



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ- CERRAHPAŞA
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**TEDAVİ GÖRMEMİŞ PREEKLAMPTİK GEBELERDE
MİR-200C EKSPRESYONU İLE PLAZMA VASKÜLER
PEROKSİDAZ 1 (VPO1), HUMANİN VE MOTSC
DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

TIBBİ BİYOKİMYA UZMANLIK TEZİ
Dr. Erkam Coşkun

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Hakan Ekmekçi
İSTANBUL-2021

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ- CERRAHPAŞA
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TEDAVİ GÖRMEMİŞ PREEKLAMPTİK GEBELERDE
MİR-200C EKSPRESYONU İLE PLAZMA VASKÜLER
PEROKSİDAZ 1 (VPO1), HUMANİN VE MOTSC
DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

TIBBİ BİYOKİMYA UZMANLIK TEZİ
Dr. Erkam Coşkun

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Hakan Ekmekçi
İSTANBUL-2021



Bu çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir. Proje No:33246

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince akademik ve entelektüel anlamda örnek kişiliğiyle bana rehber olan, eğitimimin sonlarına doğru zorlu pandemi koşullarına rağmen çok yönlü gelişimimi ve öğrenme sürecimi devam ettirmemde koşulsuz destek olan ve tez çalışmamda katkısını ve sabrını sunan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Hakan Ekmekçi'ye,

Eğitimim süresince ilgisini ve vaktini ayırmakta tereddüt etmeyen anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Hüseyin Sönmez'e,

Uzmanlık eğitimimin akademik ayağında, teşvikleriyle önümü açan Prof. Dr. Özlem Balcı Ekmekçi'ye,

Uzmanlık eğitimine başladığımdan bu yana klinik biyokimyanın önemi ve değerini fırsatlar sunarak bana öğreten kıymetli Prof. Dr. Dildar Konukoğlu'na, Fikret Biyal Merkez Laboratuvarı'nda özveriyle çalışarak bana iş hayatı örneği sunan Prof. Dr. Murat Bolayır ve Prof. Dr. Mine Kucur'a,

Tezimin istatistik çalışmasını yaparken derin bilgi ve tecrübesini aktaran Prof. Dr. Zeynep Banu Güngör'e,

Uzmanlık eğitimi çatısı altında gelişmeye katkıda bulunan ve yoğun emeği olan Prof. Dr. Hafize Uzun ve saygıdeğer anabilim dalı öğretim üyesi hocalarım ve öğretim görevlilerine,

Tezimin numune toplama aşamasında bana yardımcı olan Kadın Doğum Hastalıkları Anabilim Dalı'nda görevli Doç. Dr. Abdullah Tüten'e,

Uzmanlık eğitiminin hayatıma kattığı, renkli ve özel kişilikleriyle bana her daim iyi hissettiren asistan arkadaşlarım Özer ve Melek'e, beraber uyum içinde çalıştığımız ve deneyimlerinden yararlandığım laboratuvar personeli ile kürsü personeli ve diğer asistan arkadaşlarıma,

Çalışmama katılmayı kabul eden gönüllülere,

Tüm bu süreçte ilerlememe önayak olan gizli itici gücün kaynağı aileme çok teşekkür ederim.

Dr.Erkam Coşkun

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
TABLolar DİZİNİ	VI
SİMGE VE KISALTMALAR	VII
ETİK KURUL ONAYI	X
ÖZET	XI
ABSTRACT	XII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Gebelikle ilişkili Hipertansif Bozukluklar	5
2.1.1. Kronik Hipertansiyon	5
2.1.2. Gestasyonel Hipertansiyon	5
2.1.3. Preeklamps, Eklamps ve HELLP Sendromu	6
2.1.4. Kronik Hipertansiyona Süperempoze Preeklamps	8
2.2. Preeklamps	8
2.2.1. Preeklampsinin Epidemiyolojisi	8
2.2.2. Preeklamps Patogenezi	8
2.2.2.1. Plasentanın Anormal Gelişimi	9
2.2.2.2. İmmunolojik Faktörler	13
2.2.2.3. Genetik Faktörler	14
2.2.2.4. Çevresel Faktörler	15
2.2.2.5. Enflamasyon	15

2.2.2.6.	Anjiyotensin II'ye aşırı duyarlılık.....	16
2.2.2.7.	Kompleman aktivasyonu.....	16
2.2.2.8.	Endotel disfonksiyonu.....	16
2.3.	MikroRNA.....	26
2.3.1.	miR-200c.....	27
2.4.	Vasküler peroksidaz 1 (VPO1).....	29
2.5.	Humanin (HN).....	31
2.6.	MOTS-c (mitochondrial open-reading frame of the twelve S rRNA-c).....	35
3.	GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	39
3.1.	Çalışma gruplarının oluşturulması.....	39
3.2.	Çalışmadan dışlanma kriterleri.....	40
3.3.	Örneklerin alınması ve çalışılan parametreler.....	41
3.4.	Yöntemler.....	41
3.4.1.	Serum miRNA-200c tayini.....	41
3.4.1.1.	RNA izolasyonu.....	41
3.4.1.2.	cDNA Sentezi.....	42
3.4.1.3.	Real Time PCR.....	45
3.4.1.4.	Yöntemin prensibi.....	45
3.4.2.	Plazma VPO1 düzeyinin tayini.....	47
3.4.2.1.	Yöntemin prensibi.....	47
3.4.2.2.	Kullanılan ayıraçlar.....	48
3.4.2.3.	Testin yapılışı.....	48
3.4.3.	Plazma MOTS-c düzeyinin tayini.....	49
3.4.3.1.	Yöntemin prensibi.....	49

3.4.3.2.	Kullanılan ayıraçlar	50
3.4.3.3.	Testin yapılışı	50
3.4.4.	Plazma Humanin düzeyinin tayini	51
3.4.4.1.	Yöntemin prensibi	51
3.4.4.2.	Kullanılan ayıraçlar	52
3.4.4.3.	Testin yapılışı	52
3.4.5.	Plazma Endoglin düzeyinin tayini	53
3.4.5.1.	Yöntemin prensibi	54
3.4.5.2.	Kullanılan ayıraçlar	54
3.4.5.3.	Testin yapılışı	54
3.5.	İstatistiksel yöntemler	56
4.	BULGULAR.....	57
4.1.	Demografik özellikler ve rutin laboratuvar parametreleri	57
4.2.	Plazma Endoglin, VPO1, MOTS-c, Humanin ve miR-200c düzeyleri.....	61
4.3.	miR-200c göreceli ekspresyonları	63
4.3.1.	Korelasyon Analizleri.....	65
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	69
6.	ÖZGEÇMİŞ	78
7.	İNTİHAL RAPORU	79
8.	KAYNAKLAR.....	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Myometriyal ve endometriyal arterler	10
Şekil 2: Anormal Plasenta Gelişimi	11
Şekil 3: sFlt-1, VEGF ve sEng	18
Şekil 4: Haftalara göre sFlt-1 konsantrasyonları	19
Şekil 5: sFlt-1 artışı ve preeklampsi	20
Şekil 6: Haftalara Göre PIGF konsantrasyonları	21
Şekil 7: Preeklampsi Yolakları	25
Şekil 8: miR-200 ailesi	27
Şekil 9: NOX, SOD ve VPO1 yolakları	29
Şekil 10: Kardiyovasküler sistemde NOX, SOD ve VPO1 aracılı oksidatif stres	30
Şekil 11: Humanin	32
Şekil 12: Humaninin hücresel etkileri	33
Şekil 13: MOTs-c açık okuma çerçevesi	35
Şekil 14: MOTs-c'nin etkileri	36
Şekil 15: VPO1 Standart Eğrisi	49
Şekil 16: MOTs-c Standart Eğrisi	51
Şekil 17: Humanin Standart Eğrisi	53
Şekil 18: Endoglin Standart Eğrisi	55
Şekil 19: miR-200c göreceli ekspresyon seviyeleri	64

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Preeklampsia Tanı Kriterleri	7
Tablo 2: miR-200c ve U6 primer sekansları	43
Tablo 3: cDNA Sentezi Master Karışım Hazırlama Oranları	43
Tablo 4: cDNA RT protokolü	44
Tablo 5: Real-Time PCR reaksiyon karışımı	46
Tablo 6: 2 basamaklı termal döngü protokolü	47
Tablo 7: Demografik Özellikler ve Rutin Laboratuvar Verileri	57
Tablo 8: Kontrol ve preeklampsia alt gruplarının genel özellikleri ve rutin laboratuvar sonuçları (Ort±SD)	59
Tablo 9: Endoglin, VPO1, Humanin, MOTS-c ve miR-200c düzeylerinin ortalama ve standart sapmaları	61
Tablo 10: Alt grupların Endoglin, VPO1, Humanin, MOTS-c ve miR-200c düzeylerinin ortalama ve standart sapmaları	62

SİMGE VE KISALTMALAR

3'-UTR: "3'-Untranslated Region" 3'-Çevrilmemiş Bölge

ACOG : Amerikan Obstetrisyenler ve Jinekologlar Derneği

ADP: Adenozin Difosfat

AFAS : Antifosfolipid Antikor Sendromu

ALP: Alkalen Fosfataz

AMP: Adenozin Monofosfat

AMPK: "AMP-Activated Protein Kinase" AMP ile Aktive Olan Protein Kinaz

ATP: Adenozin Trifosfat

Bax: Bcl2-İle İlişkili X Protein

Bcl 2: B Lenfosit Lösemi/Lenfoma Proteini

CRP: C-Reaktif Protein

CT: "The Threshold Cycle" Eşik Döngüsü

CV : "Coefficient Of Variation" Varyasyon Katsayısı

DM: Diyabetes Mellitus

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

ELISA : "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" Enzim-İşaretli İmmün Yöntem

FPRL : "Human G Protein-Coupled Formylpeptide Receptor" İnsan G Proteinine Bağlı Formilpeptid Reseptörü"

GLUT: Glukoz Taşıyıcı

Gp: Glikoprotein

HDL: "High Density Lipoprotein" Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein

HELLP : Hemoliz, Yükselmiş Karaciğer Enzimleri ve Düşük Trombosit ile Birlikte GÖsteren Gestasyonel Hipertansif Sendrom

HIF-1 α : Hipoksi ile İndüklenen Faktör-1 alfa subüniti

HLA : İnsan Lökosit Antijeni

HN: Humanin

HRP: Horseradish Peroksidaz

IL : İnterlökin

IUGG : İntrauterin Gelişme Geriliği

KAH: Koroner Arter Hastalığı

KB: Kan Basıncı

LDH : Laktat Dehidrojenaz

LDL : Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

MELAS: Mitokondriyal Miyopati, Ensefalopati, Laktik Asidoz ve İnme Benzeri Epizotlar Sendromu

MHC: Majör Histokompatibilite Kompleksi

MI: Myokard Infarktüsü

miRNA: MikroRNA

MOTS-c: “Mitochondrial Open-Reading Frame Of The Twelve S rRNA-c” 12S rRNA-c'nin Mitokondriyal Açık Okuma Çerçevesi

mRNA: Mesajcı RNA

MTHFR : Metiltetrahidrofolat Redüktaz

NO: Nitrik Oksit

OD : Optik Dansite

PE: Preeklampsi

Plgf : Plasental Büyüme Faktörü

qPCR: “Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction” Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RNA: Ribo Nükleik Asit

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

RT-PCR: “Real Time Polymerase Chain Reaction” Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi

sEng: Çözünür Endoglin

sFlt-1 : Çözünür Fms Benzeri Tirozin Kinaz

SLE : Sistemik Lupus Eritematozus

SVO: Serebrovasküler Olay

TGF : Transforme Edici Büyüme Faktörü

TGF- β : Transforme Edici Büyüme Faktörü- β

TNF : Tümör Nekrotizan Faktör

VEGF : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

VKİ : Vücut Kitle İndeksi

VPO1: Vasküler Peroksidaz 1

ETİK KURUL ONAYI

İÜC Tarih ve Sayı: 07/12/2018-106555



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



Sayı :83045809-604.01.02-
Konu :Uzm. Öğr.Erkam COŞKUN'un
etik kurul kararı A-52

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi :16.11.2018 tarih, 68871907-604.01.01-93618 sayılı

Anabilim Dalınız öğretim üyesi Prof.Dr.Hakan EKMEKÇİ'nin danışmanlığında Uzm. Öğr.Erkam COŞKUN'ın yürütücülüğünde Prof.Dr.Özlem Balcı EKMEKÇİ, Prof.Dr.Zeynep Banu GÜNGÖR, Doç.Dr.Abdullah TUTEN ve Doç.Dr.Mahmut ONCUL'un yardımcılıklarında "Tedavi Görmemiş Preeklampsi: Gebelerde miR200-c Ekspresyonu ile Plazma Vasküler Peroksidaz I (VPO-I), Humanin ve MOTS-c Düzeylerinin Değerlendirilmesi" başlıklı Uzmanlık Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri 04 Aralık 2018 tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna mizakere edilmiş olup,Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Başkan

e-İmzalı
Prof. Dr. Emine Gülderen ŞAHİN
Bölüm Başkanı

NOT:Yönetmelik gereği Sonuç Raporunun ve Bilimsel Araştırma Projeleri Desteği onay belgesinin Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna iletilmesi gerekmektedir.

EK :
1 dosya elden teslim edilecektir.

Doğrulamak için: psidogrulama@istanbulc.edu.tr/en/vb/lon.a.orgula/belgedogrulama.aspx?V=5EKV00JAA

Ayrıntılı bilgi için iribat : Oğuz SOYDANER. Dahili : 22300

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL

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

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

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

ÖZET

Amaçlar: Çalışmamızın amacı, tedavi görmemiş preeklampitik gebelerde miR-200c ekspresyonu ile plazma vasküler peroksidaz 1 (VPO1), humanin ve MOTS-c düzeylerinin değerlendirilmesidir.

Gereç ve Yöntem: Amerikan Obstetrisyenler ve Jinekologlar Derneği (ACOG) kriterlerine göre; kontrol (n:30) ve preeklampsi (n:50) grupları oluşturuldu. Kliniğe başvuran hastaların tedavisi başlanmadan önce alınan kan örneklerinde miR-200c RT-PCR yöntemiyle, vasküler peroksidaz 1 (VPO1), humanin ve MOTS-c düzeyleri ELISA prensibi ile ölçüldü. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak belirlendi.

Bulgular: Endoglin, VPO1 ve miR-200c düzeyleri preeklampsi hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. MOTS-c düzeyleri preeklampsi hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. Humanin düzeyleri, preeklampsi hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı bulunmadı.

Sonuç: Çalışmamızın sonuçları, preeklampitik hastalardaki endotelial disfonksiyona VPO1 ile miR-200c düzeylerinin artışının ve Humanin ile MOTS-c düzeylerinin ise azalışının katkıda bulunabileceğini ve bu değişimlerin hastalık patogenezi ve şiddetiyle ilişkili olabileceğini destekler niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Preeklampsi, VPO1, MOTS-c, Humanin, miR-200c

ABSTRACT

Aim: The aim of our study was to evaluate plasma vascular peroxidase 1 (VPO1), humanin and MOTS-c levels with miR-200c expression in untreated preeclamptic pregnant women.

Material and Methods: According to the criteria of the American Society of Obstetricians and Gynecologists (ACOG), control (n:30) and preeclampsia (n:50) groups were selected. Patient samples were collected before patients began their treatment at the clinic. miR-200c was determined by RT-PCR; Endoglin, VPO1, Humanin and MOTS-c were determined by ELISA. Statistical significance was determined as $p < 0.05$.

Results: Endoglin, VPO1, and miR-200c levels were significantly higher in preeclampsia patients than in the control group. MOTS-c levels were significantly lower in preeclampsia patients than in the control group. Humanin levels were not found to be significantly different in preeclampsia patients compared to the control group.

Conclusion: The results of our study support that an increase in miR-200c levels with VPO1 and a decrease in MOTS-c levels with Humanin may contribute to endothelial dysfunction in preeclamptic patients and that these changes may be associated with disease pathogenesis and severity.

Keywords: Preeclampsia, VPO1, MOTS-c, Humanin, miR-200c

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Preeklampsi, gebeliğin 20. haftasından sonra ortaya çıkan, hipertansiyon ve proteinüri/hedef organ hasarı ile karakterize, sistemik bir hastalıktır(1). Tüm gebeliklerin %5'inde preeklampsi gelişir(2). Preeklampside oluşan komplikasyonlar nedeniyle anne ve fetus risk altındadır(3). Bu yüzden preeklampsi maternal, fetal ve neonatal mortalitenin başlıca nedenlerinden biridir(4). Gelişmiş ülkelerde maternal ölümlerin %16'sı hipertansif bozukluklardan kaynaklanmaktadır. Ülkemizde de anne ölümlerinin en önde gelen nedeni preeklampsidir.

Preeklampsinin sebebi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Patogenezinde endotelial disfonksiyonu, plasentanın anormal gelişimi (anormal sitotrofoblastik invazyon, plasental hipoperfüzyon, hipoksi, iskemi), artmış immün sistem yanıtı, genetik yatkınlık, çevresel faktörler, enflamasyon, anjiyotensin 2'ye karşı artmış hassasiyet ve kompleman aktivasyonu gibi pek çok faktörün etkili olabileceği düşünülmektedir(5–21).

Preeklampsi klinik bulguların ortaya çıkış haftasına göre erken (34 hafta öncesi) ve geç (34 hafta sonrası) preeklampsi olarak sınıflandırılmaktadır. Preeklampside mevcut patoloji gebeliğin oluşum aşamasından itibaren vardır, ancak klinik bulgular (hipertansiyon ve proteinüri gibi) gebeliğin ilerleyen haftalarında ortaya çıkar. Erken doğum yaptırılmak zorunda kalınan preeklampsi olgularında, maternal mortalite 20 kat daha yüksektir(22). Preeklampsinin tanısının erken dönemde konulması ve erken tedaviye başlanması, hastalığın seyrini hafifletmekte, eklampsi görülme oranını azaltmakta ve sonuçta hem maternal hem de fetal morbidite ve mortalite riskini ciddi ölçüde azaltmaktadır. Rutin gebe takibinde preeklampsi için geçerli bir tarama testi bulunmamaktadır. Endotel disfonksiyonu ile ilişkili belirteçler son dönemde en çok araştırma yapılan konulardandır.

Preeklampsili hastanın tüm kliniği endotelial disfonksiyona yanıt olarak açıklanabilir(13,22,23) . Damar tonusunun kontrolünün bozulması hipertansiyona, damar geçirgenliğinin aşırı artması ödem ve proteinüriye, endotelde aşırı üretilen pıhtılaşma faktörleri pıhtılaşma bozukluklarına sebep olur. Beyin, karaciğer, böbrek ve plasenta gibi hedef organların damar endotelindeki disfonksiyon;

baş ağrısı, nöbetler, görsel semptomlar, epigastrik ağrı ve fetal büyüme gelişme geriliği gibi bulgulara sebep olur. Fetüse yeterli oksijen ve besin sağlanabilmesi için anne ve fetus arasında uygun bir damar ağı kurulması gereklidir. Uygun bir damar ağının kurulabilmesi için geniş bir damar oluşumu (anjioenez) ve bu yeni damar oluşumunda gerekli olan anjiogenetik faktörlerin dengesi şarttır. Plasentada proanjiojenik ve antianjiojenik faktörler ile bu denge sağlanır. Antianjiojenik faktörlerin artmış üretimi bu dengeyi bozar ve preeklampsinin sistemik endotelial disfonksiyonu ile sonuçlanır. Damar yapımını anjiogenik faktörler olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve plasental büyüme faktörü (PIGF) uyarırken, antianjiojenik faktörler olan çözünür fms benzeri tirozin kinaz-1 (sFlt-1) ve çözünür endoglin (sEng) ise inhibe eder. Bu denge preeklampside antianjiyogenez yönünde bozulmuştur. Endotel disfonksiyonu ile ilişkili belirteçlerin, hastalığın klinik belirtileri başlamadan önce hastalığı öngörebileceği gösterilmiştir(24).

18-25 nükleotid uzunluğunda kodlanmayan bir RNA grubu olan mikroRNA(miRNA)'lar, mRNA translasyonunu inhibe ederek veya mRNA degradasyonunu uyararak gen ifadesini düzenler. 1993'te keşfedilmesinin ardından, bu moleküllerin çok çeşitli biyolojik ve patolojik süreçlerde (metabolik-kardiyovasküler hastalıklar vs.) kritik düzenleyici rol oynadığı gösterilmiştir. Güncel çalışmalarda birçok genin regülasyonunda ve o gen ile ilişkili endotelial disfonksiyon , diyabet, ateroskleroz ve kanser gibi patolojik süreçlerde miRNA'ların belirgin rolü olduğu bildirilmiştir. MikroRNA'lar dokularda spesifik olarak eksprese edilir ve patolojik durumlarda değişimleri sebebiyle yeni biyobelirteç adaylarıdır. MiRNA'ların ve genetik hedeflerinin araştırılmasıyla, hastalık süreçlerindeki yer alan yollar keşfedilebileceği ve bu durumun da preeklampsideki yaklaşımları değiştirilebileceği düşünülmektedir.

MiRNA'ların birçok çalışmada gebelik komplikasyonlarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir, preeklampsi hastalarında, normal hastalarla karşılaştırıldığında plasentalardan miRNA salınım farklılıkları saptanmıştır(25). Placenta kaynaklı miRNA'ların anne serumundaki konsantrasyonlarındaki değişimin gebelik komplikasyonlarının saptanmasında bir belirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir(26).

Endotel disfonksiyonunda önemli rol oynayan miRNAlardan birisi de miR-200c'dir. Oksidatif stres miR-200c upregülasyonunu sağlar, upregüle olan miR-

200c ZEB1(zinc finger E-box binding homeobox-1) molekülünü inhibe ederek endotelial hücrelerin apoptozunu uyarır(27). Oksidatif stres ile artan miR-200c'nin, endotelde Sirtuin1 (SIRT1), endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve forkhead box (FOXO1) arasında mevcut olan otheregölasyon döngüsünü bozduğunu ve bunların tümünü hedefleyerek NO azalmasına ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmasına neden olduğu gösterilmiştir(28). Bu tez çalışmasında miR-200c'nin preeklampsisi için bir biyobelirteç olup olmadığı amaçlanmıştır.

Vasküler peroksidaz 1 (VPO1), hem içeren peroksidaz ailesinin yeni tanımlanmış bir üyesidir. Bu enzim insan vücudunda başlıca vasküler endotelial hücrelerde, kalp ve düz kas hücrelerinde eksprese edilir ve dolaşıma salınır(29). Fizyolojik koşullarda VPO1, güçlü bir oksidan olan hipokloröz asit (HOCl) üretimini katalize eder(30). Programlı endotel dokusu yıkımında VPO1 önemli bir rol oynamaktadır(31). VPO1 aracılı oksidatif stresin kardiyovasküler hastalıklarda (hipertansiyon, pulmoner arteriyel hipertansiyon, miyokardiyal iskemi gibi) kilit rol oynadığı birçok çalışmada gösterilmiştir(32–35). Preeklampsinin etyopatogenezinde suçlanan faktörlerden birisi de oksidatif strestir. Bu çalışmada preeklampsili gebelerdeki endotel disfonksiyonu ve oksidatif stres ile VPO1 arasındaki ilişkinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

Humanin (HN) , 2001 yılında keşfedilen, antiapoptotik, mitokondri kaynaklı 24 aminoasitli bir peptittir(36). Vasküler endotelde sentezlenen humanin, membran reseptörlerine bağlanarak antiapoptotik etkisini gösterir(37). Hücreyi oksidatif hasardan koruduğu ve apoptozisi inhibe ettiği gösterilmiştir(38,39). Çalışmalarda endotel fonksiyonu koruduğu, plak oluşumunu engellediği bildirilmiştir(40,41). Preeklampitik gebelerde sağlıklı gebelere göre serum humanin değerleri anlamlı olarak daha artmıştır ancak preeklampsisi alt grupları ayrı olarak incelenmemiştir(42).

