–68.
- Zhao, G., Miao, H., Li, X., Chen, S., Hu, Y., Wang, Z. ve Hou, Y., 2016, TGF- β 3-induced miR-494 inhibits macrophage polarization via suppressing PGE2 secretion in mesenchymal stem cells, *FEBS Letters*, 590(11), 1602–1613.
- Zhao, G., Zhou, X., Chen, S., Miao, H., Fan, H., Wang, Z., Hu, Y. ve Hou, Y., 2014, Differential expression of microRNAs in decidua-derived mesenchymal stem cells from patients with pre-eclampsia, *Journal of Biomedical Science*, 21(1), 1–12.
- Zhong, X. Y., Holzgreve, W. ve Hahn, S., 2002, The levels of circulatory fetal dna in maternal plasma are elevated prior to the onset of preeclampsia, *Hypertension in Pregnancy*, 21(1), 77–83.
- Zhou, C. C., Zhang, Y., Irani, R. A., Zhang, H., Mi, T., Popek, E. J., Hicks, M. J., Ramin, S. M., Kellems, R. E. ve Xia, Y., 2008, Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice, *Nature Medicine*, Nature Publishing Group, 14(8), 855–862.
- Zhou, W., Tian, Y.-F., Yin, B.-C. ve Ye, B.-C., 2017, Simultaneous Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Detection of Multiplexed MicroRNA Biomarkers, *Analytical Chemistry*, 89(11), 6120–6128.
- Zhou, Y., Damsky, C. H., Chiu, K., Roberts, J. M. ve Fisher, S. J., 1993, Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts., *The Journal of clinical investigation*, American Society for Clinical Investigation, 91(3), 950–60.
- Zhou, Y., Fisher, S. J., Janatpour, M., Genbacev, O., Dejana, E., Wheelock, M. ve Damsky, C. H., 1997, Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate: A strategy for successful endovascular invasion?, *Journal of Clinical Investigation*, American Society for Clinical Investigation, 99(9), 2139–2151.
- Zhu, X., Han, T., Sargent, I. L., Yin, G. ve Yao, Y., 2009, Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Mosby, 200(6), 661.e1-661.e7.
- Zimmermann, P. ve David, G., 1999, The syndecans, tuners of transmembrane signaling, *The*

FASEB Journal, 13(9001), S91–S100.

Zou, A.-X., Chen, B., Li, Q.-X. ve Liang, Y.-C., 2018, MiR-134 inhibits infiltration of trophoblast cells in placenta of patients with preeclampsia by decreasing ITGB1 expression., *European review for medical and pharmacological sciences*, 22(8), 2199–2206.



EKLER

EK1: Etik kurul belgesi

Tarih ve Sayı: 09/06/2017-219819





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

Sayı :83045809-604.01.02-
Konu :Doç.Dr.Mahmut Öncül'ün etik
kurul kararı A-05

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi :28.04.2017 tarih, 52825153-604.01.01-163555 sayılı yazı

Anabilim Dalınız öğretim üyesi **Doç.Dr.Mahmut ÖNCÜL**'ün sorumluluğunda **Prof.Dr.Ali BENİAN ve Doç.Dr.Tuba GÜNEL**'in danışmanlıklarında **Doç.Dr.Abdullah TÜTEN ve Araş.Gör.Ece GÜMÜŞOĞLU**'nun yardımcılıklarında "**Preeklampsinin Erken Tanısı İçin Mezenkimal Kök Hücrelerden Elde Edilen miRNA'lardan Biyomarker Seçimi**" başlıklı (TÜBİTAK/Araştırma Fonu) çalışma hakkında ilgi yazınız ve ekleri **06 Haziran 2017** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup;Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) ve TÜBİTAK desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Başkan

e-İmzalı
Prof. Dr. Gökhan İPEK
Bölüm Başkanı

EK :
1 dosya elden teslim edilecektir.

Doğrulamak için:<http://194.27.128.66/envision.Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BE5UNSC8D>

Ayrıntılı bilgi için irtibat : Güler SOYDANER Dahili : 22300

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL
Tel : 0 (212) 414 30 00 21107- 21108 Faks : 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.

GİRİŞİMSSEL OLMAYAN İLAÇ DIŞI KLİNİK ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

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

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Preeklampsinin erken tanısı için mezenkimal kök hücrelerden elde edilen miRNA'lardan biyomarker seçimi		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Mahmut ÖNCÜL		
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Kadın Hastalıkları ve Doğum		
	KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ali Benian Doç. Dr. Tuba Günel		
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI	Prof. Dr. Ali Benian- Kadın Hastalıkları ve Doğum Doç. Dr. Tuba Günel-Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Ve Genetik Bölümü		
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı İ.Ü. Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Ve Genetik Bölümü		
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Fatih/İstanbul İ.Ü. Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Tanı ve Analiz Birimi, Vezneciler/Fatih/İstanbul		
	BAŞVURULAN ETİK KURULUN ADI	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu		
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	TUBİTAK, İ.Ü. BAP		
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	TUBİTAK, İ.Ü. BAP		
UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ ☐ DOKTORA TEZİ ☐ YÜKSEK LİSANS TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☒ YANDAL UZMANLIK TEZİ ☐		
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	☐ Anket çalışması ☐ Retrospektif (geriye dönük) araştırma ☐ Girişimsel (invaziv) olmayan klinik araştırma ☒ Rutin tetkik ve tedavi işlemleri sırasında elde edilmiş materyallerle (kan, idrar, gayta, doku, görüntü gibi) yapılan çalışma ☐ Hemşirelik faaliyetlerinin sınırı içerisinde yapılan araştırma ☐ Vücut fizyolojisi çalışması ☐ Antropometrik ölçümlere dayalı çalışma ☐ Yaşam alışkanlıklarının değerlendirilmesi çalışması DİĞER ☐ Diğer ise belirtiniz:			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐

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



KARAR BİLGİLERİ	Karar No: A-05	Tarih: 06 Haziran 2017
	Doç.Dr.Mahmut ÖNCÜL'ün sorumluluğunda Prof.Dr.Ali BENİAN ve Doç.Dr.Tuba GÜNEL'in danışmanlıklarında Doç.Dr.Abdullah TÜTEN ve Araş.Gör.Ece GÜMÜŞOĞLU'nun yardımcılıklarında yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

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

ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR (Başkan)	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	IÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Mehmet Faik ÖZÇELİK (Başkan Yard.)	Genel Cerrahi	IÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Muhlis Cem AR (Raportör)	İç Hastalıkları Hematoloji	IÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Zeki ÖNGEN	Kardiyoloji	IÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Öner SÜZER	Farmakoloji	IÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Nurten Uzun ADATEPE	Nöroloji	IÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Hakkı Oktay SEYMEN	Fizyoloji	IÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Ayşe Pervin Sutaş BOZKURT	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	IÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof. Dr. Gülten DİNÇ	Deontoloji	IÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Suphi VEHİD	Halk Sağlığı	IÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Zeynep Hande TURNA	İç Hastalıkları Medikal Onkoloji	IÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Mutlu NIYAZOĞLU	İç Hastalıkları	İst. Eğitim ve Araştırma Hast.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Avukat Ayfer DİKMEN	Ticaret ve Sağlık Hukuku	Serbest Hukuk Bürosu	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Zümrüt GAMLI	Emekli Öğretmen	Sivil Üye	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

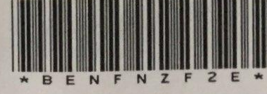
* :Araştırma ile İlişki

** :Toplantıda Bulunma



Scanned with CamScanner

Tarih ve Sayı: 28/04/2017-163555



**T.C.
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı
Başkanlığı**



A-05

Sayı :52825153-604.01.01-
Konu :Etik Kurul Onayı hk.

CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi :09/02/2017 tarihli, 55370 sayılı yazı

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalımız Öğretim Üyesi Prof.Dr.Ali BENİAN yönetiminde Doç.Dr.Mahmut ÖNCÜL tarafından yürütülecek olan "Preeklampsinin erken tanısı için mezenkimal kök hücrelerden elde edilen miRNA'lardan biyomarker seçimi" başlıklı çalışmadaki eksiklikler tamamlanmış olup, Etik Kurul onayı gerekmektedir.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Ali BENİAN
Anabilim Dalı Başkanı V.

e-İmzalı
Prof. Dr. Gökhan İPEK
Bölüm Başkanı

Doğrulamak İçin:<http://194.27.128.66/envision.Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BENFNZF2E>

Ayrıntılı bilgi için irtibat : Baha KABA Dahili : 21539

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.

İÜC Tarih ve Sayı: 06/09/2018-52166



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



Sayı :83045809-604.01.02-
 Konu :Doç.Dr.Mahmut ÖNCÜL'ün
 etik kurul kararı H-02

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi :17.08.20108 tarihli, 46434 sayılı yazı

Anabilim Dalınız öğretim üyesi **Doç.Dr.Mahmut ÖNCÜL**'ün sorumluluğunda **Prof.Dr.Ali BENİAN** ve **Doç.Dr.Tuba GÜNEL**'in danışmanlıklarında **Doç.Dr.Abdullah TÜTEN** ve **Araş.Gör.Ece GÜMÜŞOĞLU**'nun yardımcılıklarında "Preeklampsinin Erken Tanısı İçin Mezenkimal Kök Hücrelerden Elde Edilen miRNA'lardan Biyomarker Seçimi" başlıklı (TÜBİTAK/Araştırma Fonu) çalışmasına, **Koç Üniversitesi'nden Dr.Öğretim Üyesi Serçin KARAHÜSEYİNOĞLU** ve **Yüksek Lisans Öğr. Kübra SARI**'nın yardımcı araştırmacı olarak katılması hakkında **04 Eylül 2018** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı
 Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR
 Başkan

e-İmzalı
 Prof. Dr. Gökhan İPEK
 Bölüm Başkanı

Doğrulamak İçin: <http://dogrulama.istanbulc.edu.tr/enVision.sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BEKR03L9D>

Ayrıntılı bilgi için irtibat : Güler SOYDANER Dahili : 22300

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL

Tel : 0 (212) 414 30 00 Faks : 0 (212) 632 00 33

e-posta : ctipersonel@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbulc.edu.tr



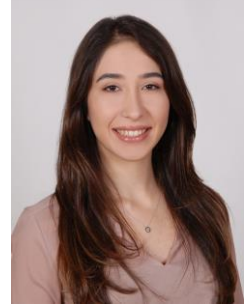
CamScanner



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı Nilüfer KAMALI
 Doğum Yeri Divriği
 Doğum Tarihi 03.06.1994
 Uyruğu ☒ T.C. ☐ Diğer:
 Telefon +905064530227
 E-Posta Adresi niluferkamali@gmail.com
 Web Adresi



Eğitim Bilgileri

Lisans

Üniversite İstanbul Üniversitesi
 Fakülte Fen Fakültesi
 Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
 Mezuniyet Yılı 20.06.2016

Yüksek Lisans

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

Makale ve Bildiriler

Gunel, T., **Kamali, N.**, Hosseini, M. K., Gumusoglu, E., Benian, A., & Aydinli, K. (2018). Regulatory effect of miR-195 in the placental dysfunction of preeclampsia. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine, 1-8.