MOTS-c, mitokondriyal DNA'da (mtDNA) kodlanan, 16 aminoasitlik, mitokondriyal kökenli bir peptittir. Asetilkolin aracılı vazodilatasyonu uyardığı, enflamasyon ile ilişkili genlerin ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir.Bu yüzden dolaşımdaki MOTS-c seviyesinin, endotelial fonksiyonla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Koroner hastalığı olanlarda plazma MOTS-c seviyeleri, kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur(43). MOTS-c ile ilgili değişimler preeklampsideki endotel disfonksiyonuna katkıda bulunuyor olabilir.

Çalışmamızın amacı, tedavi görmemiş erken ve geç preeklampitik hastalarda plazma VPO1, humanin ve MOTS-c düzeyleri ile miR-200c ekspresyonunu değerlendirmektir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gebelikle İlişkili Hipertansif Bozukluklar

Sağlıklı bir gebelikte ilk trimesterde sistolik ve diastolik kan basıncında hafif düşüş görülür. Kan basıncı son trimesterde ise yükselme eğilimindedir. Periferik vazodilatasyon ve plasenta dolaşımının anne dolaşımına eklenmesinden dolayı sistemik vasküler direnç azalmıştır(44). Kardiyak debisini artmasıyla kan basıncı dengelenir ve fetüsün oksijenasyonu kolaylaşır.

Gebe kadınlarda ortaya çıkan dört ana hipertansif bozukluk şunlardır(45):

- Kronik hipertansiyon
- Gestasyonel hipertansiyon
- Preeklampsi / eklampsi / HELLP sendromu
- Kronik hipertansiyona süperempoze preeklampsi

2.1.1. Kronik Hipertansiyon

Kronik hipertansiyon, gebelik öncesi veya gebeliğin 20. haftasından önce en az iki ölçümde sistolik arteriyel kan basıncı ölçümlerinin 140 mmHg ve üzerinde veya diastolik kan basıncı ölçümlerinin 90 mmHg ve üzerinde olmasıdır. İlk kez gebelikte yakalanan hipertansiyon, doğum sonrası 12 haftadan daha uzun süre devam ediyorsa bu durum da kronik hipertansiyon olarak tanımlanır. Primer veya sekonder hipertansiyon olabilir.

2.1.2. Gestasyonel Hipertansiyon

Gestasyonel hipertansiyon, preeklampsi veya kronik hipertansiyon kriterlerini karşılamayan hipertansif gebe kadınlar için geçici bir tanıdır. Gestasyonel hipertansiyon tanısı için gebede ilk defa gebeliğin 20. haftasından sonra hipertansiyon tespit edilmeli ve postpartum 12. haftadan sonra tansiyon normale dönmelidir. Hipertansiyona proteinüri veya preeklampsi ile ilişkili son organ

disfonksiyonu bulguları eşlik etmemelidir. Proteinürinin ortaya çıkması tanıyı preeklampsiye çevirir. Hipertansiyonun postpartum 12. haftadan sonra hala devam ediyor olması ise tanıyı kronik hipertansiyona çevirir. Bu yüzden kesin tanı postpartum 12.haftaya kadar konulamamaktadır.

2.1.3. Preeklampsi, Eklampsi ve HELLP Sendromu

Preeklampsi tanısı için, daha önceden normotansif olduğu bilinen bir gebede, gebeliğin 20.haftasından sonra yeni başlayan hipertansiyon tespit edilmesi gerekir. ACOG'un en güncel tanı kriterleri **Tablo 1**'de özetlenmiştir. Gestasyonel hipertansiyondan farklı olarak preeklampside hipertansiyona proteinüri ve/veya son organ hasarı bulguları eşlik etmelidir. Hipertansiyon tanısı için en az 4 saat aralıklarla yapılan iki ölçümde sistolik arter basıncının ≥ 140 mmHg veya diastolik arter basıncının ≥ 90 mmHg ölçülmesi gerekir(45,46). Proteinüri için 24 saatlik idrarda ≥ 0.3 g protein veya spot idrarda protein/kreatinin oranının ≥ 0.3 (mg/mg) olması gerekir. Eğer kantitatif protein ölçümü yapılamıyorsa dipstick $\geq 2+$ protein ölçümü de yeterlidir. Yeni klavuzlara göre preeklampside proteinürinin olması şart değildir(47). Hipertansiyon ile birlikte aşağıdaki son organ hasarı semptom veya bulgularından birinin olmasıyla da tanı konulabilir:

- Trombosit sayısı $<100,000/\text{microL}$
- Serum kreatinin >1.1 mg/dL (97.2 micromol/L) veya diğer böbrek hastalıklarının olmadığı durumlarda kreatinin konsantrasyonunun 2 katına çıkması
- Pulmoner ödem
- Karaciğer transaminaz enzim aktivetelerinin üst referans değerinin en az katına çıkılması
- Başka bir tanıyla açıklanamayan, normal dozda ağrı kesiciye yanıt vermeyen, yeni başlayan inatçı baş ağrısı
- Görsel semptomlar (Örneğin; bulanık görüş, skotoma gibi)

Tablo 1: Preeklampsia Tanı Kriterleri

Daha önce normotansif olduğu bilinen hastada, 20 haftalık gebelikten sonra en az 4 saat arayla en az 2 kez ölçümde (Sistolik kan basıncı ≥ 140 mmHg veya diastolik kan basıncı ≥ 90 mmHg) yeni başlangıçlı hipertansiyon ve aşağıdakilerden 1 veya daha fazlasının olması¹:
Proteinüri için 24 saatlik idrarda ≥ 0.3 g protein veya spot idrarda protein/kreatinin oranının ≥ 0.3 (mg/mg), eğer kantitatif protein ölçümü yapılamıyorsa dipstick $\geq +2$
Serum kreatinin >1.1 mg/dL (97.2 micromol/L) veya diğer böbrek hastalıklarının olmadığı durumlarda kreatinin konsantrasyonunun 2 katına çıkması
Karaciğer transaminaz enzim aktivetelerinin üst referans değerin en az 2 katına ulaşması
Trombosit sayısı $<100,000/\text{microL}$
Pulmoner ödem
Başka bir tanıyla açıklanamayan, normal dozda ağrı kesiciye yanıt vermeyen ² , yeni başlayan inatçı baş ağrısı
Görsel semptomlar (bulanık görüş, skotoma gibi)

((45) Numaralı kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.)

¹ Sistolik kan basıncı ≥ 160 mmHg veya diastolik kan basıncı ≥ 110 mmHg ise, birkaç dakika içinde onay yeterlidir.

² Ağrı kesiciye yanıt olması preeklampsia olasılığını dışlamaz.

Preeklampsili bir gebede başka bir nedenle açıklanamayan nöbet gelişirse tanı eklampsiiye çevrilir. Eklampsii jeneralize , tonik klonik konvülsiyonlar veya koma durumu görülebilir.

HELLP, gebe ve postpartum kadınlarda hemoliz, artmış karaciğer enzim aktivitesi ve düşük trombosit sayısını ifade eden bir kısaltmadır. Şiddetli preeklampsinin bir formu olduğu düşünülmektedir. Ancak HELLP sendromu olan kadınların yüzde 15-20'sinde hipertansiyon veya proteinüri görülmez, bu yüzden preeklampsiden ayrı bir hastalık olduğunu savunan görüşler de mevcuttur(47).

2.1.4. Kronik Hipertansiyona Süperempoze Preeklampsii

Gebelik öncesi hipertansiyon tanısı olan gebenin preeklampsii geliştirmesine denir. Yani mevcut olan hipertansiyona gebeliğin 20. haftasından sonra eklenen proteinüri ve/veya son organ fonksiyon bozukluğunun eklenmesiyle tanı konulur.

2.2.Preeklampsii

2.2.1. Preeklampsinin Epidemiyolojisi

Tüm gebeliklerin %5'inde preeklampsii gelişir(2). Preeklampsiiide oluşan komplikasyonlar nedeniyle anne ve fetus risk altındadır(3). Bu yüzden preeklampsii maternal, fetal ve neonatal mortalitenin başlıca nedenlerinden biridir(4). Gelişmiş ülkelerde maternal ölümlerin %16'sı hipertansif bozukluklardan kaynaklanmaktadır. Ülkemizde de anne ölümlerinin en önde gelen nedeni preeklampsiidir.

2.2.2. Preeklampsii Patogenezi

Preeklampsinin gelişmesine neden olan patofizyoloji; maternal, fetal ve plasental faktörleri içerir. Erken gebelik dönemindeki plasenta damarlanmasındaki anormallikler plasentada yetersiz perfüzyon , hipoksi ve iskemiye neden olur. Bu da antianjiojenik faktörlerin anne dolaşımına salınmasına; maternal endotel

disfonksiyonu, hipertansiyon ve hastalığın diğer belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olur. Ancak plasentanın anormal gelişimini başlatan olay ve sonraki basamaklar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Etyopatolojide birçok neden araştırılmıştır:

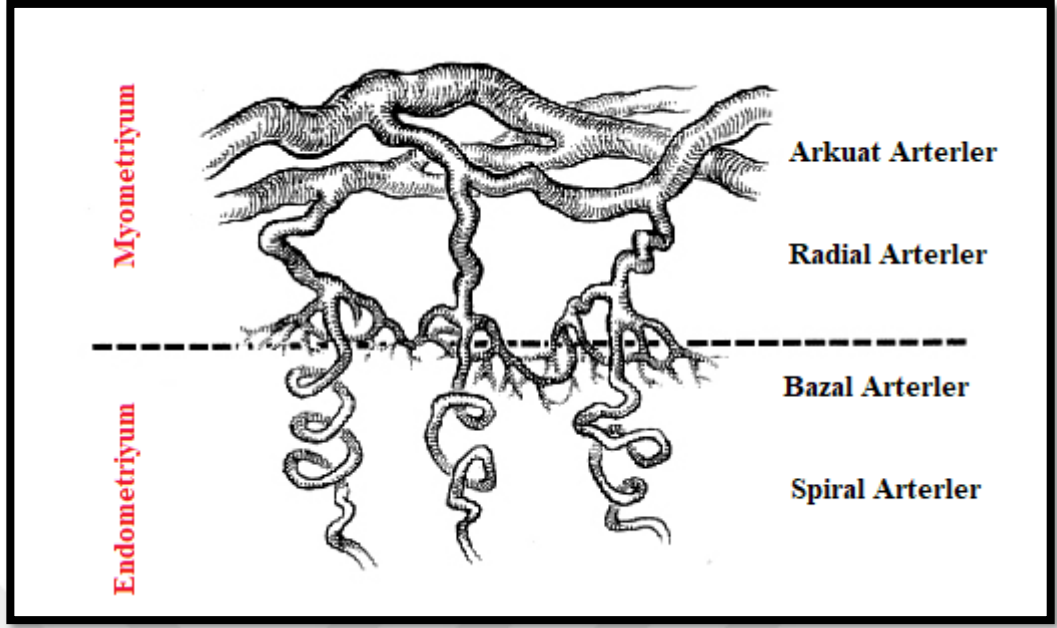
- Plasentanın Anormal gelişimi
- İmmunolojik faktörler
- Genetik yatkınlık
- Çevresel faktörler
- Enflamasyon
- Kompleman Aktivasyonu
- Endotel Disfonksiyonu

2.2.2.1. Plasentanın Anormal Gelişimi

Erken PE'nin gelişiminde plasentanın önemli rolü olduğunu gösteren birçok kanıt mevcuttur. Hastalık, fetüs olmasa da ortaya çıkabilir ancak plasenta olmadan olmaz(48). Ayrıca PE'nin kesin tedavisi doğumdur. Doğum ile plasenta devreden çıkar ve hasta genellikle bir hafta içinde iyileşir(49).

Normal gebe ve PE'li gebelerin plasenta dokuları histolojik olarak karşılaştırıldığında hastalığa sahip olan bireylerin dokularında trofoblast invazyonu ve spiral arter gelişiminin kusurlu olduğu bilinmektedir(50,51). Bu patolojiler kusurlu bir plasenta oluşumuna ve plasental iskemiye neden olur. Böylece plasental faktörler dolaşıma salınır, endotel fonksiyonlarını bozar ve hastalığın bulguları ortaya çıkar.

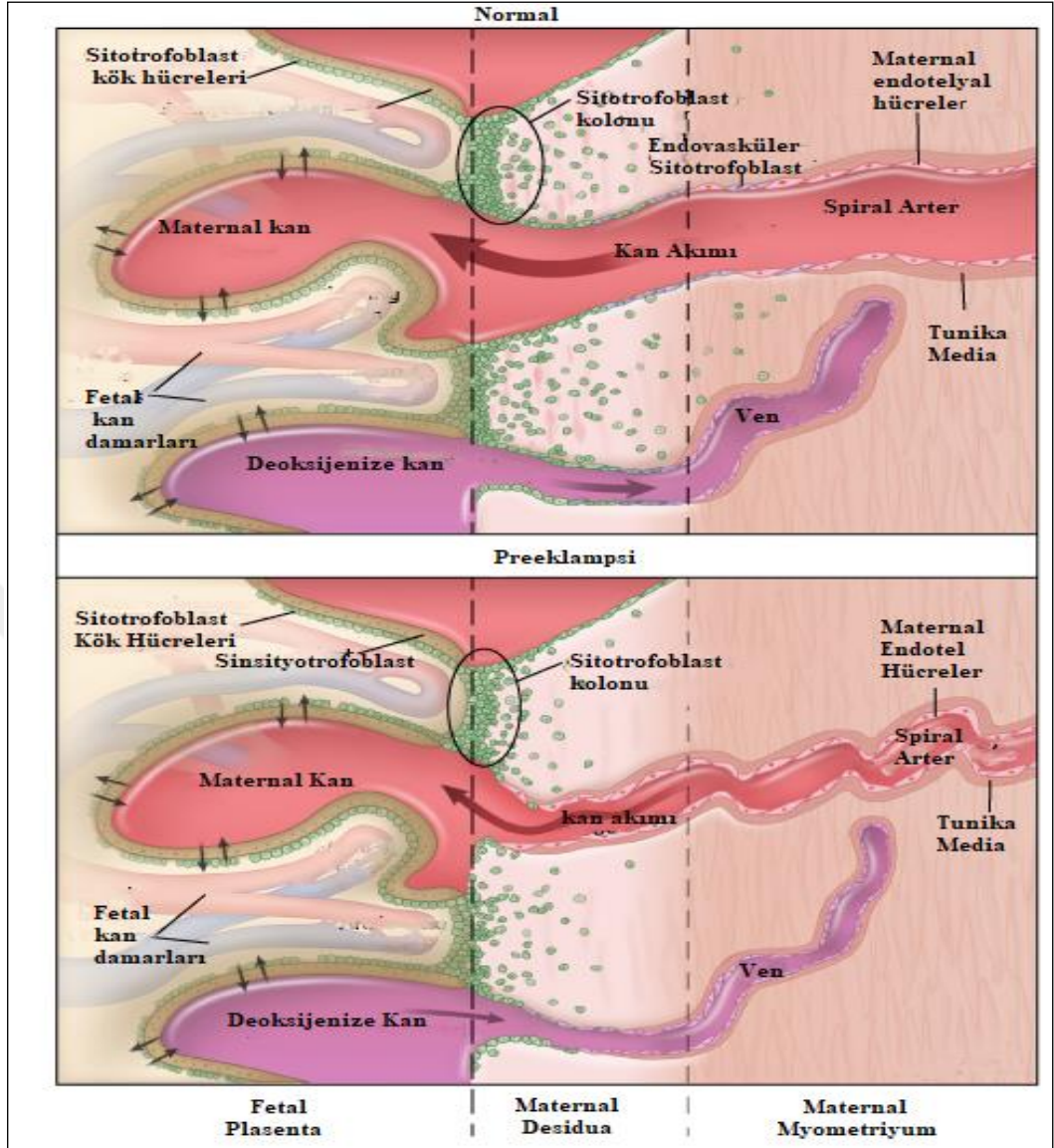
Anormal spiral arter gelişimi: Normal gebeliklerde, plasenta sitotrofoblast hücreleri, maternal spiral arterleri belirli bir seviyeye kadar istila ederler. Maternal spiral arterler, uterin arterin terminal dallarıdır. Fetüs ve plasentayı beslerler (**Şekil 1**).



Şekil 1: Myometriyal ve endometriyal arterler

((52) numaralı kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.)

Sağlıklı bir beslenme için sitotrofoblastlar, desidua'ya doğru göç etmeli, myometriyumun bir kısmını invaze etmeli, arterin ise hem tunica media tabakasını hem de endotelini invaze etmelidir. Böylece bu arterlerin dirençleri düşer ve kan akımı uterusun diğer kısımlarına göre çok daha kolay olur(53). Spiral arterlerin yeniden modellenmesi ilk trimesterin sonunda başlar ve gebeliğin 18 ila 20. haftasında biter, ancak bu arterlerin trofoblast invazyonunun durduğu kesin gebelik haftası tam olarak belli değildir. Preeklampsik gebelerde, sitotrofoblast hücrelerinin spiral arterlerin desiduasına nüfuz edebildikleri ancak myometriuma ulaşamadıkları gözlenmiştir(54). Maternal spiral arterler, kas-elastik duvarın fibrinoid malzeme ile değiştirilmesiyle oluşturulan büyük, geniş vasküler kanallara dönüşmez; bunun yerine, damarlar dar kalır ve plasental hipoperfüzyona neden olur (Şekil 2).



Şekil 2: Anormal Plasenta Gelişimi

((55) Numaralı kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.)

Plasentanın gelişimindeki bu kusur, birçok obstetrik patoloji (preeklampsi, intrauterin büyüme gelişme geriliği, 2. trimester fetüs ölümü, abrazyo plasenta, erken doğum) ile yakından ilişkilidir (56). Bazı gebeliklerde ise uteroplazental dolaşımın gelişimindeki doğal basamakların neden ortaya çıkmadığı bilinmemektedir. Hastalığın etyopatolojisinin multifaktöriyel olduğu; vasküler, çevresel, immünolojik ve genetik faktörlerin hepsinin birden rol oynadığı düşünülmektedir(57).

Hatalı trofoblast farklılaşması: Trofoblastların farklılaşması sırasında meydana gelen herhangi bir kusur, spiral arterleri doğru bir şekilde istila edememelerini açıklayan sebeplerden biri olabilir(6).

Normal bir gebelikte trofoblastlar farklılaşırken; adezyon molekülleri, sitokinler, hücre dışı matriks molekülleri, metalloproteinazlar ve sınıf IB MHC kompleksi molekülü HLA-G gibi bir çok farklı molekülün ekspresyonunu sürekli olarak değiştirirler(58). Psödo-vaskülogenez olarak adlandırılan bu aşamada; epitel hücrelerinin (integrin $\alpha 6/\beta 1$, $\alpha V/\beta 5$ ve E-kadherin) ve endotel hücrelerinin (integrin $\alpha 1/\beta 1$, $\alpha V/\beta 3$ ve VE-Kadherin) ekspresyonları düzenlenir(59). Preeklampitik gebelerin trofoblastlarında, bu ekspresyon düzenlemeleri tam olarak gerçekleşemez.

Plasental hipoperfüzyon, hipoksi, iskemi : Plasentanın perfüzyonu, sağlıklı bir plasenta gelişimi için son derece önemlidir. Preeklampsinin ortaya çıkmasında anormal plasenta gelişimi ve hipoperfüzyonun rol oynayabileceğini gösteren birçok görüş vardır. Bazı hayvan çalışmalarında PE modeli oluşturulmuş ve bu modellerde uteroplazental perfüzyonun zayıfladığı gözlemlenmiştir. Preeklampsi riski, vasküler yetmezlik ile ilişkili hastalıklara sahip bireylerde artmıştır(60). Plasenta kan akımının sabit kaldığı ancak plasenta kütlesinin arttığı hastalıklar (DM, çoğul gebelikler vs.) göreceli olarak iskemiye neden olur ve bu hastalıklar PE ile ilişkilidir (60,61). Preeklampsi, 3100 metreden yüksek rakımlarda yaşayan gebelerde daha sık görülür(62).

Hipoperfüzyon PE'nin bir sebebi olduğu gibi aynı zamanda anormal plasental gelişiminin de bir sonucudur. Gebelik ilerledikçe daha da belirginleşir. Çünkü yetersiz uteroplazental kan akımı, büyüyen fetus ve plasentanın artan ihtiyacına ayak uyduramaz(63). Gebeliğin ilerleyen haftalarında plasentada iskemi ile uyumlu histopatolojik değişiklikler görülür. Bunlardan bazıları ateroskleroz, fibrinoid nekroz, trombozlar, arteriollerin sklerotik daralması ve plasental infarktlardır(63,64). Bu histopatolojik değişiklikler, preeklampsili bireylerde eşit olarak bulunmaz ancak hastalığın erken başlangıcı ve şiddeti ile bu lezyonların ölçüsü arasında bir bağlantı olduğu bildirilmiştir(65,66).

Hipoperfüzyon, hipoksi ve iskemi, PE'nin etyopatogenezinde önemli bileşenlerdir. Çünkü iyi beslenemeyen plasenta, maternal kan dolaşımına bazı faktörleri salar. Bu moleküller, maternal endotel hücre fonksiyonunu etkileyip PE'de görülen sistemik belirti ve semptomlara neden olur(16,67).

Desidua patolojisi: Bazı araştırmalarda, hastaların bir kısmında desidua gelişiminin yetersiz olduğu ve bu durumun da sitotrofoblast invazyonunu azaltabileceği gösterilmiştir(68). Mikroarray çalışmaları ile PE'li bireylerin koryon villus örnekleri incelenmiş, yetersiz desidua gelişimi görüşü desteklenmemiştir(69). PE'li gebelerin desidua hücreleri sFlt-1'i çok fazla üretir. Yani antianjiyojenik faktörlerin yeterince baskılanamaması yetersiz implantasyona sebep olabilir(70).

2.2.2.2. İmmunolojik Faktörler

PE'nin altta yatan sebebinin immünolojik faktörler ile ilişkili olabileceğini savunan çeşitli araştırmalar mevcuttur. Fetal ve paternal antijenlere önceden maruz kalmanın preeklampsiye karşı koruyucu olduğunun gözlemlenmesi bu görüşü destekler(18,19,21,71–74). Paternal antijenlere daha az maruz kalan gebeler (nullipar, bariyer kontrasepsiyonu kullanan, yardımcı üreme teknikleriyle gebe kalan, iki gebeliği arasında uzun süre olan, bir önceki gebeliğinden sonra partner değiştiren) PE için daha yüksek risk taşır. Ayrıca oosit bağışı ile gebe kalan kadınlar doğal yolla gebe kalanlara göre 4 kat, diğer yardımcı üreme teknikleriyle gebe kalanlara göre 2 kat PE riski taşırlar. Bu da fetüs ve anne arasındaki immünolojik intoleransın hastalığın altyapısında görev alabileceği görüşünü destekler (75,76).

PE'li gebelerde, organ transplantasyonu reddi olan bireylerle benzer immünolojik süreçler gözlenmesi de bu görüşü destekler niteliktedir(77). Ekstravillous trofoblast (EVT) hücrelerinde eksprese edilen antijenler HLA-C, HLA-E ve HLA-G'dir. Bu antijenleri tanıyabilen NK (Natural killer) hücreleri, dengeli bir implantasyon gereklidir. Bu dengenin EVT hücrelerinden NK hücrelerine kayması anormal plasenta oluşumunda rol oynuyor olabilir(78) . Dendritik hücreler, T hücrelerinin antijene özgü yanıtının başlamasında görev alırlar. PE'li gebelerin plasenta biyopsilerinde desidual infiltrasyonun normale göre daha fazla

olduğu bildirilmiştir. Bu durumun da fetal antijenlerin sunumunu değiştirerek anne bağışıklık sistemi cevabının aşırı olmasına neden olabileceği düşünülmüştür (79).

PE’li gebelerde anjiyotensin reseptörüne (AT-1R) karşı antikor oluştuğu tespit edilmiştir. AT-1R antikoru hücre içi kalsiyum düzeylerini değiştirerek plazminojen aktivatör inhibitörü-1 seviyelerini arttırıp, anormal trofoblast invazyonuna sebep olabileceği bildirilmiştir (80–83).

Anne NK hücreleri ve fetüs HLA-C polimorfizmlerinin incelendiği genetik çalışmalarda, KIR-AA genotipi ve fetal HLA-C2 genotipine sahip olan gebelerin PE riskinin anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir(84).Ancak tüm bunlara rağmen immunolijik teori için yeteri kadar kanıt yoktur. Bir veya daha fazla HLA alelinin PE patogeneğinde rol oynadığına dair bir bulgunun olmadığını söyleyen sistematik derlemeler de vardır(79).

2.2.2.3. Genetik Faktörler

Preeklampsi vakalarının büyük bir kısmı sporadik olmasına rağmen, genetik yatkınlığın hastalıkta rol oynadığı düşünülmektedir(85–91).

Önceki gebeliğinde PE geçiren gebelerin tekrar PE geçirme riski normale göre 7 kattan fazladır(92). PE ile geçirilen bir gebelik sonrası doğan erkek bireyin gelecekteki eşi daha yüksek PE riski taşır(86). Eşinin eski eşi, PE olan kadınlar, eşinin eski eşi normotansif olan kadınlara göre daha yüksek risk taşırlar.

SFlt-1 ve Flt1 için genleri kromozom 13 üzerindedir. Trizomi 13’lü fetüsler diğer fetüslere göre bu genin ürünlerini daha fazla üretirler. Fetüsün Trizomi 13 olduğu gebeliklerde PE riski bariz bir şekilde yükselmiştir(92). Genomik çalışmalarda, fetüs genomundaki FLT1 lokusunun yanındaki kromozom 13'teki değişimlerin hastalığın ortaya çıkmasına neden olabileceği bildirilmiştir (92).

Ailesinde preeklampsi geçmişi olan primigravid gebeler, geçmişi olmayan primigravid gebelere göre beş kat PE olma riskine sahiptirler(85,86). PE’li kardeşlerde yapılan bir araştırmada, sadece 10q22'de mutasyonu olan kızkardeşlerde hastalığın gerçekleştiği görülmüştür.

PAI-1 4G/5G polimorfizmi, anjiyotensinojen gen varyantı, eNOS geni, 2p13 lokusu ile PE riski arasında ilişki bulunduğunu gösteren genetik çalışmalar mevcuttur (9,90).

Ancak tüm bunlara rağmen ikizlerde yapılan büyük bir çalışmada hastalık ile ilgili genetik bir bağlantı bulunamamıştır. Hem anne hem de baba genlerinin anormal plasenta geliştiren fetal genlere katkıda bulunabileceği düşünülmüştür(93). Bu gebelerde dolaşımdaki sFlt-1/Plgf oranı artar (94).

2.2.2.4. Çevresel Faktörler

Araştırmalarda pekçok farklı beslenme ve yaşam tarzı alışkanlıklarının PE ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. VKİ arttıkça PE riski de artar. VKİ ≥ 40 kg/m² olan gebelerde 6 kat, 25 ila 30 kg/m² olan gebelerde 1.65 kat PE riski mevcuttur. Obezitenin kronik enflamasyon ve endotelial disfonksiyonu arttırarak, PE olma ihtimalini kolaylaştırdığı düşünülmektedir(95). Bazı epidemiyolojik çalışmalar düşük kalsiyum alımının PE riskini arttırdığını, PE riski yüksek gebelerin kalsiyum takviyesi alması gerektiğini savunmuştur. Kalsiyumun hormonal, vasküler ve bağışıklık sisteminde düzenleyici rol oynadığı bilinse de PE ile arasındaki ilişkiyi tam olarak açıklayacak kapsamlı bir çalışma yoktur.

2.2.2.5. Enflamasyon

PE’de normal gebeliğe göre enflamasyon daha fazladır. Anne sistematik dolaşımına geçen plasental DNA’lar ve trofoblast artıklarının enflamasyona neden olabileceği düşünülmüştür(96–98). Ayrıca plasentanın hipoperfüzyonu daha çok plasenta hücresinin ölümüne bu da daha çok plasenta DNA’sının anne dolaşımına geçmesine sebep olur. Gebeliğin 20. Haftasından önce kanda trofoblast DNA’sı yüksek seviyelerde olan gebelerin PE riski anlamlı olarak yüksektir(99). Bu kişilerde aynı zamanda DNA seviyelerine paralel olarak sFlt-1’in de yüksek olduğu sonraki çalışmalarda gösterilmiştir(100,101). Sistematik enflamatuvar cevabı arttıran maternal enfeksiyon (üriner sistem enfeksiyonları, periodontal enfeksiyonlar gibi) geçiren kadınlarda PE riski anlamlı olarak yükselmiştir.

2.2.2.6. Anjiyotensin II'ye aşırı duyarlılık

PE'de anjiyotensin II'ye karşı olan duyarlılığın arttığı saptanmıştır. Bunun bradikinin (B2) reseptör upregülasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür(102). Ayrıca yapılan hayvan çalışmalarında amlodipin ile PE modeli denekler tedavi edilmiş ve amlodipinin AT1/B2 downregülasyonu yaparak PE'yi önlediği düşünülmüştür(103,104).

PE'li hastalar anjiyotensin AT-1 reseptörüne karşı antikor düzeylerinde artışa sahiptir. Anjiyotensin II, AT-1 reseptörü için endojen ligandır, bu yüzden bu reseptörün otoantikorlarla aktivasyonunun artması, PE'de görülen hipertansiyon ve vasküler hasarı tetikleyebilir. Hayvan çalışmaları bu hipotezi desteklemektedir(105,106).

2.2.2.7. Kompleman aktivasyonu

Preeklampsi, otoimmün hastalıklar; özellikle SLE ve AFAS olan gebelerde daha sık görülür (107,108). Bu hastaların plasentasında klasik ve alternatif kompleman yolunun aktivasyonunu gösteren bulgular mevcuttur(109–112). Komplemanları düzenleyen proteinlerdeki mutasyonlar, preeklampsiye yatkınlık yaratabilir(113). Yapılan çalışmalar kompleman düzensizliğinin veya aktivasyonunun preeklampsi patogenezinde rol oynayabileceğini göstermektedir ancak ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

2.2.2.8. Endotel disfonksiyonu

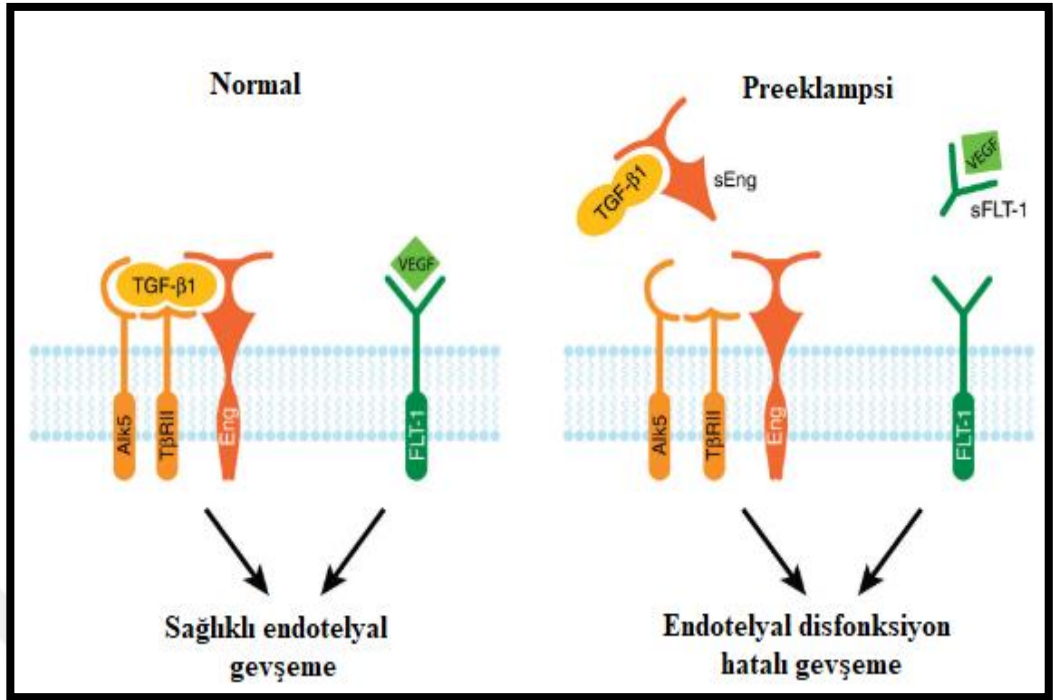
PE'de görülen tüm klinik semptomlar, sistematik endotelial disfonksiyona verilen klinik cevap olarak açıklanabilir (13,23) İşlevini tam olarak göremeyen endotel vasküler tonusu kontrol edemez ve bu da hipertansiyon ile sonuçlanır. Vasküler geçirgenliğin artması ödem ve proteinüriye yol açar. Endotelin prokoagülanları eksprese etmesindeki düzensizlikler de koagülopatiyi açıklayabilir. Beyin, karaciğer, böbrek ve plasenta gibi hedef organlarda endotel fonksiyon kaybıyla baş ağrısı, nöbetler, görsel semptomlar, epigastrik ağrı ve fetal büyüme kısıtlaması görülür.

Endotel disfonksiyonu gösteren klinik kanıtlar olduğu gibi birçok laboratuvar bulgusu da vardır:

Endotelden üretilen vazodilatörler (NO, prostasiklin) azalırken, vazokonstriktörler (endotelin ve tromboksan) artmıştır. Dolaşımda fibronektin, Faktör VIII ve trombomodulin konsantrasyonları yükseldiği tespit edilmiştir(114–116). Preeklampitik kadınlardan elde edilen serum, insan umbilikal ven endotel hücre kültürlerinde endotel aktivasyonuna neden olur (117).

sFlt-1, VEGF, PlGF:Plasenta oluşumu sırasında fetüse yeterli oksijen ve besin sağlayacak bir vasküler ağ oluşturabilmek için iyi bir anjiogenez gereklidir. Anjiogenez dengesi proanjiyojenik (VEGF, PlGF) ve antianjiyojenik faktörler (sFlt-1,sEng) ile sağlanır. Bu dengenin antianjiyojenik faktörler lehine kayması PE'nin sistematik endotel disfonksiyonuna neden olur.

sFlt-1, VEGF'nin dolaşımdaki bir antagonistidir(**Şekil 3**). VEGF, endotelden salınarak anjiogenezi uyaran bir faktördür(118,119). Aktivitesini ilk önce vasküler endotel hücre yüzeyinde eksprese edilen iki reseptör tirozin kinaz; VEGFR-1 ve VEGFR-2 ile etkileşerek gösterir. VEGFR-1'in transmembranöz ve çözünür (sFlt-1 veya sVEGFR-1) olmak üzere iki izoformu vardır. Plasental büyüme faktörü (PlGF), ağırlıklı olarak plasentada yapılan VEGF ailesinin bir başka üyesidir. Ayrıca VEGFR-1 reseptörüne bağlanır.

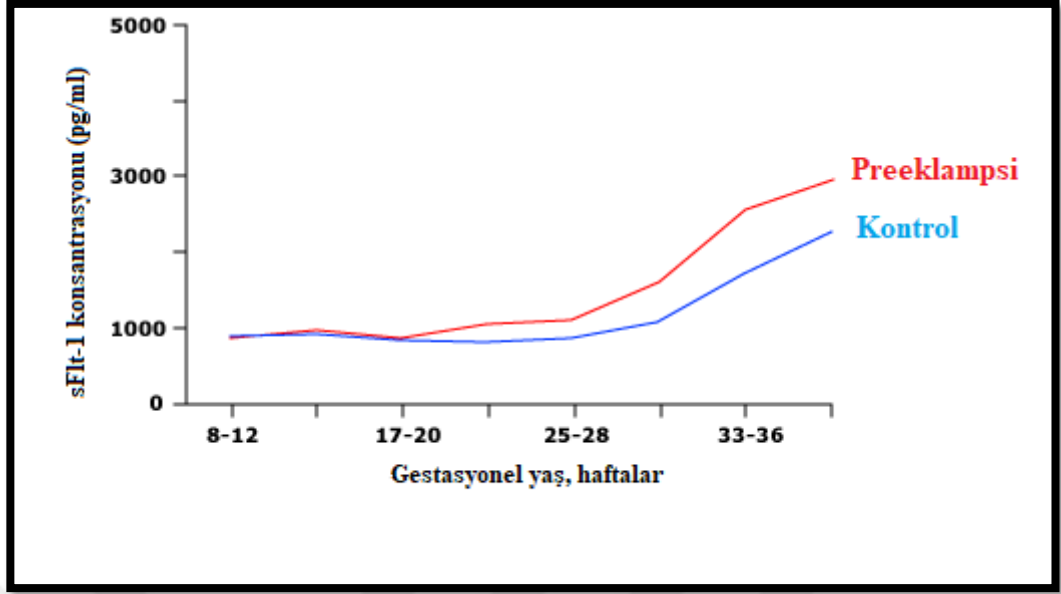


Şekil 3: sFlt-1, VEGF ve sEng

((120)Numaralı kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.)

sFlt-1, dolaşımdaki VEGF ve PlGF'e bağlanır ve endojen reseptörleri ile etkileşimlerini önler. Böylece anjiyojenik aktivitelerini antagonize eder. Yapılan birçok çalışma artan sFlt-1 sekresyonunun PE patogenezinde kritik bir rol oynadığını göstermiştir(121–128).

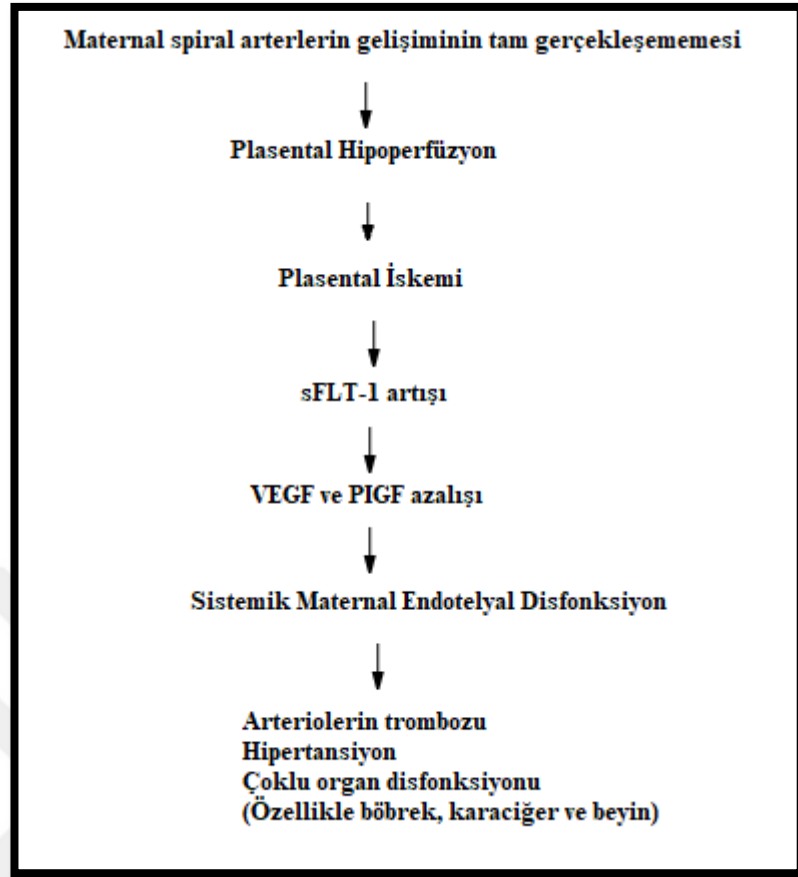
sFlt-1, gebe hayvanlara uygulandığında proteinüri ve hipertansiyon oluşmuştur. Hücre kültürüyle yapılan çalışmalarda VEGF ve PlGF uygulanmasının bulguları azalttığı ve buna paralel olarak da daha düşük sFlt-1 düzeylerinde hastalığın gerilediği görülmüştür(129–134).



Şekil 4: Haftalara göre sFlt-1 konsantrasyonları

((123) Nolu kaynaktan düzenlenerek, Türkçeleştirilmiştir.)

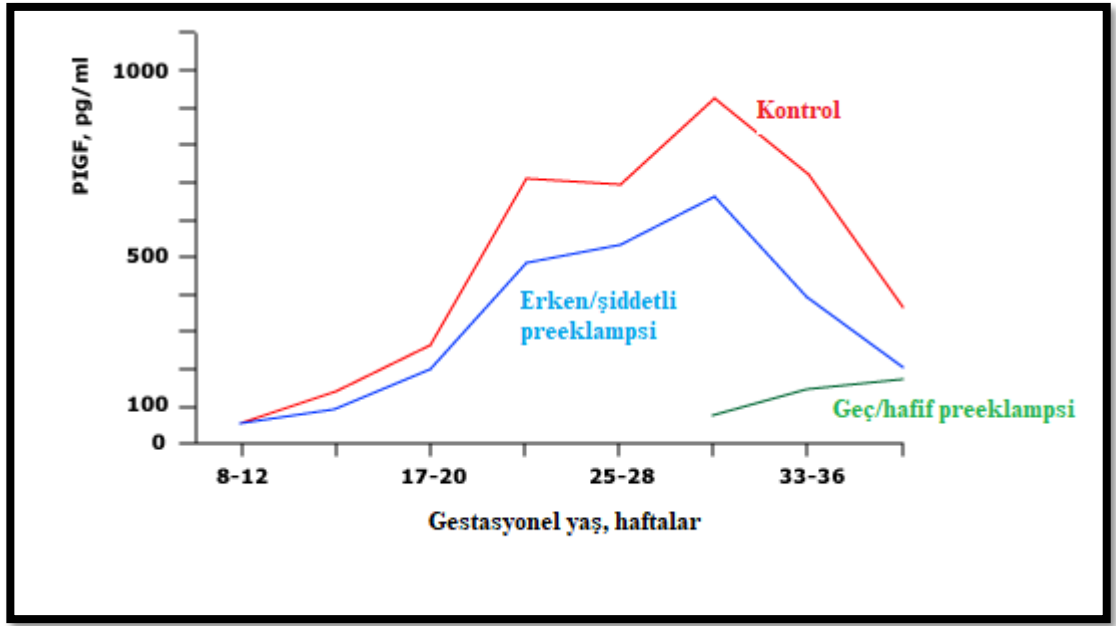
sFlt-1 düzeyleri, tüm hamileliklerde artar; ancak preeklampsili gebelerde normotansif gebelere göre, bu artış daha erken başlar ve daha yüksek konsantrasyonlara ulaşır. PE'li gebelerde bu artış 21 ile 24 hafta arasında olurken normotansif gebelerde 33 ile 36 hafta arasında gerçekleşir(**Şekil 4**). İki grup arasındaki serum sFlt-1 konsantrasyonunda anlamlı bir fark, klinik hastalığın başlamasından beş hafta önce belirginleşir. PlGF ve VEGF seviyeleri de sFlt-1'deki artışla eşzamanlı olarak düşer(**Şekil 6**) (123). sFlt-1 konsantrasyonu hastalık şiddeti ile de korelidir. Dolaşım konsantrasyonları şiddetli veya erken (<34 hafta) PE olan gebelerde hafif veya geç PE olanlara göre daha yüksektir(128). sFlt-1 ve PlGF'deki düzeylerindeki değişiklikler, PE'nin maternal ve neonatal komplikasyonları ile de ilişkilidir(135,136).Tüm bunlar sFlt-1 artışının, PE patogenezinde merkezi bir rol oynadığını gösterse de bu artışı neyin tetiklediği henüz bilinmemektedir(**Şekil 5**) (137). Plasental iskemi en olası adaydır(137).



Şekil 5: sFIt-1 artışı ve preeklampsi

((138) numaralı kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.)

Plasental sitotrofoblastlar, oksijen mevcudiyeti azaldığında sFIt-1 üretimini arttırırlar (139). PE’li gebelerin plasentalarında hipoksi ile indüklenebilen transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunun artması bu hipotezi destekler niteliktedir(139). Yükselmiş sFIt-1 düzeylerinin PE’nin erken plasental gelişimsel anormalliklerinden mi yoksa başka bir faktörün neden olduğu plasental iskemiye ikincil bir yanıtta mı kaynaklandığı bilinmemektedir. Ayrıca genetik faktörler de plasental boyut ve sFIt-1’in aşırı üretiminde rol oynayabilirler(140).



Şekil 6: Haftalara Göre PIGF konsantrasyonları

((123) Nolu kaynaktan düzenlenerek Türkçeleştirilmiştir.)

Hayvan çalışmaları, sFlt-1'in vasküler oksidatif strese ve anjiyotensin II'ye karşı olan duyarlılığı arttırdığını göstermiştir. Bu bilgiler, anormal antianjiyojenik durum ile gelişen endotel disfonksiyonunun, vazopressör duyarlılığına ve hipertansiyona yol açan birincil olay olabileceğini göstermektedir (141).

Serumdaki sFlt-1:PIGF oranının ölçülmesi, preeklampsi şüphesi olan gebelerde hastalığı dışlamak için yararlı bir testtir(24). Yüksek plazma sFlt-1: PIGF, şiddetli preeklampsi nedeniyle iki hafta içinde doğum yapma riski taşıyan kadınları da belirleyebilir(142). Gelecekte, sFlt-1 seviyelerini düşüren veya PIGF seviyelerini yükselten aferez veya ilaçlar preeklampsiyi önlemek veya tedavi etmek için yararlı olabilir(143–146).Düşük doz aspirin tedavisi, ilk trimesterde ölçülen düşük PIGF seviyeleri olan bireylerde oldukça etkili olduğu görülmüştür (147). Hücre kültürü çalışmalarında, aspirinin sFlt-1 üretimini inhibe edebileceğini ve PE'li plasentalarda anjiyojenik dengeyi düzenleyebileceğini göstermiştir (148).

Normal trofoblast farklılaşması ve invazyonu için fVEGF , fPLGF ve VEGFR-1 (Flt-1) düzeylerinin yeterli seviyelerde olması gereklidir. Bozulmuş trofoblast

dönüşümünün sebebi olarak anjiyojenik faktörlerin yetersiz konsantrasyonlarda sentezlenmesi, preeklampsi patogeneğinde düşünülen hipotezlerden biridir. VEGF, anjiyogenez ve sitotrofoblast istilası ile ilişkili olan $\alpha\beta 3$ integrinin endotel hücre ekspresyonunu uyarır. Ayrıca, sitotrofoblastlar, fms benzeri tirozin kinaz 1 (Flt1) reseptörü (VEGF reseptörü-1 olarak da bilinir) dahil olmak üzere VEGF reseptörlerine sahiptirler. İnvaziv sitotrofoblastlarda döllenmeden 6 hafta sonra, yüksek Flt1 seviyeleri bulunduğundan, reseptörün VEGF ve PlGF ile etkileşimin invazyon ve psödo-vaskülogenez için çok önemli olduğu düşünülmektedir. Preeklampitik plasentalarda VEGF mRNA seviyeleri düşüktür. Bu da VEGF'nin bozulmuş plasantasyonda rol aldığı hipotezini destekler. İmmunohistokimyasal olarak sitotrofoblastlarda VEGF ve Flt1 , preeklampside normal gebeliğe göre azdır. Gebeliğin sonraki aşamalarında insan plasentasında üretilen Flt1'in çoğu, alternatif splicing/ekleme ile üretilen çözünür bir formdur (sFlt-1) sFlt-1, Flt1'in transmembran ve sitoplazmik domainlerinden yoksundur ve büyük oranlarda kana salınır. Preeklampitik plasentalardan izole edilen sitotrofoblastlar, normal plasentalardan daha fazla sFlt1 salar ve preeklampitik plasentalarda sFlt-1 mRNA'nın upregülasyonu tespit edilmiştir. Bu nedenle, aşırı sFlt-1 üretimi, VEGF'nin sitotrofoblast hücrelerinde Flt1 reseptörlerine bağlanmasını önleyerek, plasental trofoblastlarda kusurlu sitotrofoblast farklılaşmasından ve preeklampsinin anormal plasantasyonundan sorumlu olabilir(156).

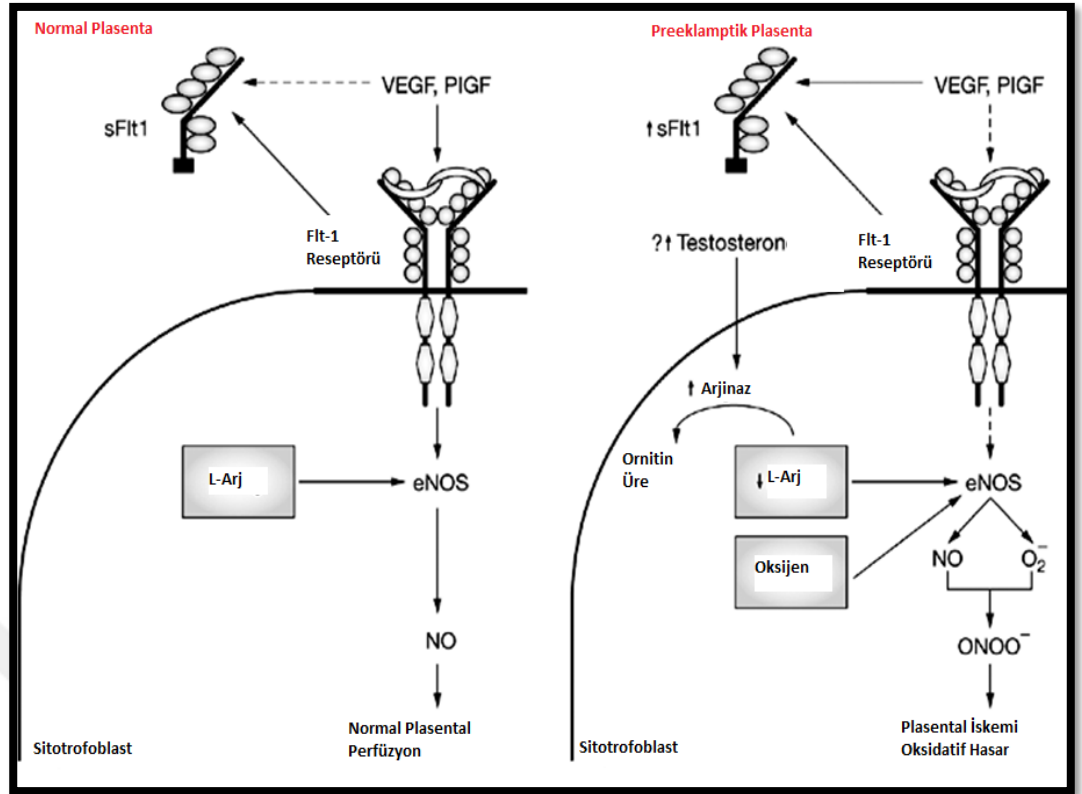
VEGF-Flt1 etkileşimi, NOS enziminin arjininden NO sentezlemesini indükler. İnsan plasentasında indüklenebilir veya nöronal NOS bulunmaz, ancak endotelial NOS göbek kordonunun endotelinde, koryonik plakada ve villöz sitotrofoblastlarda bulunur. Bazı çalışmalarda ekstravillöz trofoblast hücrelerinde yüksek miktarda eNOS ekspresyonu tanımlanmıştır. NO, trofoblastlarda embriyo implantasyonu sırasında istila için gerekli olan MMP2 (matriks metalloproteinaz) ve MMP9 proteazların ekspresyonunu ve aktivitesini düzenler. MMP2 ayrıca hamilelik sırasında regüle edilen relaksin-jelatinaz yollarında önemli bir rol oynar ve endotelial endotelin B reseptörü-NO yollarının aktivasyonu yoluyla küçük arterlerin miyojenik reaktivitesinin azalmasına katkıda bulunur. NO salınımının anjiyopöietin kaynaklı büyüme ve ekstravillöz trofoblast hücrelerinin göçüne aracılık ettiği gösterilmiştir. NO, Flt1 sinyalleme üzerinden sitotrofoblast istilası

ve VEGF ile indüklenen motilite ile ilişkilidir. Ek olarak, plasental gelişim için gerekli tüm süreçlerde endovasküler trofoblastlarda VE-Kadherin'in VEGF kaynaklı upregülasyonuna aracılık eder. Vazodilatatör ve anjiyojenik/vaskülojenik özellikleri sayesinde, lokal olarak üretilen NO, normal plasantasyon sırasında sitotrofoblastların endovasküler invazyonunun teşvik edilmesinde etkili görünmektedir. Bu nedenle, preeklampsideki plasental değişiklikler ile sitotrofoblast hücrelerinin NO oluşturma kapasitesi azalmış olabilir. Preeklampitik NO aktivitesinde azalma plasentadaki NO'İ oluşturan enzimdeki bir kusurun sonucu olmadığı, çünkü preeklampitik kadınların plasentalarında eNOS seviyelerinin normal olduğu ve normal miktarlarda NO oluşturduğu çalışılmıştır. Bunun yerine, NO'nun azalmış aktivitesi, yarı ömrünün azalması veya biyoyararlılığının azalmasının mekanizmada etkili olabileceği ihtimali üzerinde durulmaktadır. Normal gebeliğe kıyasla plasental dolaşımında daha düşük sıklık GMP konsantrasyonlarına (hücre içi ikinci haberci) dönüşür. Azalmış NO aktivitesi hipotezi, trofoblastların fetal kan damarlarında gözlenen nitrotirozinin yoğun immunhistokimyasal boyanması ile desteklenir. Preeklampitik plasentada NO'nun, anjiyojenik özelliklerden yoksun güçlü bir sitotoksik anyon olan peroksinitrite (ONOO-) hızla parçalanması söz konusu olabilir. Çalışmalar, NO'nun normal plasentaya kıyasla preeklampitik plasentada bol miktarda bulunan süperoksit anyonu (O_2^-) dahil olmak üzere reaktif oksijen türleri (ROS) ile etkileşime girdiğini göstermektedir(156).

Preeklampside aşırı ROS üretiminin sebeplerinden biri de NOS'un NO sentezine ek olarak, süperoksit anyonunun (O_2^-) üretimini kolaylaştırmasıdır. Normalde NO ve O_2^- 'in oranları, hücre içi l-arjinin seviyeleri ile sıkı bir şekilde düzenlenir. Yeterli arjinin varlığında, hücrelerde eNOS sadece NO üretir. Arjininin azalması, NO üretiminin yanında O_2^- üretimine ve daha sonra da ONOO-oluşumuna yol açtığı gözlemlenmiştir. Arjinin azalması sonucu eNOS yolağında ortaya çıkan bu sapmanın preeklampsi patogenezinde katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Arjinin azalmasının sebeplerinden biri Arjinaz II enziminin aktivitesinin aşırı artması olabilir. Arjinaz II enzimi, l-arjinin'i ornitin ve üreye hidrolize eden enzimdir. Preeklampitik dokuda arjinin seviyeleri düşük, Arjinaz II enziminin ekspresyonunun artmış olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu veriler de

eNOS'daki sapmanın preeklampside ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir. Preeklampside Arjinaz II enziminin ekspresyonunun artma sebebi tam olarak bilinmemektedir. Gebelikte yüksek seyreden testesteron seviyelerinin potansiyel olarak rol oynadığı düşünülmektedir. Preeklampsi riski taşıyan gebelere uzun süreli l-arjinin takviyesi ile uterin arter direncinin azalması, komplikasyonları azalttığı belirtilmiştir. Ayrıca yapılan bir hayvan çalışmasında l-arjinin antagonisti nitro-l-Arg-metil-esterin uygulanması, sürekli hipertansiyon, proteinüri ve intrauterin büyüme geriliği ile karakterize preeklampsi benzeri bir sendroma neden olduğu, oksidatif stresin belirteçlerinin seviyelerini kan ve dokularda arttırdığı gözlemlenmiştir(160). Bu çalışmalar l-arjinin eksikliği ile preeklampsideki oksidatif stres arasındaki bağlantıyı destekler. Antioksidan tedavinin plazma peroksidasyon ürünlerinin seviyelerini normalleştirdiği ve proteinüri ve fetüs ölüm oranlarını azalttığı görülmüştür(156).

NO aracılı vazodilatasyondaki bir kusur fetoplasental damarların vazokonstriksiyonuna ve preeklampsi kliniğine neden olabilir. Anormal sitotrofoblast farklılaşması ile gelişen plasental hipoperfüzyon ve iskemi maternal sendromla sonuçlanabilir. Plasental hipoperfüzyon ve aralıklı perfüzyon, oksidatif hasarı arttıran bir hipoksi-reoksijenasyon sürecini başlatır. Hipoksi, ROS üreten bir enzim olan ksantin oksidazın (XO) aktivitesini artırır. Preeklampsik kadınların invaziv sitotrofoblastlarında XO ekspresyonu ve XO aktivitesi artmıştır. Bunlarla birlikte artan ONOO- üretimi , plasentadan maternal dolaşıma ROS salınmasına neden olur. Sonuç olarak ROS, sonunda sistemik maternal endotel disfonksiyonuna katkıda bulunur(156).



Şekil 7: Preeklampsisi Yolakları

Preeklampside L-Arjininin azalması plasental hipoperfüzyonu ve mikrovasküler hasarı teşvik eder. Vasküler endotel büyüme faktörü ve plasental büyüme faktörünün sitotrofoblastlar üzerindeki FMS benzeri tirozin kinaz 1 reseptörüne bağlanması, eNOS sentaz ile NO üretimini uyarır. Vasküler endotel büyüme faktörü ve plasental büyüme faktörünün FMS benzeri tirozin kinaz 1 reseptörü ile etkileşimi, çözünür FMS benzeri tirozin kinaz 1 tarafından inhibe edilir. Yeterli L-arjinin ile normal plasenta, eNOS ile yeterli NO üretimini sürdürür. Buna karşılık, preeklampside, artan çözünür FMS benzeri tirozin kinaz 1 seviyeleri, Fms benzeri tirozin kinaz 1 reseptörü tarafından eNOS aktivasyonunu inhibe eder. Aynı zamanda, aşırı arjinaz II ekspresyonu plasental L-arjinin konsantrasyonunu azaltır ve eNOS'un tercihen süperoksit anyon üretimini kolaylaştırmasına neden olur. Süperoksit anyonu, peroksinitrit oluşturmak için NO ile reaksiyona girer, böylece NO'nun yarı ömrünü azaltır. Bu durum anormal plasental perfüzyonu ve mikrovasküler oksidatif hasarı teşvik eder.

((156)Nolu Kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.)

Çözünür endoglin(Soluble endoglin,sEng): TGF- β için bir koreseptördür ve vasküler endotel ve sinsitiyotrofoblastların hücre zarlarında yüksek miktarda eksprese edilir (149). sEng de sFlt-1 gibi antianjiyojenik bir proteindir(149–151). sEng ile sFlt-1 arasındaki kesin ilişkisi bilinmemektedir. İkisinin de PE patogenezinde ayrı mekanizmalarla rol oynadığı düşünülmektedir(149–151). sEng, preeklampsi klinik bulgularının başlamasından iki ila üç ay önce PE’li gebelerin serumlarında yükselir, hastalığın şiddeti ile korelidir ve doğumdan sonra düşer. Artmış bir sFlt-1/PlGF oranı ile birlikte artan sEng seviyesi, preeklampsi gelişiminin en prediktif laboratuvar bulgusudur.

sEng’nin in vivo çalışmalarda vasküler geçirgenliği arttırdığı ve hipertansiyonu indüklediği, hayvan çalışmalarında ise HELLP benzeri sendrom oluşturduğu, fetüste intrauterin gelişme geriliği oluşturduğu, yani ciddi bir preeklampsi benzeri durumu indüklemek için sFlt-1’in vasküler etkilerini güçlendirebileceği düşünülmüştür.

2.3. MikroRNA

MikroRNA’lar, 18-25 nükleotid uzunluğundadır. Küçük kodlanmayan RNA grubunun ana üyesidirler. Genlerin 3’UTR’lerini hedef alarak, genin posttranskripsiyonel olarak düzenlenmesinde görev alırlar. mRNA translasyonunu inhibe ederek veya mRNA degradasyonunu aktive ederek gen ifadesini düzenlerler. İlk defa 1993’te *Caenorhabditis elegans*’ta keşfedilmiştirler. 2000 yılında insanda ilk keşfedilen miRNA let-7’dir. 2018 yılı itibarıyla miRNA veritabanında 2675 insan miRNA’sı yer aldığı açıklanmıştır. miRNA dizilerinin büyük çoğunluğu, kodlamayan RNA’ların intronları, ekzonları ve pre-mRNA intronları içinde bulunur. miRNA genlerinin çoğu, RNA polimeraz II tarafından kodlanır. Bu moleküllerin birçok biyolojik ve patolojik süreçlerde (metabolik-kardiyovasküler hastalıklar) önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bir dizi genin düzenlenmesinde ve o genle alakalı endotel disfonksiyonu, diyabet, ateroskleroz ve kanser gibi patolojik süreçlerde miRNA’ların önemli rolü vardır. MikroRNA’lar dokularda spesifik olarak eksprese edilirler ve patolojik durumlarda değişim gösterebilecekleri için

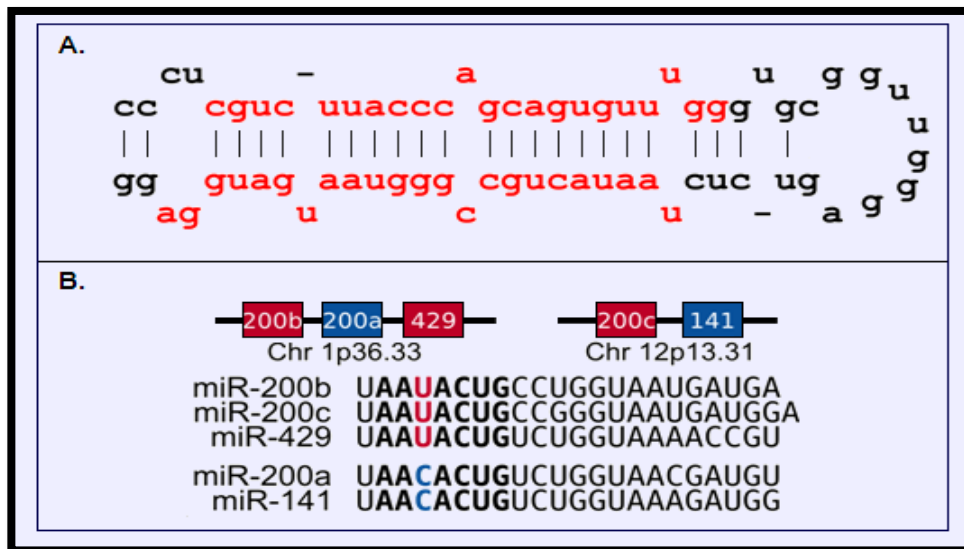
yeni biyobelirteç adaylarıdır. MiRNA'ların ve genetik hedeflerinin araştırılmasıyla, hastalık süreçlerindeki yer alan yollar keşfedilebilir, tedavideki yaklaşımlar değişebilir(152).

MiRNA'ların birçok çalışmada gebelik komplikasyonlarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir, preeklampitik hastalarda komplikasyonsuz gebelerle karşılaştırıldığında birçok plasental miRNA salınımının farklı olduğu saptanmıştır(153). Anne dolaşımındaki plasenta kaynaklı miRNA'ların konsantrasyonlarındaki değişim gebelik komplikasyonlarının saptanmasında bir belirteç olarak kullanılabilir(26) .

2.3.1. miR-200c

miR-200c, miR-200 ailesi'nin (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-429) bir üyesidir. miR-200 ailesi mir-141 ile birlikte 12.kromozom (12q13.31)'dadır.

miR-200c'nin hücrede fizyolojik olarak proliferasyon, hücre döngüsü kontrolü, apoptozis, patolojik olarak kanser invazyonu, metastaz, oksidatif hasar ve endotel disfonksiyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.



Şekil 8: miR-200 ailesi

(154) nolu kaynaktan Türkçeleştirilmiştir. Şekil A: Prekursör miR-200c Şekil B: miR-200 ailesi

miR-200c, hipoksiye cevabı düzenlemede önemli rol oynayan HIF-1 α 'yı azaltır. miR-200c ekspresyonu arttıkça hipoksiye karşı verilen yanıt zayıflar. HIF-1 α bir transkripsiyon faktörüdür ve hipoksi ile ilişkili miRNA'ların ekspresyonunu düzenlerken, HIF-1 α da miRNA'lar tarafından düzenlenir(155). HIF-1 α , oksijen konsantrasyonunun düşük olduğu durumlarda çeşitli genlerin transkripsiyonunu düzenleyerek hücrenin bu koşullara adaptasyonunu sağlar. HIF-1 α 'nın, preeklampsi hastalarının plasenta trofoblastlarında aşırı ekprese edildiğini belirten çalışmalar mevcuttur. Preeklampside hipoksik koşulların HIF-1 α 'nın ekspresyonunu arttırdığı, HIF1'in, trofoblast farklılaşmasının güçlü bir inhibitörü olan TGF- β 3 ekspresyonunu düzenlediği belirtilmiştir. TGF- β 3 preeklamptik plasentada aşırı ekprese edilir. HIF-1 α aracılı TGF- β 3 ekspresyonunun trofoblastların invazyon yeteneklerinin gelişmemesine ve böylece de preeklampside trofoblast disfonksiyonuna yol açabileceği düşünülmektedir. VEGFR – 1 reseptörü Flt1 geni tarafından kodlanır. HIF-1 α bu genin promotörüne bağlanarak hipoksik koşullarda düzenlenmesini sağlar. HIF-1 α anjiyojenik faktörleri (VEGF, PlGG ve VEGFR-1/Flt1) ve TGF- β 3 ekspresyonlarını etkileyerek endotel disfonksiyonuna yol açabilir, preeklampsinin etyopatogenezinde rol oynuyor olabilir(156). HIF 1 α oksijen seviyesinin normal olduğu şartlarda hızlıca bozulmaya uğrar ve 5 dakika gibi kısa bir yarı ömrü vardır.

Endotel disfonksiyonunda önemli rol oynayan miRNAlardan birisi de miR-200c'dir. Oksidatif stres miR-200c upregülasyonunu sağlar, upregüle olan miR-200c ZEB1(zinc finger E-box binding homeobox-1) molekülünü inhibe ederek endotelial hücrelerin apoptozunu uyarır(27). Oksidatif stres ile artan miR-200c'nin, endotelde Sirtuin1 (SIRT1), eNOS ve forkhead box (FOXO1) arasında mevcut olan otoregülasyon döngüsünü bozduğu ve böylece NO azalmasına ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmasına neden olduğu gösterilmiştir(157).

miR-200c ailesi, ROS tarafından indüklenir, miR-200c'nin apoptoz, yaşlanma, ROS artışı ve NO azalmasından en fazla sorumlu olan üye olduğu ve endotel yal disfonksiyona sebep olduğu düşünülmektedir(27). miR-200c'nin hem ROS ile indükleniyor olması hem de ROS artışına sebep olması, NO biyoyararlılığını değiştirmesi preeklampsi etyopatogenezinde katkıda bulunuyor olabilir.

Intrauterin büyüme geriliği, plasenta patolojileri ile ilişkilidir. Intrauterin büyüme geriliği olan gebeliklerde maternal plazmada miRNA düzeylerinin arttığını belirlenmiştir(26).

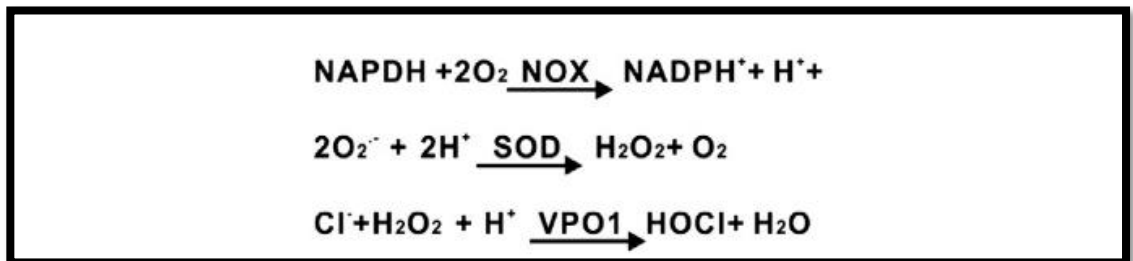
Preeklampsinin etyopatolojisinde olduğu gibi kararsız plakların altyapısında da endotel disfonksiyonu, ROS ve enflamasyon yer alır. miR-200c'nin, aterosklerotik plak progresyonu ile ilişkili olduğu ve yüksek embolik risk taşıyan hastalarda biyobelirteç kullanılabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur(158).

miR-200c, VEGF'yi hedef alarak mRNA ve protein seviyelerini değiştirdiği preeklampatik grupta miR-200c ekspresyonlarının artarak VEGF düzeylerinin azaltılabileceği belirtilmiştir(159).

PE modeli oluşturulan sıçan modellerinde, hasta grubunun plasenta trofoblastlarında miR-200c ekspresyonunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur. miR-200c ekspresyonunun artması, Bax ve Kaspaz-3'ü upregüle ederken, Bcl-2'yi downregüle eder. Bu şekilde plasental trofoblastlarda apoptozisi arttırabilir. miR-200c'nin aşırı eksprese edildiği PE grubunda apoptozisin arttığı flowstometri ile gösterilmiştir. miR-200c, Wnt/ β -katenin sinyal yolu hedefler ve düzenler böylece PE'nin gelişimi ve ilerlemesinde rol oynayabileceği düşünülmektedir.(161).

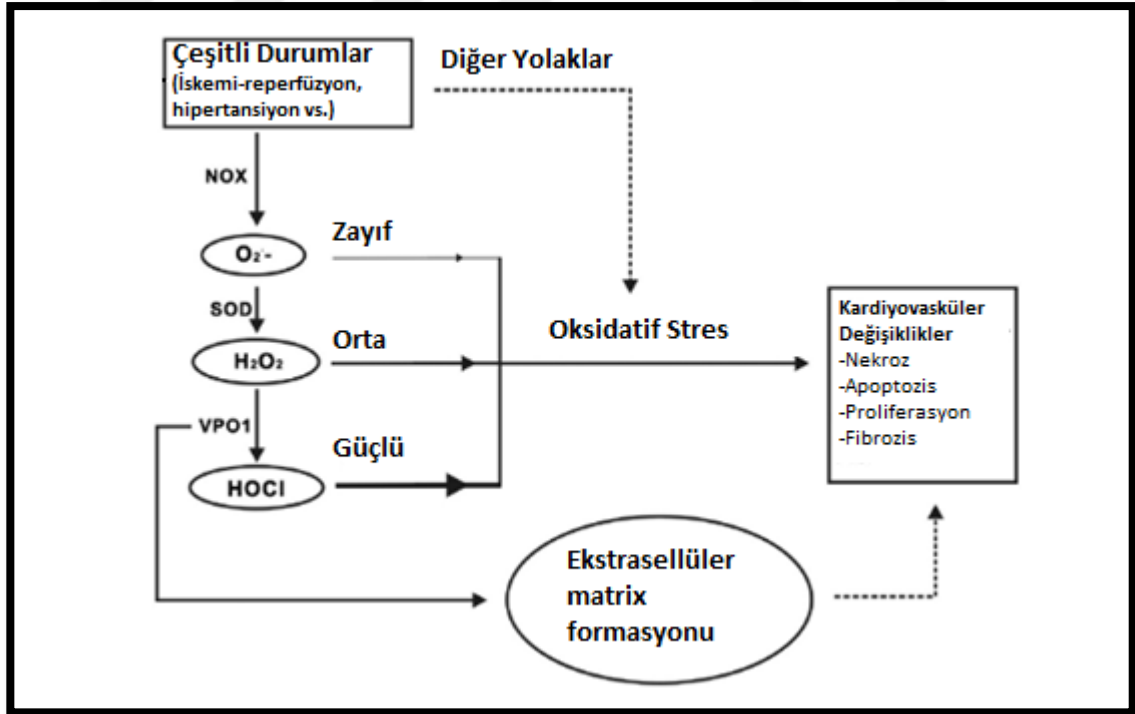
2.4.Vasküler peroksidaz 1 (VPO1)

Vasküler peroksidaz 1 (VPO1, eski adı Peroksidasin) hem grubu içeren, peroksidaz enzim ailesinin yeni tanımlanmış bir üyesidir(162). Bu enzim insan vücudunda başlıca endotelial hücrelerde, kalp ve düz kas hücrelerinde üretilir ve dolaşıma salınır.



Şekil 9: NOX, SOD ve VPO1 yolları

VPO1, fizyolojik koşullarda, güçlü bir oksidan olan hipokloröz asit (HOCl) üretimini katalize eder(163). HOCl, O_2^- ve H_2O_2 bileşiklerinden daha oksidan bir moleküldür. H_2O_2 , SOD enziminin aktivitesiyle veya O_2^- 'den kendiliğinden oluşabilir. Oluşan H_2O_2 , ortamdaki Cl^- iyonları varlığında VPO1 ile HOCl'yi oluşturur. Araştırmalar, VPO1'in güçlü bir oksidan bileşik olan HOCl'yi oluşturarak oksidatif hasara neden olduğunu göstermiştir. Endotel dokusu hasarında VPO1 önemli bir rol oynamaktadır. VPO1 aracılı oksidatif stresin kardiyovasküler hastalıklarda (hipertansiyon, pulmoner arteriyel hipertansiyon, miyokardiyal iskemi gibi) kilit rol oynadığı birçok çalışmada gösterilmiştir(164–166). VPO1'in oksidan etkisinin yanında ayrıca fibroblast proliferasyonunu tetikleyerek iskemi sonrası fibroziste direkt olarak rol oynayabileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur(164). VPO1'in kardiyovasküler sistemdeki etkileri **Şekil 10**'da özetlenmiştir.



Şekil 10: Kardiyovasküler sistemde NOX, SOD ve VPO1 aracılı oksidatif stres

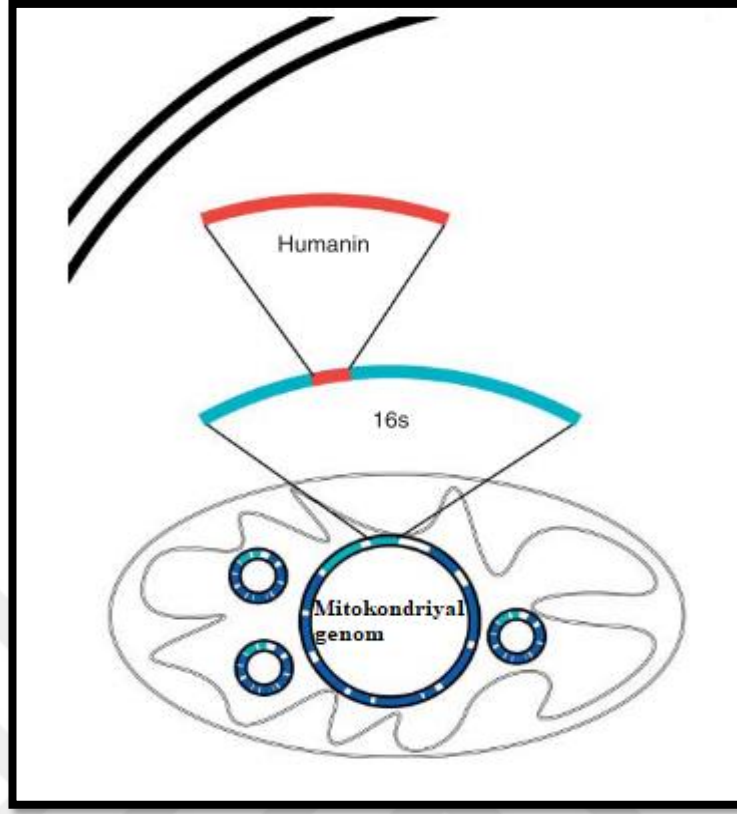
((167) numaralı kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.)

HOCl, direkt olarak DNA, lipid ve proteinlere oksidatif hasar verebilir. Ayrıca apoptotik yolları aktive edebilir, onkotik hücreleri öldürmede de görev alır. Sitotoksik etkisi yüksek konsantrasyonlarında görülür. Düşük konsantrasyonlarda MAPKinaz yollarını aktive ederek hücrenin büyümesinin durmasına veya apoptozisine sebep olabilir(168). Nötrofiller başta olmak üzere myeloperoksidaz enzimi ile üretilerek bakteri ve diğer mikroorganizmalara karşı kullanılır. Bakterilerde DNA'yı ve ATP üreten sistemleri hedef alır. HOCl birçok biyolojik substratın oksidasyon ve klorinasyon reaksiyonlarını uyarabilir.

Oksidatif stresin, preeklampsi etyopatolojisinde yer aldığı bilinmektedir. Preeklampside uteroplasental vasküler direncin arttığı bildirilmektedir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve reaktif azot türlerinin (RNS) artan seviyelerinin neden olduğu doku hasarının ortaya çıkabileceği düşünülmektedir. Pro- ve anti-oksidanlar arasındaki denge, oksidanlar yönünde bozulmuştur. ROS ayrıca trombosit adezyon ve agregasyonunu tetikleyerek intravasküler koagülopatiyeye neden olabilir. Koagülopati, plasental enfarktüse ve fetüsün beslenmesinin bozulmasına neden olur. Plasental iskemi, ROS'tan koruyucu olan katalaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi plasental antioksidan enzimlerin aktivitesinin azalmasına da neden olur. Oksidatif hasar, preeklampside hipertansiyon ve proteinüri başta olmak üzere, preeklampsi bulgularına sebep olur (169).

2.5. Humanin (HN)

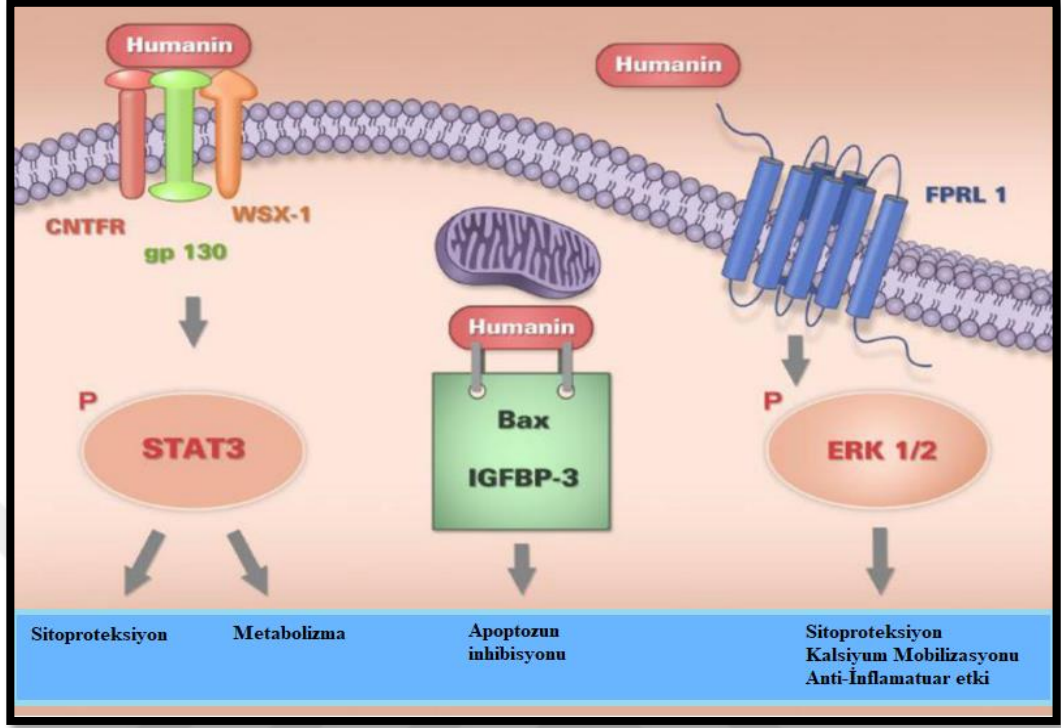
Humanin (HN), 2001 yılında keşfedilen, antiapoptotik, mitokondri kaynaklı 24 aminoasitli bir peptittir(170). Mitokondri 16S RNA kodlama bölgesindeki mitokondriyal DNA'nın açık okuma alanından (open reading frame-ORF) kodlanan mitokondriyal türevli peptitler (MDPs) olarak isimlendirilen polipeptit ailesinin ilk keşfedilen üyesidir.



Şekil 11: Humanin

((171)Numaralı kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.)

Merkezinde hidrofobik, N-terminalinde pozitif yüklü, C-terminalide negatif yüklü olmak üzere üç bölümden oluşur. Sinyal iletiminde Leu9-Leu10-Leu11 bölgesi görev alır. Sitoproteksiyonda Pro3-Pro19 görev alırken, sinyalizasyonda en kritik aminoasit Leu-10'dur. IGF bağlayıcı proteine (IGFBP-3) bağlanması için gerekli bölge Phe6 ve Lys21'dir. HN'in analogları HNG, HNGF6A, HN-C8P , HNG17, HN-S7A, gibi analogları bilinmektedir. HN'in sentetik türevi olan HNG, HN'den 1000 kat daha güçlü aktiviteye sahiptir. Yapılan çalışmalarda HN'in hücreleri oksidatif stres, hipoksiden koruduğu, kardiyovasküler ve nörodejenaratif hastalıklarda da gelecekte tedavi amaçlı kullanılabileceği düşünülmektedir(171).



Şekil 12: Humaninin hücresel etkileri

((172) numaralı kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.)

Vasküler endotelde sentezlenen humanin, membran reseptörlerine ve hücre içi bileşiklere bağlanarak etki gösterebilir. Membran reseptörlerine bağlanarak antiapoptotik etkisini gösterebileceği düşünülmektedir. Bağlandıkları reseptörler arasında; GPCRs, FPRL1, FPRL2 ve üçlü reseptör CNTFR/WSX-1/gp130 bulunur. Humanin hücre içinde proapoptotik olan Bax proteini etkileşir(173). Bax'ın transferini ve konformasyonel değişimini engeller. Bu şekilde apoptozisin ilk adımı olan sitokrom c salınımı inhibe edilip apoptozisi durdurduğu gösterilmiştir. HN, ayrıca tBid ile Bax oligomerasyonunu da önleyerek bu etkisine katkıda bulunur. Preeklampitik plasenta trofoblastlarında kontrollere göre apoptozis arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur(174).

HN ile ilgili yapılan ilk araştırmalar daha çok nörodejenatif hastalıklar üzerinedir; amiloid öncü protein (APP) aktivasyonunu inhibe ettiği böylece

nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir(170). HN'in; IGFBP3 (insulin-like growth factor-binding protein 3) ile etkileşime girerek glial hücrelerde IGFBP3 aracılı apoptozisi durdurabileceği, ayrıca iki molekülün birlikte sinerjistik etki göstererek amiloid-b-aracılı apoptozisten nöronları koruduğu belirtilmiştir(171).

Yapılan çalışmalarda HN'in serum düzeylerinin yaş arttıkça azaldığı gözlenmiştir(175). Mitokondriyal fonksiyon yaşla birlikte azalır ve bu durum da oksidatif stresin artmasına sebep olur. Oksidatif hasarın yaşla birlikte artmasında sebep olan bu durum kardiyovasküler hastalıklar (myokard infarktüsü, hipertansiyon, inme vs.) ve nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer, Parkinson vs.) için önemli bir role sahiptir(176). HN, nöronları A β sebepli hücre apoptozuna karşı koruyucu etki taşır. Mitokondriyal membran potansiyelini düşürür ve apoptozun önemli basamağı olan sitokrom c salımını engeller(177). Oksidatif stresin arttığı bazı hastalıklarda HN'in upregülasyonu ile kompensasyon sağlanmaya çalışıldığını gösteren çalışmalar mevcuttur. İskemi-Reperfüzyon sonrası fare myokardiyositlerinde HN düzeyinin arttığı, MELAS sendromlu hastaların myositlerinde HN ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir(175,178). Buna karşın endotel fonksiyonun bozulduğu hastalıklarda HN düzeylerinin azaldığını gösteren araştırmalar, profilatik tedavide kullanıldığında endotel fonksiyonu koruduğunu savunan deneysel çalışmalar da mevcuttur. HN'in analoğu olan HNG'nin, iskemide profilaktik olarak veya reperfüzyonda tedavi olarak uygulandığında infarkt alanını azalttığı, tedavi edilen farelerin daha iyi myokardiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir(175). Başka bir çalışmada diğer bir HN analoğu olan HNGF6A ile tedavi edilen, Apo-E eksiliği olan farelerin aortunda aterosklerotik plak boyutunun küçüldüğü, endotel disfonksiyonun ise gerilediği gözlemlenmiştir(40).

Preeklampitik gebelerde yapılan bir çalışmada sağlıklı gebelere göre serum humanin değerlerinin anlamlı olarak değiştiği bulunmuştur(42). Vasküler endotel duvarlarında eksprese edilen HN'in oksidatif strese karşı koruyucu olarak görev alabileceği belirtilmiştir(179).

2.6. MOTS-c (mitochondrial open-reading frame of the twelve S rRNA-c)

MOTS-c mitokondriyal DNA'da (mtDNA) kodlanan, 16 aminoasitlik bir peptittir. HN gibi, mitokondri genomunun açık okuma çerçevelerinde kodlanan, mitokondriyal türevli peptitler (MDPs) isimli polipeptit ailesinin bir üyesidir. MOTS-c geni 51 baz çiftinden oluşur, yüksek miktarda eksprese olur, translasyonu ise stoplazmada gerçekleşir. Yapısındaki aminoasit dizilimi Met-Arg-Trp-Gln-Glu-Met-Gly-Tyr-Ile-Phe-Tyr-Pro-Arg-Lys-Leu- Arg şeklindedir(180).

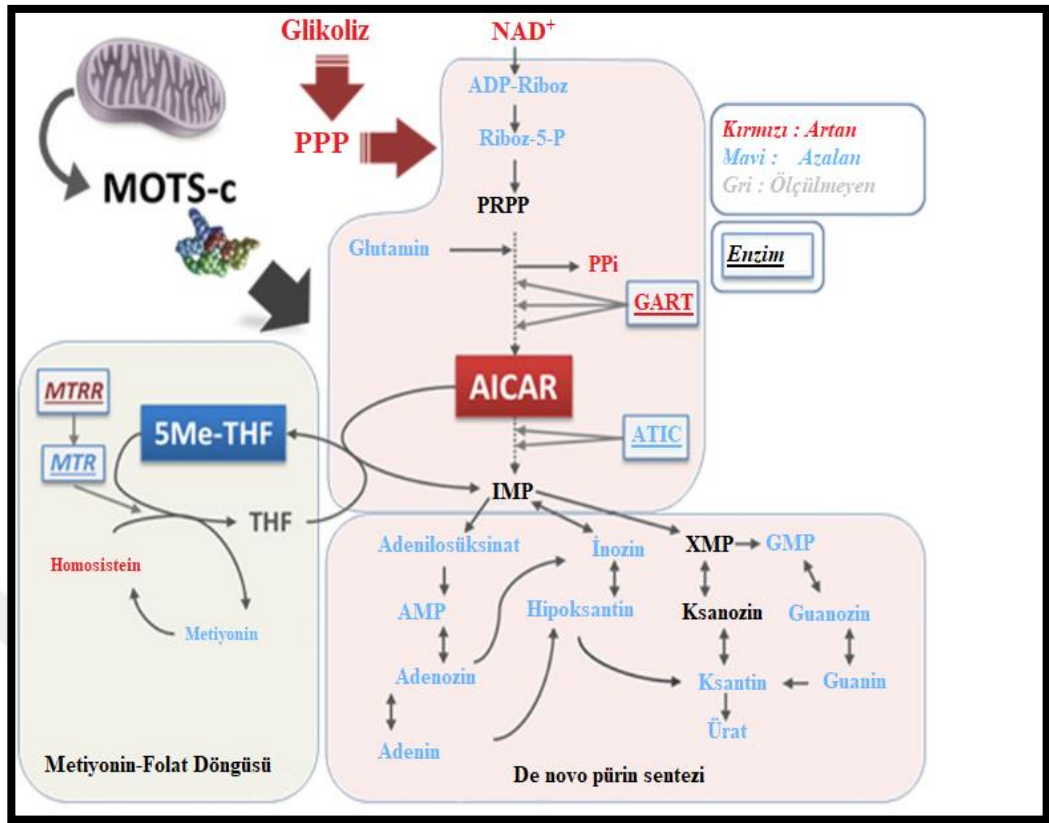


Şekil 13: MOTS-c açık okuma çerçevesi

((180) numaralı kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.)

MOTS-c, hücrede stoplazmadan nükleusa geçerek DNA ile etkileşir, etkisini adenozin monofosfat ile aktifleşen kinaz (AMPK) üzerinden gösterir. Küçük boyutlu bir peptit olduğu için nükleus porlarından kolayca geçebilir, taşıyıcısı yoktur. Kendisine özgü bağlandığı spesifik bir reseptör henüz bulunmamıştır(181). Yapılan hayvan çalışmalarında kalp, testis , iskelet kası , vazoendotelial duvar gibi birçok dokuda sentez edildiği gözlemlenmiştir.

MOTS-c, AMPK yolağını uyararak glukoz düzeylerinin düzenlenmesini sağlar. De-novo pürin sentezi ve metiyonin-folat döngüsündeki görev alan genlerin ekspresyonlarını değiştirerek metiyonin ve 5Me-THF (5metil-tetrahidrofolat) düzeylerinde azalmaya, homosistein düzeylerinde ise artmaya sebep olur. De-novo pürin sentezi, 5Me-THF düzeylerinde azalma ile inhibe olur ve bu yüzden AICAR (S-aminoimidazol-4-karboksamitribonükleotit) birikir. Artan AICAR, AMPK yolağını uyarır, böylece kas hücrelerinde oksidatif fosforilasyon artar glukoz direnci düşer, yağ asidi oksidasyonu artar(180,182).



Şekil 14: MOTS-c'nin etkileri

((180) numaralı kaynaktan Türkçeleştirilmiştir.)

Obez erkek çocuk ve adölesantlarda dolaşımdaki MOTS-c seviyeleri anlamlı olarak düşük bulunmuş ve insülin direnci ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Diyabette uzun süredir kullanılan bir ilaç olan metforminin, AMPK yolağını aktive ederek etkisini gösterdiği bilinmektedir. Bu yüzden çocukluk çağı obezitesinde insülin direncini göstermede yeni bir biyobelirteç olabileceği, tedavide Tip 2 DM in tedavisinde yeni bir ilaç olarak kullanılabileceği düşünülmüştür(183). Diğer bir çalışmada overektomi yapılan farelere intraperitoneal MOTS-c uygulanmış; overektominin neden olduğu vücut ağırlığı artışı, insülin direnci, enflamasyonu önlediği gözlemlenmiştir. Postmenapozal metabolik disfonksiyonda yeni bir ilaç olarak kullanılabileceği düşünülmüştür(184).

AMP-aktive Protein Kinaz (AMPK) Yolağı: Uzun süren egzersizlerde dolaşımdaki glukoz seviyesi dengede tutmaya çalışan metabolik yollardan biri de

AMPK Yolağıdır. İskelet kasları dolaşım glukoz seviyelerini düzenlemede önemli bir rol oynasa da uzun süreli egzersizlerde mitokondriler ADP'yi ATP'ye çevirmede yetersiz kalır ve ADP düzeyleri artar. Artan enerji ihtiyacını karşılamak için AMPK yolağı kullanılır. Adenilat kinaz, sitoplazmada iki ADP'den bir ATP ve bir AMP oluşturur. Artan AMP , AMPK enzimini fosforilleyerek aktive eder. AMPK , ATP kullanan yolları inhibe ederken ATP üreten yolları uyarır. Kaslarda glukozu hücre içine alan GLUT-4'ün ekspresyonunu artırır, glikoliz enzimlerinden heksokinazı, TCA enzimlerinden süksinat dehidrojenaz (SDH) ve sitrat sentazı aktive eder, oksidatif fosforilasyonda sitokrom c'nin üretimini artırır. Asetil-KoA karboksilazı (ACC) inhibe ederek yağ asidi oksidasyonu artırır.

Koroner hastalığı olanlarda plazma MOTS-c seviyeleri kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur . MOTS-c'nin asetilkolin aracılı vazodilatasyonu uyardığı, enflamasyon ile ilişkili genlerin ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Bu yüzden dolaşımdaki MOTS-c seviyesinin, endotelial fonksiyonla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. MOTS-c peptidinin direkt olarak vazodilatatif bir özellik taşımadığı ancak dolaşımdaki düşük MOTS-c seviyelerinin endotel disfonksiyonu ile anlamlı olarak ilişkili bulunduğu çalışılmıştır(185).

Endotel disfonksiyonu; artan süperoksit üretimi, bozulmuş NO aktivitesi, endotel apoptozu, inflamasyon ve azalmış endotele bağımlı vazodilatasyon ile karakterize bir durumdur. AMP-aktive protein kinaz (AMPK) hücrel enerji durumunun bir sensörü gibi vazife görür. Endotel hücre enerji durumunu, otofajiyi artırarak, apoptozisi ise azaltarak düzenler. eNOS aktivasyonunu uyarır ve inflamasyonu inhibe eder . Damarlarda AMPK'nın uyarılması endoplazmik stresin arttığı durumlarda, yüksek glukoz seviyelerinde, hipertansiyonda damarın vazodilatasyon yeteneğini artırır. Yapılan çalışmalar MOTS-C'nin endotel fonksiyonunu iyileştirebilen AMPK'yı aktive ettiğini göstermiştir. Endotelial hücrelerden eNOS aracılı NO üretimi önemli bir rol oynar. Fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K) ve AKT NO üretiminin önemli aktivatörleridir. AMPK, PI3K/AKT/eNOS yolağını upregüle ederek endotelin vazodilatasyon yeteneğini iyileştirebilir. MOTS-c, inflamatuvar gen ekspresyonunu inhibe ederek inflamasyon aracılı ED'u azaltabilir(185). MOTS-c seviyelerinin düşüklüğü preeklampsideki artmış inflamasyona katkıda bulunuyor olabilir.

Sıçanlarda vasküler kalsifikasyon modeli oluşturulmuş, MOTS-c verilen grupta kalp fonksiyonlarının, damar elastik yapısının iyileştiği, kalsiyum seviyelerinin düştüğü, ALP aktivitesinin yarı yarıya azaldığı, hem sistolik hem de diastolik kan basıncının neredeyse kontrol grubu düzeylerine indiği gözlemlenmiştir(185). Bütün bu veriler birlikte ele alındığında, MOST-c çeşitli mekanizmalarla endotel fonksiyonun sürdürülmesinde önemlidir. Preeklampsia etyopatogeneğinde en önemli mekanizmalardan biri endotel disfonksiyonudur. Preeklampsili hastaların endotelinde NO, prostasiklin gibi vazodilatör ajanların üretimi azalmıştır. NO üretiminin azalma sebebi, MOTS-c eNOS yolağındaki bir patolojiden kaynaklanıyor olabilir. Düşük MOTS-c seviyeleri, AMPK'nın PI3K/AKT/eNOS yolağını upregüle edememesine ve endotelin vazodilate olamamasına neden olabilir. MOST-c, preeklampsia için potansiyel bir biyobelirteç olabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Çalışma gruplarının oluşturulması

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun (07/12/2018 tarihli, 106555 sayılı yazı) onayı alınarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya katılan tüm bireylere, çalışmanın öncesinde bilgilendirilmiş gönüllü olur formu verildi ve imzalatılarak onam belgesi alındı.

Çalışma gruplarımız; Mart 2020-Ağustos 2020 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Kadın Doğum Kliniği'ne başvuran bireyler arasından seçildi. Bireylerin anamnezleri alındı, dışlama kriterleri açısından değerlendirildi. Muayene ve laboratuvar sonuçlarına göre ACOG kriterleri göz önüne alınarak 50'si preeklampsi 30'u kontrol, toplam 80 gebeyi kapsayan ve aşağıda belirtilen şekilde hasta çalışma grupları oluşturuldu.

Kontrol grubu (n:30)

✓ Gebeliğin 20. Haftasından sonra başvuran, preeklampsi kriterleri ve dışlama kriterlerine uymayan 30 gebe (Yaş ortalaması $26,7 \pm 4,9$ yıl, Gebelik haftası ortalaması $32,2 \pm 4,8$ hafta).

✓ **Erken kontrol grubu:** Kontrol grubundan gebelik haftası 20-34 hafta arasında olan 15 gebe (Yaş ortalaması $26,4 \pm 4,1$ yıl, Gebelik haftası ortalaması $27,9 \pm 2,7$ hafta)

✓ **Geç kontrol grubu:** Kontrol grubundan gebelik haftası 34 haftadan geç olan 15 gebe (Yaş ortalaması $26,9 \pm 5,5$ yıl, Gebelik haftası ortalaması $36,6 \pm 1,4$ hafta)

Preeklampsi grubu (n:50):

ACOG tanı kriterleri rehber alınarak preeklampsi tanısı alan 50 gebe, 34. Hafta önce ve sonrası olmak üzere erken ve geç preeklampsi olarak 2 gruba ayrılmıştır (Yaş ortalaması $29,1 \pm 6,1$ yıl, Gebelik haftası ortalaması $32,2 \pm 5$ hafta).

✓ **Erken preeklampsi grubu:** 34. Gebelik haftasından daha önce tanı almış 25 hasta (Yaş ortalaması 31 ± 6 yıl, Gebelik haftası ortalaması $27,9\pm3,2$ hafta)

✓ **Geç preeklampsi grubu:** 34. Gebelik haftasından daha sonra tanı almış 25 hasta (Yaş ortalaması $27,1\pm5,6$ yıl, Gebelik haftası ortalaması $36,6\pm1,69$ hafta)

3.2. Çalışmadan dışlanma kriterleri

Aşağıdaki özelliklerden birini taşıyan gebeler çalışmaya alınmamıştır.

- Akut veya kronik enfeksiyöz hastalıklar ve sepsis
- Akut enflamatuvar hastalıklar ve kronik enflamatuvar hastalıkların akut alevlenme dönemleri
- Şiddetli iskemik hastalık (akut veya geçirilmiş MI, geçirilmiş SVO, geçirilmiş koroner/periferik arter revaskülarizasyon operasyonu)
- Çoğul gebelik
- HELLP sendromu
- Eklampsi geliştiren gebeler
- Son adet tarihi ile günlemeye (dating) göre yaş tahmini uyuşmayan gebeler
- Bilgilendirilmiş onam vermeyen ya da sonradan onamlarını çekmek isteyen hastalar
- Koagülopatisi olan hastalar veya antikoagülan tedavi alan hastalar
- Tedavi alan preeklampsik gebeler
- Kronik hastalığı olanlar (HT,DM,KAH vs.)

3.3. Örneklerin alınması ve çalışılan parametreler

10-12 saat gece açlığı sonrasında 08.00-10.00 saatleri arasında venöz kan alınma işlemi yapıldı. Örnekler ön koldan ikişer tane jelli serum tüplerine (BD SST II, 5 mL, 367953), EDTA'lı tüplere (BD K3 EDTA, 2 mL, 367836) alındı. Numuneler 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Ayrılan serum ve plazma örnekleri ependorflara ayrılıp etiketlenerek -30°C'de muhafaza edildi. Diğer tüplerden rutinler Fikret Biyal Merkez Laboratuvarında analiz edildi.

3.4. Yöntemler

3.4.1. Serum miRNA-200c tayini

3.4.1.1. RNA izolasyonu

İzolasyon için ExtractMe miRNA (BLIRT, Gdansk, Poland) kiti kullanıldı.

1. 200 µL β-merkaptoetanol, 20 mL miRNA Lysis tamponuna eklendi.
2. 87 mL etanol 124 mL miRNA-wash tamponuna eklendi.
3. Tamponların kapakları, buharlaşmayı önlemek için iyice kapatıldı.
4. -30°C'de muhafaza edilen serumlar, çalışma öncesinde oda sıcaklığında bekletildi.
5. Her bir ependorfa 200 µL serum daha sonra üzerlerine 400 µL miRLysis tamponu pipetlendi. 10 saniye vortekslendikten sonra 3 dakika 14000g'de santrifüj edildi.
6. 500 µL süpernatant, toplama tüpündeki DNA pürifikasyon kolonuna transfer edildi. 3 dakika 14000g'de santrifüj edildi. DNA kolonu ayrılıp saklandı. Filtreden akan çözeltiden 450 µL alınarak 1,5 mL'lik steril ependorflara pipetlendi.
7. Ependorflara 225 µL etanol eklenerek 10 saniye boyunca vortekslendi.
8. Toplama tüpündeki RNA pürifikasyon kolonuna, hazırlanan karışım pipetlendi. 3 dakika boyunca 14000g'de santrifüj edildi. RNA kolonu ayrılıp saklandı, filtrat ependorflara aktarıldı.

9. Elde edilen filtrat hacmi kadar etanol eklenerek vorteks ile iyice karıştırıldı. 650 µL pipetlenerek miRNA kolonuna aktarıldı. 14000g'de 3 dakika boyunca santrifüj edildi. Filtrat atıldı. miRNA kolonu ve toplama tüpü tekrar kullanıldı.
10. Artmış olan önceki filtrat miRNA kolonuna aktarılarak 14000g'de 3 dakika boyunca santrifüj edildi.
11. miRNA bağlanmış mini kolonlar hazırlandı.
12. Mini kolonlara 500'er µL miRNA-wash tamponu eklendi. 14000g'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi. (Bu basamak üç kez tekrarlandı.)
13. En son santrifüj yapıldıktan sonra altta kalan filtrat atıldı. 2 dakika boyunca 14000g'de boş santrifüj yapıldı.
14. Santrifüjden sonra filtrat ve toplama tüpü atıldı. Minikolonlar steril ependorf tüplerine konuldu. Kuruması beklendi.
15. Minikolonlardaki membranların ortasına gelecek şekilde 70 µL miREB (elüsyon) tamponu eklendi. 2 dakika beklenildi. 11000g'de 2 dakika santrifüj yapıldı.
16. RNA konsantrasyon ve saflığı NanoDrop spektrofotometrede (ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE 19810, USA) ölçülüp, kaydedildi. Nükleik asit ölçümü için 260 nm, kontaminasyon için 230 nm dalga boyu kullanıldı. Her bir örnek için 260 ve 230 nm absorbans değerleri ve 260/230 oranları tablo haline getirildi. 260/280 veya 260/230 oranı saflık (~1,8 ve 2,0) belirlemede kullanıldı.
17. Ayırıştırılmış olan miRNA'ların bulunduğu ependorflar bir sonraki aşamada çalışılmak üzere -30°C'de muhafaza edildi.

3.4.1.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için “WizScript™ cDNA Synthesis Kit (High Capacity)” kiti kullanıldı.

Tablo 2: miR-200c ve U6 primer sekansları

miR-200c RT primer	GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGGAAGAAGACGGAAGAATGTGCGTCTCGCCTTCTTTCTCCATCAT
miR-200c F primer	GCGGTAATACTGCCGGGTAA
miR-200c R primer	CGAGGAAGAAGACGGAAGAAT
U6 F primer	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAAT
U6 RT/R primer	CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT

Tablo 3: cDNA Sentezi Master Karışım Hazırlama Oranları

REAKTİF	HACİM
10X Reaksiyon Tamponu	2 µL
20X dNTP karışımı	1 µL
RT primer miR-200c	1 µL
RT primer U6	1 µL
WizScript™ RTaz	1 µL
RNaz İnhibitorü	0,5 µL
RNaz'sız Su	3,5 µL
TOPLAM	10 µL

1. Önceden spektrofotometrede yapılan konsatrasyon ölçümüne göre herbir örnek için dilüsyonda kullanılacak su hacmi hesaplandı. Örnekler oda

sıcaklığına çıkartılıp, RNA konsantrasyonu 1 ng/uL olacak şekilde dilüe edildi.

2. Ana 2X RT karışımı, mikrotüplere tabloda belirtilen oranlarda 80 hasta için hazırlandı (**Tablo 3**).
3. Hazırlanan karışım nazikçe karıştırıldı.
4. Kuyucuklara 10 µL 2X RT karışımı mikrolaklara pipetlendi.
5. Her kuyucuğa 10 µL miRNA örneği eklendi ve birkaç kez pipetlenerek karışması sağlandı. (Böylece 2X RT karışımı yarı konsantrasyona inmiş oldu.)
6. Hava kabarcıkları ve diğer katı partikülleri çöktürmek için kısaca santrifüj yapıldı.
7. Tüpler RT reaksiyonu yapılana kadar buzda bekletildi.
8. Mikroplate StepOnePlus real-time PCR (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) cihazına yerleştirildi. RT reaksiyon karışımı tabloda(**Tablo 4**) belirtildiği gibi inkübe edildi.
9. Sentezlenen cDNA'lar, real-time PCR'da kullanılmak üzere -30°C'de saklandı.

Tablo 4: cDNA RT protokolü

	Adım 1	Adım 2	Adım 3	Adım 4
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Zaman	10 dk	120 dk	5 dk	∞ (Tercihe bağlı)

3.4.1.3. Real Time PCR

cDNA amplifikasyonu ve miR-200c ekspresyon seviyelerinin analizinde, StepOnePlus real-time PCR cihazı (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) ve spesifik AMPLIFYME SYBR Universal kiti (BLIRT, Gdańsk, Poland) kullanıldı. U6 (Small RNAControls from Applied Biosystems), endojen kontrol olarak kullanıldı.

3.4.1.4. Yöntemin prensibi

RT (EŞ-ZAMANLI) PCR'da ortama ısıya dayanıklı polimeraz enzimi, tepkimelerin gerçekleşmesi için gerekli tampon ve kofaktörler, çoğaltılacak olan DNA örneği, DNA'daki hangi hedef bölgeyi çoğaltacağımızı belirleyen primerler, floresan boya ve DNA ipliğinin uzamasını sağlayan nükleotidler eklenir. PCR cihazının içerisinde sıcaklık belirli döngüler içerisinde sürekli olarak değiştirilir. İlk basamakta sıcaklık 95°C'ye çıkartılır, denatürasyon gerçekleşir, DNA zincirleri birbirinden ayrılır. İkinci basamakta sıcaklık 60°C'ye düşürülür. Primerler tek sarmallı DNA'lardaki hedef bölgelerine bağlanırlar. DNA polimeraz enzimi bağlanmış primerlerin ucuna karşısındaki kalıp DNA zincirine karşılık gelecek şekilde ortamdaki nükleotidleri ekler. İlk basamak denatürasyon basamağı, ikinci basamak bağlanma ve uzama basamağı olarak adlandırılır. Bu iki basamak 40 döngü olacak şekilde tekrarlanır. Döngü sayısı arttıkça hedef DNA bölgesi sürekli olarak çoğaltılır. SYBR green boyası çift sarmallı DNA'ya bağlanabilirken tek sarmallı DNA'ya bağlanamaz. Ortamdaki çift sarmallı DNA'ya bağlanarak floresan ışımaya yapar. Hedef DNA çoğaldıkça dedektöre düşen sinyal miktarı artar. Eş zamanlı PCR'da herbir döngüdeki floresan sinyali ölçülür. Hedef DNA'daki ilk anlamlı artışın olduğu ekponensiyel faz gözlemlenir. Başlangıçtaki hedef cDNA konsantrasyonu ne kadar fazlaysa ekponensiyel artışın gözlemlendiği ilk döngü o kadar erken olur. Floresans değerlerinin eşik değerini geçtiği noktaya eşik döngüsü (Ct) denir. Ct değeri, sistemin floresan miktarındaki artışı farketmeye başladığı ve PCR ürününün log-lineer fazda ekponensiyel olarak artmaya başladığı döngü sayısıdır. 40 döngüden sonraki Ct değerleri arkaplan gürültüsünden ayırt edilemediği için çoğalma olarak hesaplara katılamaz.

Tablo 5: Real-Time PCR reaksiyon karışımı

Reaktif	1x	55x
Primer F (10 µM)	0,6 µl	33 µl
Primer R (10 µM)	0,6 µl	33 µl
PCR-grade su	6,4 µl	352 µl
50x High ROX çözeltisi	0,4 µl	22 µl
qPCRmMix (10x)	10 µl	550 µl

Real Time PCR şu sırayla uygulandı:

1. Reaktifler ve cDNA örnekleri çözdürüldü ve karışması sağlandı.
2. Reaksiyon karışımı tabloda belirtilen oranlarda karıştırılarak hazırlandı.
3. Hazırlanan karışım, qPCR reaksiyon plağına pipetlendi.
4. cDNA kalıpları plağa eklendi. Herbir örnek ve kontrol çift çalışıldı. Plaklar özel filmleri ile kapatıldı. 1-2 dakika düşük devirde santrifüj edildi.
5. Plaklar cihaza yerleştirildi.
6. **Tablo 6**'te belirtilen protokol uygulandı.
7. C_T (treshold cycle) değerleri kaydedildi.

Tablo 6: 2 basamaklı termal döngü protokolü

İşlem	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Aktivasyon ve Denatürasyon	95°C	180 s	
Denatürasyon	95°C	5 s	35–45
Bağlama/Uzama/ Floresans Tespiti	60°C	30 s	
Erime Eğrisi Analizi			

3.4.2. Plazma VPO1 düzeyinin tayini

Plazma VPO1 düzeyinin tayininde ELISA (Enzyme Linked İmmunabsorbent Assay) yöntemi kullanıldı. (Human Peroxidasin Homolog ELISA Kit, Bioassay Technology Laboratory, Katalog Numarası: E5851Hu; çalışma içi %CV: 8, çalışmalar arası %CV: 10)

3.4.2.1. Yöntemin prensibi

Yöntem, ELISA prensibine dayanmaktadır. Plaklar önceden insan VPO 1'e spesifik antikorla kaplanmıştır. Hasta örneklerinde bulunan VPO1, kuyucuklardaki spesifik antikora bağlanır. Daha sonra biotinle işaretlenmiş antikorlar eklenir ve örnekteki VPO1'e bağlanırlar. Böylece antikor-antijen-antikor sandviç kompleksi oluşur. Streptavidin-HRP işaretli antikorlar ortama eklenir ve biotinle işaretlenmiş olan antikora bağlanır. Kuluçka süresinden sonra yıkama yapılarak ortamdaki bağlanmamış Streptavidin-HRP uzaklaştırılır. Substrat çözeltisi eklenerek gerçekleşen enzim-substrat reaksiyonu sonucu oluşan sarı rengin yoğunluğu, plakta bağlanan VPO1 konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Asidik durdurma çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulur. 450nm'de absorbans değerleri ölçülür.

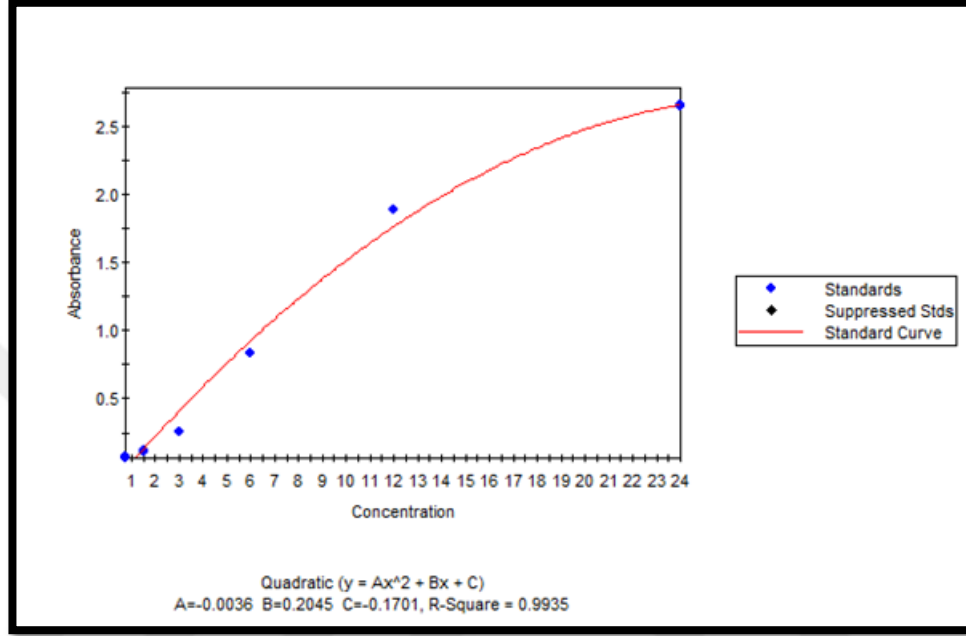
3.4.2.2. Kullanılan ayıraçlar

- Anti VPO1 antikorlarıyla kaplı 96 kuyucuklu plak
- VPO1 standart çözeltisi (24ng/ml)
- Standart dilüsyon çözeltisi
- Streptavidin-HRP çözeltisi
- Durdurma Çözeltisi
- Substrat Çözeltisi A
- Substrat Çözeltisi B
- Konsantre yıkama tamponu
- Biotinle işaretli VPO1 antikor çözeltisi
- Yıkama çözeltisi

3.4.2.3. Testin yapılışı

1. Örnekler ve ayıraçlar oda ısısına getirildi.
2. Standart çözelti hazırlanıp seri seyreltmeler yapıldı.
3. Plak kuyucuklarının ilk 16 tanesine standartlardan 50şer μL eklendi, geri kalan kuyucuklara 40 μL örnek ve 10 μL anti-VPO1 antikor eklendi. Daha sonra kör kuyucuğu hariç her kuyucuğa 50 μL streptavidin-HRP eklendi. Plagın üstü kapatılıp 37° C’de 60 dakika inkübe edildi.
4. Kuyucuklar otomatik yıkayıcıda 5 kez yıkandı.
5. Her kuyucuğa ilk önce 50 μL substrat A, daha sonra 50 μL substrat B çözeltisi eklendi.
6. Karanlıkta 37 ° C’de 10 dakika inkübe edildi.

7. 50 µL durdurma çözeltisi her kuyucuğa eklendi. 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı.
8. Standart eğrisi oluşturuldu.
9. Örneklerin konsantrasyonları ng/ml cinsinden hesaplandı.



Şekil 15: VPO1 Standart Eğrisi

3.4.3. Plazma MOTS-c düzeyinin tayini

Plazma MOTS-c düzeyinin tayininde ELISA (Enzyme Linked İmmunabsorbent Assay) yöntemi kullanıldı. (Human MOTS-c ELISA Kit, Bioassay Technology Laboratory, Katalog Numarası: CEX132Hu; çalışma içi %CV: 10, çalışmalar arası %CV: 12)

3.4.3.1. Yöntemin prensibi

Yöntem, yarışmalı inhibisyon enzim immünassay prensibine dayanmaktadır. Plaklar önceden insan MOTS-c'ye spesifik antikorla kaplanmış. Kuyucuklarda önceden kaplanmış antikorlar için, biotin ile işaretlenmiş MOTS-c ve işaretlenmemiş MOTS-c (standart veya numuneden gelen) arasında yarışmalı inhibisyon reaksiyon başlar. Kuluçka süresinden sonra yıkama yapılarak

bağlanmayan konjugatlar ortamdan uzaklaştırılır. Daha sonra avidin-HRP konjugatı her kuyucuğa eklenir ve tekrar kuluçka süresi beklenir. Bağlı HRP konjugatı düzeyi numunedeki MOTS-c düzeyleri ile ters orantılıdır. Substratı ekledikten sonra oluşan rengin şiddeti numunedeki MOTS-c düzeyleri ile ters orantılıdır.

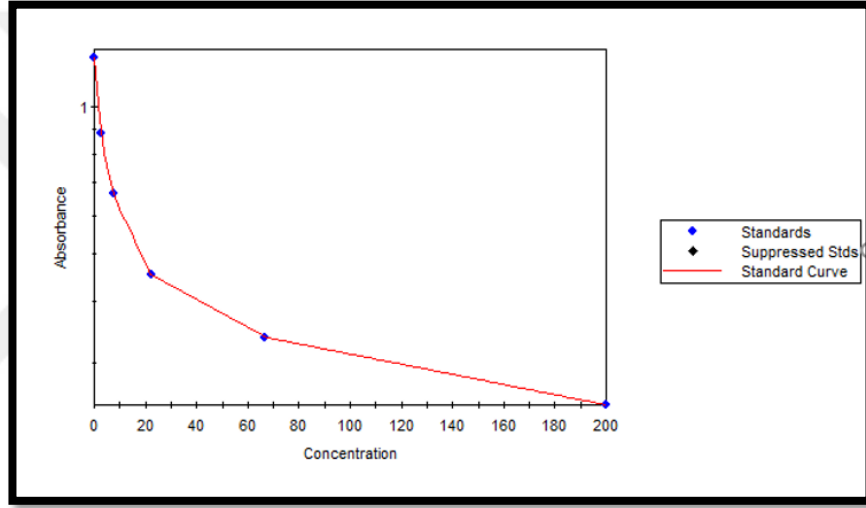
3.4.3.2. Kullanılan ayıraçlar

- Anti MOTS-c antikorlarıyla kaplı 96 kuyucuklu plak
- MOTS-c standart çözeltisi (2000ng/mL)
- Standart dilüsyon çözeltisi
- Avidin-HRP çözeltisi A
- Avidin-HRP çözeltisi B
- Durdurma Çözeltisi
- TMB Substrat Çözeltisi
- Konsatre yıkama tamponu
- Yıkama çözeltisi

3.4.3.3. Testin yapılışı

1. Örnekler ve ayıraçlar oda ısısına getirildi. Örnek belirtilen oranda, PBS ile seyreltildi.
2. Standart çözelti hazırlanıp seri seyreltmeler yapıldı.
3. Plak kuyucuklarının 50şer μ L standarttan ve örnekten eklendi. Daha sonra kör kuyucuğu hariç her kuyucuğa 100 μ L streptavidin-HRP A eklendi. Plağın üstü kapatılıp 37° C’de 60 dakika inkübe edildi.
4. Kuyucuklar otomatik yıkayıcıda 1 kez yıkandı, 2 dakika beklendi. Bu işlem 2 kez daha tekrarlandı.
5. Her kuyucuğa her kuyucuğa 100 μ L streptavidin-HRP B çözeltisi eklendi.
6. Karanlıkta 37 ° C’de 30 dakika inkübe edildi.

7. Kuyucuklar 5 kez yıkandı.
8. 90 µL TMB Substrat Çözeltisi her kuyucuğa eklendi.
9. Karanlıkta 37 ° C’de 15 dakika inkübe edildi.
10. 50 µL durdurma çözeltisi her kuyucuğa eklendi.
11. 450 nm dalga boyunda absorbands ölçümü yapıldı.
12. Standart eğrisi oluşturuldu.
13. Örneklerin konsantrasyonları ng/ml cinsinden hesaplandı (Kcjunior v1.41.8)



Şekil 16: MOTS-c Standart Eğrisi

3.4.4. Plazma Humanin düzeyinin tayini

Plazma Humanin düzeyinin tayininde ELISA (Enzyme Linked İmmunabsorbent Assay) yöntemi kullanıldı. (Human Humanin ELISA Kit, Bioassay Technology Laboratory, Katalog Numarası: E4823Hu; çalışma içi %CV: 8, çalışmalar arası %CV: 10)

3.4.4.1. Yöntemin prensibi

Yöntem, ELISA prensibine dayanmaktadır. Plaklar önceden insan HN'ine spesifik antikorla kaplanmıştır. Hasta örneklerinde bulunan Humanin

kuyucuklardaki spesifik antikorlara bağlanır. Daha sonra biotinle işaretlenmiş antikorlar eklenir ve örnekten gelen Humanin'e bağlanırlar. Böylece antikor-antijen-antikor sandviç kompleksi oluşur. Streptavidin-HRP işaretli antikorlar ortama eklenir ve biotinle işaretlenmiş olan antikorlara bağlanır. Kuluçka süresinden sonra yıkama yapılarak ortamdaki bağlanmamış Streptavidin-HRP uzaklaştırılır. Substrat çözeltisi eklenerek gerçekleşen enzim-substrat reaksiyonu sonucu oluşan sarı rengin yoğunluğu, plakta bağlanan Humanin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Asidik durdurma çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulur. 450nm'de absorbans değerleri ölçülür.

3.4.4.2. Kullanılan ayıraçlar

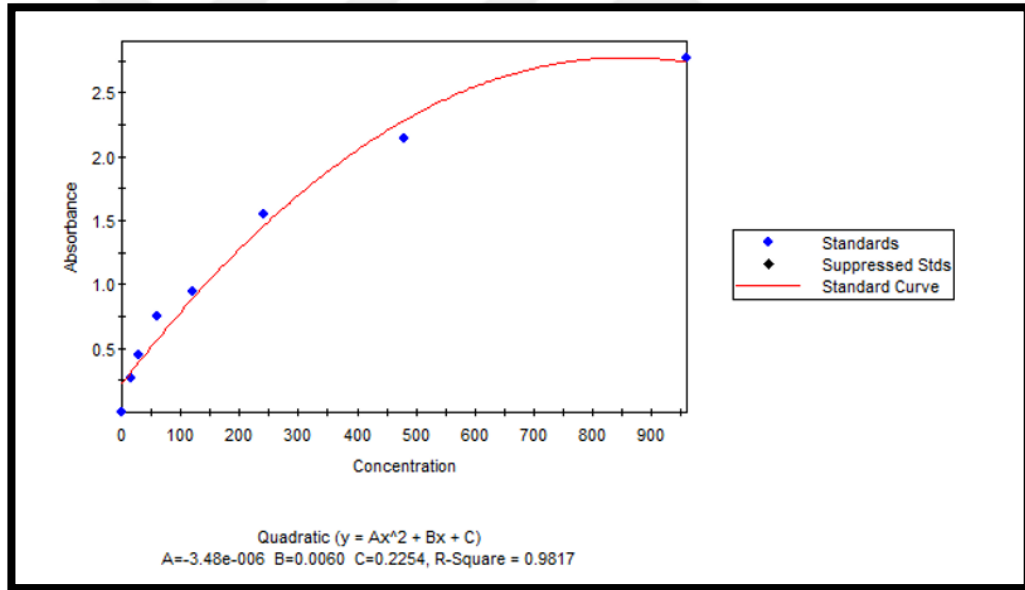
- Anti Humanin antikorlarıyla kaplı 96 kuyucuklu plak
- Humanin standart çözeltisi (1920 ng/L)
- Standart dilüsyon çözeltisi
- Streptavidin-HRP çözeltisi
- Durdurma Çözeltisi
- Substrat Çözeltisi A
- Substrat Çözeltisi B
- Konsatre yıkama tamponu
- Biotinle işaretli Humanin antikor çözeltisi
- Yıkama çözeltisi

3.4.4.3. Testin yapılışı

1. Örnekler ve ayıraçlar oda ısısına getirildi.
2. Standart çözelti hazırlanıp seri seyreltmeler yapıldı.
3. Plak kuyucuklarının ilk 16 tanesine standarttan 50şer µL eklendi, geri kalan kuyucuklara 40 µL örnek ve 10 µL anti-Humanin antikorı eklendi. Daha

sonra kör kuyucuğu hariç her kuyucuğa 50 µL streptavidin-HRP eklendi. Plağın üstü kapatılıp 37° C’de 60 dakika inkübe edildi.

4. Kuyucuklar otomatik yıkayıcıda 5 kez yıkandı.
5. Her kuyucuğa ilk önce 50 µL substrat A, daha sonra 50 µL substrat B çözeltisi eklendi.
6. Karanlıkta 37 ° C’de 10 dakika inkübe edildi.
7. 50 µL durdurma çözeltisi her kuyucuğa eklendi. 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı.
8. Standart eğrisi oluşturuldu.
9. Örneklerin konsantrasyonları ng/L cinsinden hesaplandı.



Şekil 17: Humanin Standart Eğrisi

3.4.5. Plazma Endoglin düzeyinin tayini

Plazma Endoglin düzeyinin tayininde ELISA (Enzyme Linked İmmunabsorbent Assay) yöntemi kullanıldı. (Human Endoglin ELISA Kit, Bioassay Technology Laboratory, Katalog Numarası: E3407Hu; çalışma içi %CV: 8, çalışmalar arası %CV: 10)

3.4.5.1. Yöntemin prensibi

Yöntem, ELISA prensibine dayanmaktadır. Plaklar önceden insan endogline spesifik antikorla kaplanmıştır. Hasta örneklerinde bulunan endoglin kuyucuklardaki spesifik antikora bağlanır. Daha sonra biotinle işaretlenmiş antikolar eklenir ve örnekten gelen endogline bağlanırlar. Böylece antikor-antijen-antikor sandviç kompleksi oluşur. Streptavidin-HRP işaretli antikorlar ortama eklenir ve biotinle işaretlenmiş olan antikora bağlanır. Kuluçka süresinden sonra yıkama yapılarak ortamdaki bağlanmamış Streptavidin-HRP uzaklaştırılır. Substrat çözeltisi eklenerek gerçekleşen enzim-substrat reaksiyonu sonucu oluşan sarı rengin yoğunluğu, plakta bağlanan Endoglin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Asidik durdurma çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulur. 450nm’de absorbans değerleri ölçülür.

3.4.5.2. Kullanılan ayraçlar

- Anti Endoglin antikorlarıyla kaplı 96 kuyucuklu plak
- Endoglin standart çözeltisi (80ng/ml)
- Standart dilüsyon çözeltisi
- Streptavidin-HRP çözeltisi
- Durdurma Çözeltisi
- Substrat Çözeltisi A
- Substrat Çözeltisi B
- Konsatre yıkama tamponu
- Biotinle işaretli Endoglin antikor çözeltisi
- Yıkama çözeltisi

3.4.5.3. Testin yapılışı

1.Örnekler ve ayraçlar oda ısısına getirildi.

2.Standart çözelti hazırlanıp seri seyreltmeler yapıldı.

3.Plak kuyucuklarının ilk 16 tanesine standarttan 50şer µL eklendi, geri kalan kuyucuklara 40 µL örnek ve 10 µL anti-endoglin antikoru eklendi.Daha sonra kör kuyucuğu hariç her kuyucuğa 50 µL streptavidin-HRP eklendi. Plağın üstü kapatılıp 37° C’de 60 dakika inkübe edildi.

4.Kuyucuklar otomatik yıkayıcıda 5 kez yıkandı.

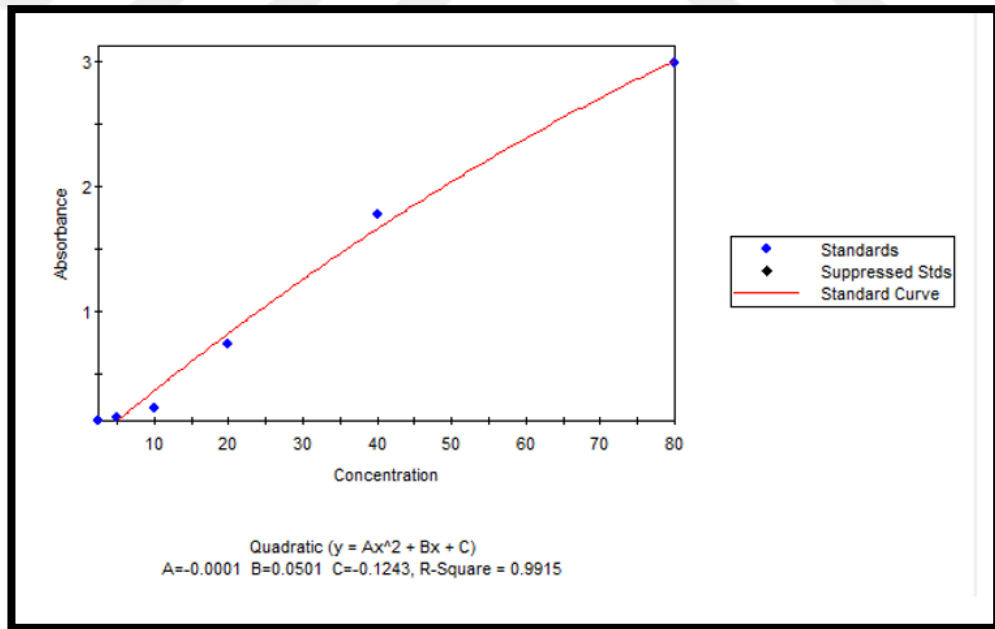
5.Her kuyucuğa ilk önce 50 µL substrat A, daha sonra 50 µL substrat B çözeltisi eklendi.

6.Karanlıkta 37 ° C’de 10 dakika inkübe edildi.

7.50 µL durdurma çözeltisi her kuyucuğa eklendi. 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı.

8.Standart eğrisi oluşturuldu.

9.Örneklerin konsantrasyonları ng/ml cinsinden hesaplandı.



Şekil 18: Endoglin Standart Eğrisi

3.5. İstatistiksel yöntemler

Tüm istatistiksel analizler, Statistical Package for the Social Sciences “SPSS” 26.0 programı kullanılarak yapıldı. Çalışmadaki sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak belirtildi. Verilerin normal dağılımı Kolmogrov-Smirnov testiyle değerlendirildi. Normal dağılım göstermeyen verilerin logaritması alınarak parametrik testlerin değerlendirmesine uygun hale çevrildi. Gruplar arası kıyaslama student t testi ile yapıldı. Çoklu grup testi kıyaslaması Analysis of variance (ANOVA) ile yapıldı. Nonparametrik karşılaştırmalar için ki-kare testi kullanıldı. Korelasyon analizleri Pearson analizi ile yapıldı. Sonuçlar % 95 güven aralığında, istatistiksel anlamlılık $p<0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Demografik özellikler ve rutin laboratuvar parametreleri

Kontrol ve preeklampsi gruplarının genel özellikleri ile rutin laboratuvar sonuçları ortalama ve standart sapma olarak **Tablo 7**'da verilmiştir.

Tablo 7: Demografik Özellikler ve Rutin Laboratuvar Verileri

	KONTROL	PREEKLAMPSİ	p değeri ³
n (Erken/Geç)	30 (15/15)	50 (25/25)	ad
Yaş (yıl)	27,4±4,6	28,4±5,3	ad
VKİ (kg/m²)	28,8±5,1	30,1±3,7	ad
Sistolik Tansiyon (mmHg)	109,3±13,7	155,6±14,3	<0,001
Diastolik Tansiyon (mmHg)	70,1±11,8	99,8±10,2	<0,001
Gebelik Haftası (hafta)	32,2±4,8	32,2±5,1	ad
Doğum Haftası (hafta)	38,3±1,5	34,2±4,5	<0,001
Total Protein(g/dL)	6,5±0,51	6,3±0,7	ad
Albumin(g/dL)	3,6±0,2	3,3±0,4	<0,005
İdrarda Protein(g/gün)	0,09±0,3	2,2±0,9	<0,001
Fetal Kilo (g)	3296,7±440,7	2071,2±1047	<0,001

³ Preeklampsi ve kontrol gruplarının karşılaştırması p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

ad: Anlamlı değil

VKİ: Vücut kütle indeksi

- Preeklampsi ve kontrol gruplarının yaş ortalamaları karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı.
- Preeklampsi ve kontrol gruplarının VKİ ortalamaları karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı.
- Preeklampsi grubunun sistolik ve diastolik tansiyon değerleri kontrol grubundan anlamlı yüksek bulundu ($p < 0,001$).
- Preeklampsi ve kontrol grupları arasında gebelik haftası açısından anlamlı farklılık gözlemlenmedi.
- Preeklampsi grubunun doğum haftası, kontrol grubundan anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0,001$).
- Preeklampsi ve kontrol gruplarının total protein düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı.
- Preeklampsi grubunun albümin düzeyleri, kontrol grubundan anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0,005$).
- Preeklampsi grubunun idrar protein düzeyleri, kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0,001$).
- Preeklampsi grubunda fetal kilo düzeyleri, kontrol grubundan anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0,001$).

Kontrol ve preeklampsi alt gruplarının genel özellikleri ile rutin laboratuvar sonuçları, ortalama ve standart sapma olarak **Tablo 8**'de verilmiştir.

Tablo 8: Kontrol ve preeklampsi alt gruplarının genel özellikleri ve rutin laboratuvar sonuçları (Ort±SD)

	EPK	GPK	EP	GP
n	15	15	30	30
Yaş (yıl)	27,9±3,2	26,9±5,7	29,8±27,1	27,1±5,8
VKİ (kg/m²)	27,3±4,9	30,3±5	29,2±4,3	31±2,8
Sistolik Tansiyon (mmHg)	105,6±11,4	113,1±15	158,3±13,3*	153±14,9*
Diastolik Tansiyon (mmHg)	68,1±8,4	72,1±14,4	103,5±10,2*	96,2±9,1*
Gebelik Haftası (hafta)	27,9±2,8	36,4±1,5*	27,9±3,3	36,6±1,73*
Doğum Haftası (hafta)	38±1,4	38,4±1,6	30,4±3,8*	37,6±1,4
Total Protein(g/dL)	6,7±0,7	6,5±0,4	6,5±0,7	6,1±0,5
Albumin(g/dL)	3,8±0,3	3,5±0,1	3,4±0,4	3,3±0,4
İdrarda Protein(g/gün)	0,1±0,3	0,1±0,3	2,4±1	2,1±0,9
Fetal Kilo (g)	3067±492,6	3373,2±411,3	1212,6±656,9	2861,2±628,2

Preeklampsi alt grupları birbirleriyle ve kontrol alt grupları karşılaştırıldığında;

- EPK, GPK, EP ve GP gruplarının yaş ve VKİ ortalamaları arasında anlamlı fark görülmedi.
- * Sistolik tansiyon değerleri EP ve GP gruplarında, kontrol gruplarından anlamlı olarak yüksek bulundu (her ikisi için $p<0,001$). EP ve GP grupları arasında anlamlı farklılık bulunmadı.
- * Diastolik tansiyon değerleri EP ve GP gruplarında, kontrol gruplarından anlamlı olarak yüksek bulundu (her ikisi için $p<0,001$). EP ve GP grupları arasında anlamlı farklılık bulunmadı.
- * Doğum haftası EP grubu için GP, EPK ve GPK gruplarından anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,001$). GP, EPK ve GPK grupları arasında anlamlı farklılık bulunmadı.
- Total protein ve albümin düzeyleri açısından gruplar arası anlamlı fark bulunmadı.
- * Gebelik haftası GP ve GPK gruplarında EP ve EPK gruplarına göre anlamlı yüksek bulundu (her biri için $p<0,001$). GP ve GPK grupları arasında anlamlı fark bulunmadı. EP ve EPK grupları arasında anlamlı fark bulunmadı.

4.2.Plazma Endoglin, VPO1, MOTS-c, Humanin ve miR-200c düzeyleri

Grupların plazma endoglin, VPO1, HN ve MOTS-c düzeylerinin ortalama ve standart sapmaları **Tablo 9** ve **Tablo 10**'da görülmektedir.

Tablo 9: Endoglin, VPO1, Humanin, MOTS-c ve miR-200c düzeylerinin ortalama ve standart sapmaları

	KONTROL	PREEKLAMPSİ
Endoglin (ng/mL)	11,8±7,35	18,5±17*
VPO1 (ng/mL)	2,9±1,9	5,1±5,6*
MOTS-c (ng/mL)	1241,5±1949,7	1028,1±1842,8†
Humanin (ng/L)	118±228,1	116,3±209,9
miR-200c ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)	0,12±0,08	0,17±0,12*

- * Preeklampsia grubunda kontrol grubuna göre endoglin ve VPO1 düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu (her ikisi için de $p<0,05$).
- † MOTS-c düzeyleri preeklampsia grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı ($p<0,05$).
- Humanin düzeylerinde preeklampsia ve kontrol grupları arasında anlamlı fark saptanmadı.
- * Preeklampsia grubunda kontrol grubuna göre, miR-200c ekspresyon düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$).

Tablo 10: Alt grupların Endoglin, VPO1, Humanin, MOTS-c ve miR-200c düzeylerinin ortalama ve standart sapmaları

	KONTROL		PREEKLAMPSİ	
	EPK	GPK	EP	GP
Endoglin (ng/ml)	15,6±8,9	8,1±1,6	17,8±20,4	19,3±13,1*
VPO1 (ng/ml)	3,8±2,3	1,9±0,2	5±7,1	5,1±3,8*
Humanin (ng/L)	205,39±301	30,6±19,2	70,5±120,2*	162,16±266,8*
MOTS-c (ng/mL)	1386,8±2572,7	1096,3±1100	1503,1±2426	553±757,3†
miR-200c (2^{-ΔΔC_T})	0,12±0,08	0,11±0,07	0,14±0,13*	0,20±0,09**

EPK: Erken Preeklampsia Kontrol

GPK: Geç Preeklampsia Kontrol

EK: Erken Kontrol

GK: Geç Kontrol

- * Endoglin düzeyleri, EP ve GP grupları arası anlamlı fark göstermedi. EP ve EPK grupları arasında anlamlı fark saptanmadı. Endoglin düzeyleri ortalaması GP grubunda GPK grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu($p<0,01$).
- * VPO1 düzeyleri, EP ve GP gruplarında anlamlı fark göstermedi. EP ve EPK grupları arasında anlamlı fark saptanmadı. VPO1 düzeyleri ortalaması GP grubunda GPK grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı($p<0,01$).
- † MOTS-c düzeyleri, EP ve GP gruplarında anlamlı fark göstermedi. EP ve EPK grupları arası da anlamlı fark saptanmadı. MOTS-c düzeyleri ortalaması GP grubunda GPK grubuna göre anlamlı olarak düşük saptandı($p=0,02$).
- * Humanin düzeyleri, GP grubunda, EP ve GPK grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu(her ikisi için de $p<0,05$). EP grubu EPK grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,05$).
- * miR-200c düzeyleri, GP grubunda ve GPK grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu($p<0,01$). EP grubu, EPK grubuna göre anlamlı yüksek bulundu($p<0,05$).EPK ve GPK grupları arası anlamlı fark görülmedi. GP grubu EP grubuna göre anlamlı yüksek bulundu($p<0,05$).

4.3. miR-200c göreceli ekspresyonları

miRNA ekspresyonlarının göreceli olarak hesaplanması için $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanıldı. Her bir örnek ve referans için 2 kopya çalışıldı. Her örnek ve referans için elde edilen C_t değerlerinin ortalaması alındı. Referans olarak U6 snRNA kullanıldı. Her örneğin C_t değerinden, U6 C_t değeri çıkartılarak ΔC_t değeri bulundu. Her bir hastanın ΔC_t değerleri ilgili kontrol grubunun ortalama C_t değerinden çıkartılarak $\Delta\Delta C_t$ değerleri elde edildi. Hasta grubundaki miRNA ekspresyonunun kontrol grubuna göre kaç kat değiştiğini göstermek için $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri hesaplandı.

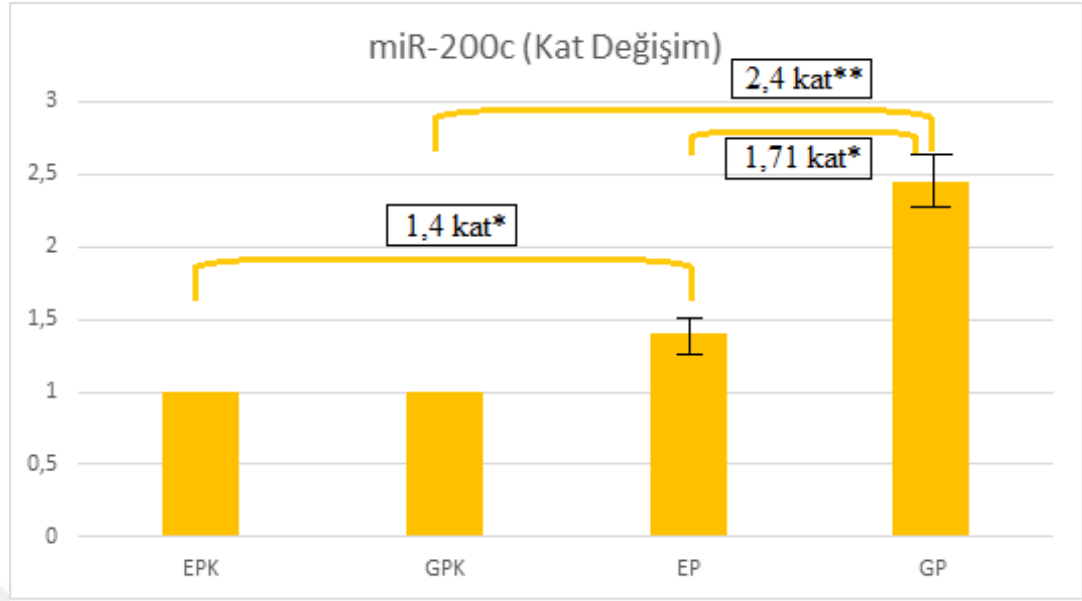
$$\Delta C_t \text{ Kontrol} = C_{t\text{Kontrolgrubu}} - C_{tU6}$$

$$\Delta C_t \text{ Preeklampsi} = C_{t\text{Preeklampsigrubu}} - C_{tU6}$$

$$2^{-\Delta C_t} = \text{Göreceli kat değişim formülü}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ Preeklampsi} - \Delta C_t \text{ Kontrol}$$

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = \text{Preeklampsi grubunun kontrol grubuna göreceli ekspresyon seviyelerini gösteren "kat değişim" formülü}$$



Şekil 19: miR-200c göreceli ekspresyon seviyeleri

*miR-200c düzeyleri geç preeklampsisi grubunda geç kontrol grubuna göre grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu(2,4 kat değişim, $p<0,01$). EP grubunda EPK grubuna göre anlamlı yükseklik saptandı (1,4 kat değişim, $p<0,05$). miR-200c seviyeleri GP grubunda EP grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (1,7 kat değişim, $p<0,05$) .Kat değişim verileri $2^{-\Delta\Delta C_T}$ yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

* $p<0,05$ ** $p<0,01$

4.3.1. Korelasyon Analizleri

Erken Preeklampsi Kontrol grubu ele alındığında;

- Endoglin düzeyleri ile VPO1 arasında pozitif yönde güçlü korelasyon saptanırken ($r=0,966$ $p<0,001$); MOTS-c, Humanin, miR-200c ve tansiyon değerleri ile korelasyonu saptanmadı.
- VPO1 düzeyleri ile MOTS-c, Humanin, miR-200c ve tansiyon değerleri ile korelasyonu saptanmadı.
- MOTS-c düzeyleri ile Humanin, miR-200c ve tansiyon değerleri ile korelasyonu saptanmadı.
- Humanin düzeyleri ile miR-200c ve tansiyon değerleri ile korelasyonu saptanmadı.
- miR-200c ile tansiyon değerleri arasında korelasyon bulunmadı.

Geç Preeklampsi Kontrol grubu ele alındığında;

- Endoglin düzeyleri ile VPO1 ve sistolik tansiyon değerleri arasında pozitif yönde güçlü korelasyon saptandı (sırasıyla $r=0,904$ $p<0,001$, $r=0,832$ $p<0,001$). Endoglin düzeyleri ile miR-200c düzeyleri arasında negatif korelasyon bulundu ($r=0,734$ $p=0,002$). Endoglin ile MOTS-c, Humanin ve diastolik tansiyon değerleri arasında korelasyon saptanmadı.
- VPO1 düzeyleri ile miR-200c, sistolik ve diastolik tansiyon değerleri arasında negatif yönde korelasyon saptandı ($r=-0,614$ $p=0,015$, $r=-0,845$ $p<0,001$, $r=-0,558$ $p=0,03$). MOTS-c, Humanin değerleri ile korelasyonu saptanmadı.
- MOTS-c düzeyleri ile Humanin, miR-200c ve tansiyon değerleri ile korelasyonu saptanmadı.
- Humanin düzeyleri ile sistolik tansiyon değerleri arasında orta düzeyde pozitif korelasyon saptandı ($r=0,517$ $p<0,05$). miR-200c ve diastolik tansiyon değerleri ile korelasyonu saptanmadı.

- miR-200c değerleri ile tansiyon değerleri arasında korelasyon bulunmadı.

Erken Preeklampsi grubu ele alındığında;

- Endoglin düzeyleri ile VPO1, Humanin ve ürik asit arasında pozitif yönde korelasyon saptanırken ($r=0,913$ $p<0,001$, $r=0,426$ $p=0,03$, $r=0,499$ $p=0,03$); MOTS-c, miR-200c, CRP, idrarda protein ve tansiyon değerleri ile korelasyon saptanmadı.
- VPO1 düzeyleri ile Humanin ve ürik asit düzeyleri pozitif yönde korele bulundu($r=0,415$ $p=0,03$, $r=0,433$ $p=0,03$). VPO1 düzeyleri ile MOTS-c, miR-200c, tansiyon değerleri, CRP ve idrarda protein düzeyleri ile korelasyon saptanmadı.
- MOTS-c düzeyleri ile Humanin, miR-200c, tansiyon değerleri, CRP, ürik asit ve idrarda protein ile korelasyon saptanmadı.
- Humanin düzeyleri ile ürik asit arasında pozitif korelasyon saptanırken ($r=0,419$ $p=0,03$) miR-200c, tansiyon değerleri, CRP ve idrarda protein düzeyleri ile korelasyon saptanmadı.
- miR-200c değerleri ile tansiyon değerleri, CRP, ürik asit ve idrarda protein düzeyleri arasında korelasyon saptanmadı.

Geç Preeklampsi grubu ele alındığında;

- Endoglin düzeyleri ile VPO1 ve Humanin düzeyleri arasında pozitif yönde korelasyon saptanırken ($r=0,979$ $p<0,001$, $r=0,456$ $p=0,02$); MOTS-c, miR-200c, CRP, ürik asit idrarda protein ve tansiyon değerleri ile korelasyon saptanmadı.
- VPO1 düzeyleri ile Humanin düzeyleri arasında pozitif yönde korelasyon saptanırken ($r=0,453$ $p=0,02$); MOTS-c, miR-200c, tansiyon değerleri, CRP, ürik asit ve idrarda protein düzeyleri ile korelasyon saptanmadı.

- MOTS-c düzeyleri ile ürik asit düzeyleri arasında negatif yönde korelasyon saptandı ($r=-0,786$ $p<0,001$), Humanin, miR-200c, tansiyon değerleri, CRP, ve idrarda protein düzeyleri ile korelasyon bulunmadı.
- Humanin düzeyleri ile miR-200c, tansiyon değerleri, CRP, ürik asit ve idrarda protein ile korelasyon bulunmadı.
- miR-200c değerleri ile tansiyon değerleri, CRP, ürik asit ve idrarda protein ile korelasyon bulunmadı.
- İdrarda protein düzeyleri ile sistolik tansiyon, diastolik tansiyon, CRP düzeyleri pozitif yönde korele bulundu ($r=0,530$ $p<0,01$, $r=0,573$ $p<0,01$, $r=0,482$ $p<0,05$).

Tüm Kontrol grubu ele alındığında;

- Endoglin düzeyleri ile VPO1 arasında pozitif yönde korelasyon saptanırken ($r=0,96$ $p<0,001$); ürik asit düzeyleri ile negatif yönde korelasyon bulundu ($r=-0,417$ $p<0,05$). MOTS-c, Humanin, miR-200c ve tansiyon değerleri ile korelasyon saptanmadı.
- VPO1 düzeyleri ile MOTS-c, Humanin, miR-200c ve tansiyon değerleri ile korelasyonu saptanmadı.
- MOTS-c düzeyleri ile Humanin, miR-200c ve tansiyon değerleri ile korelasyonu saptanmadı.
- Humanin düzeyleri ile miR-200c ve tansiyon değerleri ile korelasyonu saptanmadı.
- miR-200c ile tansiyon değerleri arasında korelasyon bulunmadı.

Tüm Preeklampsia grubu ele alındığında;

- Endoglin düzeyleri ile VPO1, Humanin ve ürik asit arasında pozitif yönde korelasyon saptanırken ($r=0,943$ $p<0,001$, $r=0,421$ $p<0,01$, $r=0,314$ $p=0,02$);

MOTS-c, miR-200c, CRP, idrarda protein ve tansiyon değerleri ile korelasyon saptanmadı.

- VPO1 düzeyleri ile Humanin ve ürik asit düzeyleri pozitif yönde korele bulundu($r=0,41$ $p<0,01$, $r=0,314$ $p=0,02$). VPO1 düzeyleri ile MOTS-c, miR-200c, tansiyon değerleri, CRP ve idrarda protein düzeyleri ile korelasyon saptanmadı.

- MOTS-c düzeyleri ile ürik asit ve CRP düzeyleri arasında negatif yönde korelasyon saptandı ($r=-0,653$ $p<0,001$, $r=-0,310$ $p<0,05$).Humanin, miR-200c, tansiyon değerleri ve idrarda protein düzeyleri ile korelasyon bulunmadı.

- Humanin düzeyleri ile miR-200c, tansiyon değerleri, CRP, ürik asit ve idrarda protein ile korelasyon bulunmadı.

- miR-200c değerleri ile ürik asit değerleri arasında pozitif yönde korelasyon saptanırken ($r=0,416$ $p<0,01$) tansiyon değerleri, CRP ve idrarda protein düzeyleri ile korelasyon saptanmadı.

- İdrarda protein düzeyleri ile sistolik tansiyon ve diastolik tansiyon düzeyleri pozitif yönde korele bulundu($r=0,30$ $p<0,05$, $r=0,423$ $p<0,01$). Ürik asit düzeyleri ile diastolik tansiyon düzeyleri arasında pozitif yönde korelasyon saptandı($r=0,342$ $p=0,016$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Preeklampsi, hipertansiyon ve proteinüri ile karakterize, gebeliğin 20. haftasından sonra görülen, sistemik bir hastalıktır(1). Tüm gebeliklerin %5'ine preeklampsi eşlik eder(2). Gelişmiş ülkelerde anne ölümlerinin %16'sı hipertansif bozukluklardan kaynaklanmaktadır. Preeklampsi, dünyada ve ülkemizde maternal morbidite ve mortalitenin önde gelen sebeplerinden biridir(4). Gebelikte preeklampsi gelişimine yol açan mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Preeklampsinin kesin tedavisi doğum ile plasentanın çıkartılmasıdır. Preeklampsinin etyopatogenezinde başta endotelyal disfonksiyonu ve plasental hipoperfüzyon olmak üzere pek çok etken suçlanmaktadır (5–21). Preeklampsideki patofizyolojik değişiklikler ilk trimesterden itibaren mevcutken semptomlar son trimesterde ortaya çıkar. Ancak hastalığın erken tanı, tedavi veya izleminde kullanılabilecek biyobelirteçlere ihtiyaç vardır. Bu sebeple, bu tez çalışmasında preeklampsinin patofizyolojisinde rol oynayabileceği düşünülen endoglin, MOTS-c, Humanin, VPO1 ve miR-200c tedavi almamış gebelerde araştırıldı. Çalışmamızda bulgularımız tanı haftalarına göre; erken preeklampitik ve geç preeklampitik grup olarak değerlendirildi.

Çalışmamızda Endoglin, VPO1 ve miR-200c düzeyleri, preeklampsi hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. MOTS-c düzeyleri preeklampsi hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Humanin düzeyleri ise preeklampsi hastalarında kontrol grubuna göre düşük bulunmasına rağmen aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

Endoglin TGF- β için bir koreseptördür ve vasküler endotel ve sinsitiyotrofoblastların hücre zarlarında yüksek miktarda eksprese edilir(149). Suda çözünebilen formu olan sEng (soluble endoglin) antianjiyojenik bir proteindir(149–151). PE patogenezinde, endotelyal disfonksiyonunda rol oynadığı düşünülmektedir. sEng, preeklampsi klinik bulgularının başlamasından 2-3 ay önce PE'li gebelerin serumlarında yükselir, hastalığın şiddeti ile koreledir ve doğumdan sonra düşer(149–151).

Çalışmamızda sEng seviyelerinin preeklampsi hastalarında yükseldiğini saptandı. Preeklampitik hastalarda hastalığın şiddetiyle ilişkili olduğu bilinen ürik

asit seviyelerinin sEng düzeyleri ile güçlü yönde pozitif korelasyon bulduk. Diğer çalışmalarla uygun bir şekilde sonuçlarımız artmış sEng seviyelerinin endotelial disfonksiyonla ilişkili olduğu görüşünü destekledi.

VPO1 hem grubu içeren, peroksidaz aktivitesi gösteren bir enzimdir(162). Bu enzim insan vücudunda başlıca endotelial hücrelerde, kalp ve düz kas hücrelerinde üretilir ve dolaşıma salınır. VPO1, fizyolojik koşullarda, güçlü bir oksidan olan hipokloröz asit (HOCl) üretimini katalize eder(163). VPO1 aktivitesinin veya ekspresyonunun artması gibi durumlara yol açan nedenler oksidatif hasara sebep olabilir. VPO1 aracılı oksidatif stresin kardiyovasküler hastalıklarda (hipertansiyon, pulmoner arteriyel hipertansiyon, miyokardiyal iskemi gibi) kilit rol oynayabileceği birçok çalışmada gösterilmiştir(164–166).

Liu ve ark. streptozotosin ile DM modeli oluşturulmuş sıçanlarda aort endotel dokusunda VPO1 sentezinin arttığını bildirmişlerdir. VPO1 inhibe edilen grupta yüksek glukoz ve H₂O₂ etkilerinin azaldığını, bu yüzden VPO1'in oksidatif stres ve enflamasyon kaynaklı endotel disfonksiyonunda rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ancak başka bir enflamasyon belirteci çalışmamışlardır(35).

Liu ve ark. VPO1 inhibe edilen farelerde MI sonrası kardiyak fibrozis oluşumunu gözlemlemişler, VPO1 inhibe edilen grupta fibrozis oluşumunun anlamlı olarak azaldığını, VPO1'in MI sonrası yeniden düzenlemede önemli bir rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir. Çalışmanın kısıtlamasının VPO1'in spesifik olarak kardiyak fibroblastlarda inhibe edilmesi yerine tüm vücutta inhibe edilmesi olduğunu belirtmişlerdir(164).

Bin ve ark (165) sıçanlarda pulmoner arter hipertansiyon modeli oluşturmuşlar, VPO1 ekspresyonunun arttığını gözlemlemişlerdir. Tedavi alan grupta VPO1 ekspresyonları ve H₂O₂ seviyelerinin azaldığını bildirmişlerdir.

Bai ve ark. (186) insan umbilikal ven endotelial hücre kültüründe okside-LDL aracılı apoptozis ve VPO1 ilişkisini araştırmayı amaçlamışlardır. VPO1 ve NADPH oksidaz inhibe edilen grupta okside-LDL'nin etkilerinin azaldığını bildirmişler, bu yüzden VPO1'in katalize ettiği HOCl'nin okside-LDL aracılı apoptoziste rol oynayabileceğini düşünmüşlerdir.

Çalışmamızda plazma VPO1 seviyelerinin preeklampsi hastalarında yükselmiş olduğunu saptadık. Kontrol, preeklampsi ve preeklampsi alt gruplarında VPO1 ile sEng arasında anlamlı korelasyon tespit edildi. VPO1 seviyeleri ile ürik asit seviyeleri arasında kontrol grubunda negatif korelasyon var iken preeklampsi grubunda pozitif korelasyon vardı. Preeklampsi referans moleküllerinden sEng ile korele bir şekilde VPO1 düzeylerinin artması, VPO1 düzeylerinin preeklampsi patogenezinde rol aldığını, özellikle HOC1 düzeylerini ve dolayısıyla da oksidatif stresi arttırarak endotel disfonksiyonuna katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Literatürdeki diğer çalışmaları destekler şekilde, sonuçlarımız VPO1 seviyelerinin endotel hasarının şiddetiyle ilişkili ve endotel disfonksiyonunun bir belirteci olabileceğini doğrulamıştır.

MOTS-c, mitokondriyal DNA'da (mtDNA) kodlanan, 16 aminoasitlik bir peptittir. Vazoendotelyal duvar başta olmak üzere birçok dokuda sentezlenir. Etkisini AMPK üzerinden gösterir. Direkt vazodilatör etkisi yoktur. MOTS-c, AMPK'yı uyararak eNOS aktivitesini arttırır, enflamasyonu ise baskılar. NO üretimini arttırarak endotelin vazodilatasyon yeteneğini iyileştirdiği, enflamasyonu baskılayarak enflamasyon aracılı hasara karşı koruyucu olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.

Ramanjaneya ve ark. çalışmalarında Tip 2 DM'li hastalarda (n:124) serum HN ve MOTS-c düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulmuşlardır. Serum HN ve MOTS-c düzeylerini yaş ve HbA1c düzeyleri ile negatif korele bulunmuştur. (187).

Wei ve ark. vasküler kalsifikasyon modeli oluşturulan farelerde MOTS-c tedavisi uygulanan grupta AMPK fosforilasyonunun arttığı, vasküler kalsifikasyon gelişiminin ise azaldığını bildirmişlerdir(188).

Du ve ark. 40 obez çocukta plazma MOTS-c düzeylerini değerlendirmişler, kontrol grubuna göre MOTS-c düzeylerinin daha düşük olduğunu bulmuşlardır(472.61±22.83 ve 561.64 ±19.19 ng/mL, p <0.01). Plazma MOTS-c düzeylerinin VKİ, HbA1c, açlık insülin düzeyleri ile negatif korele olduğunu belirtmişlerdir(183).

Qin ve ark. 40 anjina hastasında plazma MOTS-c ve HN düzeylerini çalışmışlar, endotel disfonksiyonu olan grupta (n:20) endotel fonksiyonu normal olan gruba (n:20) göre MOTS-c ve Humanin düzeylerini daha düşük bulmuşlardır (MOTS-c: 154.3 ± 29.8 vs 184.7 ± 37.9 pg/ml, $p = 0.007$ HN: 1.3 ± 1.1 vs 2.2 ± 1.5 ng/ml, $p < 0.05$). Humanin ve MOTS-c düzeyleri arasında korelasyon olmadığını, MOTS-c seviyelerinin mikrovasküler ve epikardiyal endotelial fonksiyon ile ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca MOTS-c'nin fare aort doku örneklerinde in vitro asetilkolin aracılı vazodilatasyonu kolaylaştırdığını göstermişlerdir(185).

Çalışmamızda MOTS-c'nin preeklampsisi grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük seviyelerde olduğu görüldü. MOTS-c seviyeleri ile ürik asit ve CRP arasında negatif yönde korelasyon saptandı. Preeklampsisi hastalarında MOTS-c düzeylerinin düşüklüğü, enflamasyonun artmasına, endotel sağlığı için anahtar bir molekül olan NO düzeylerinin azalmasına ve böylece de endotel fonksiyonun bozulmasına katkıda bulunabilir. Sonuçlarımız, endotel fonksiyon ile yapılan önceki çalışmalarla benzer şekilde, MOTS-c'nin endotel fonksiyon ile ilişkili olabileceğini desteklemiştir.

Humanin vasküler endotelde sentezlenen 24 aminoasitli bir polipeptittir. Sitokrom c salınımını inhibe ederek apoptozisi engellediği, hücreleri oksidatif stres ve hipoksiden koruduğu, antienflamatuvar etkili olduğu, kardiyovasküler ve nörodejenaratif hastalıklarda da gelecekte tedavi amaçlı kullanılabileceği düşünülmektedir(171). Preeklampitik plasenta trofoblastlarında kontrollere göre apoptozisin arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur, yeterli sayıda trofoblast spiral arterleri invaze edemezse arterler dar kalıp plasentanın hipoperfüzyonuna yol açabilir(174). Humanin, antiapoptotik etkisiyle preeklampside trofoblast sağ kalımını arttırabilir, bu sayede hipoperfüzyonu ve endotelial disfonksiyonu engelleyebilir. Ayrıca HN'in antienflamatuvar ve eNOS aktivitesini arttırıcı etkisiyle de endotel fonksiyonu koruyucu görev aldığını gösteren çalışmalar vardır.

Nikolakopoulos ve ark. preeklampitik hastalarda (n:37) serum humanin düzeylerini, kontrol grubuna göre yüksek bulmuşlardır(422.2 ± 33.5 ve 319.1 ± 28.1 pg/ml). Ancak bu çalışmada hastaların tedavi almaya başlayıp başlamadıkları belirtilmemiş, hastalarda endoglin ve sFlt-1 gibi önceden hastalıkla ilişkisi bilinen

bir parametre çalışılmamıştır. Çalışmanın kısıtlaması hasta sayısı azlığı, hastalar ve kontrollerin erken ve geç olarak alt gruplara ayrılmaması olarak belirtilmiştir(42).

Ma ve ark. gestasyonel diyabetes mellituslu gebelerde (n:84) sağlıklı gebelere göre serum HN düzeylerinin daha düşük olduğunu bulmuşlardır(209.13 ± 83.13 ve 293.65 ± 160.43 pg/ml)(189).

Widmer ve ark. koroner endotelial disfonksiyonu olan hastalarda (n:40) endotel fonksiyonu normal olan hastalara göre serum humanin düzeylerinin düşük (1.3 ± 1.1 vs. 2.2 ± 1.5 ng/ml) olduğunu bulmuşlardır(41).

Oh ve ark. HN'in endotel fonksiyonu koruyucu etkisi olabileceğini, aterosklerotik plak oluşumunu azaltabileceğini belirtmişlerdir. Bunun için ApoE-eksikliği olan farelere humaninin bir analogu olan HNGF6A tedavisi ve lipit zengin bir diyet uygulanmış, tedavi uygulanan grupta plak oluşumunun ve apoptozisin daha az olduğu, eNOS aktivitesinin daha yüksek olduğu bulunmuştur(40).

Muzumdar ve ark. myokardiyal iskemi-reperfüzyon modeli oluşturulan farelerde HN tedavisi uygulanan grupta infarkt alanının daha az olduğunu, AMPK ve eNOS fosforilasyonunu arttırdığını, myositlerde apoptozisi azalttığı bu yüzden akut myokard enfarktüsünün tedavisinde kullanılabilecek potansiyel bir molekül olduğunu belirtmişlerdir(175).

Sonuçlarımız Humanin seviyelerinin preeklampitik grupta kontrol grubundan anlamlı olarak farklı olmadığını gösterdi. Preeklampsi alt grupları kıyaslandığında GP grubu, GPK ve EP grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu, EP grubu EPK grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. HN düzeyleri EP grubunda sEng, VPO1 ve ürik asit düzeyleri ile, GP grubunda sEng ve VPO1 düzeyleri ile korele bulundu. Hastalığın daha şiddetli olan formu erken başlangıçlı preeklampsinin, geç başlangıçlı preeklampsiye göre daha yüksek maternal morbidite ve mortalite riski taşıdığı bilinmektedir. EP grubunda HN düzeylerinin düşüklüğü, endotelial disfonksiyonun şiddetlenmesine, GP grubunda ise HN'in endotel hasara karşı bir kompensasyon mekanizması olarak yükselmesi, hastalığın daha hafif seyretmesine katkıda bulunuyor olabilir. EP yerine GP tablosunun görülmesine neden olabilir. Hipoperfüzyon sonrası HN yükselmesi gerçekleşmiyor veya düşüyorsa, HN'in

antiapoptotik ve eNOS aktivitesinin arttırılmasıyla sağlanan endotel fonksiyon koruyucu etkisinin azalması EP tablosunun ortaya çıkışı ile ilgili olabilir.

MikroRNA'lar 20-22 nükleotid uzunluğunda, küçük kodlanmayan RNA molekülleridir. Genlerin posttranskripsiyonel olarak düzenlenmesinde görev alırlar. miR-200c, miR-200 ailesi'nin (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-429) bir üyesidir. miR-200c'nin proliferasyon, hücre döngüsü kontrolü, apoptoz, invazyon ve kanser metastazında ve diğer hastalıklarda da diğer önemli işlevlere sahip olduğu düşünülmektedir. miR-200c, hipoksiyi düzenlemede önemli rol oynayan HIF-1 α 'yı azaltır. miR-200c ekspresyonu arttıkça hipoksiye karşı verilen yanıt zayıflar. Oksidatif stres miR-200c'nin upregülasyonunu sağlar, upregüle olan miR200c ZEB1 molekülünü inhibe ederek endotelial hücrelerin apoptozunu uyarır(27). Oksidatif stres ile artan miR-200c'nin, endotelde eNOS düzenlenmesini bozduğunu, NO azalmasına ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmasına neden olduğu gösterilmiştir(157). miR-200c'nin endotel hasarında rol oynayabileceğini gösteren bir çok çalışma mevcuttur.

Pineles ve ark. preeklampsili hastaların plasenta örneklerinde (n:18) 157 tane miRNA ekspresyonunu değerlendirmişler, 7 miRNA'nın kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı eksprese edildiğini bulmuşlardır($p<0,01$ kat değişim >2). Bu miRNA'lardan bir tanesi de miR-200c ile aynı aileden olan miR-200b'dir. miR-200b'nin ekspresyonunun arttığı veya azaldığı bilgisini vermemişlerdir(153).

Zhang ve ark. preeklampsisi modeli oluşturdıkları sıçanlarda miR-200c ve plasental trofoblastların apoptozisi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. miR-200c seviyeleri ve apoptozis oranları preeklamptik grupta kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur(161).

Mouillet ve ark. fetal gelişme geriliği olan gebelerde(n:14) hipoksi ile ilişkili miRNA düzeylerini sağlıklı gebelerle karşılaştıran (n:14) bir çalışma yapmışlardır. İlk olarak hipoksi ile ilişki miRNA'ların düzeyleri gebe olmayan kadınlarla gebeler arasında karşılaştırılmış, miR-200c'nin gebelikte değişmediğini bildirmişlerdir. Sağlıklı gebelerle fetal gelişme geriliği olan gebeleri karşılaştırdıklarında plazma miRNA'ları tek tek değerlendirdiklerinde anlamlı bir fark olmadığını, grup olarak değerlendirdiklerinde 1.8 kat artış olduğunu bildirmişlerdir. Plazma örneklerinin

aksine plasenta örneklerinde miRNA düzeylerinin %24 azaldığını, plazma ve plasenta miRNA'ları arasında negatif yönde korelasyon olduğunu bulmuşlardır(26).

Magenta ve ark. insan umbilikal ven endotelyal hücre kültürünü H₂O₂'ye maruz bırakmışlar, miR-200c ekspresyon seviyelerinin 8 kat arttığını bildirmişlerdir. miR-200c'nin hipoksi aracılı apoptozisi ZEB1 proteinini downregüle ederek uyardığını ileri sürmüşlerdir(27). Magenta ve ark. başka bir çalışmalarında psöriazis hastalarının (n=29) plazma ve doku örneklerinde miR-200c düzeylerini kıyaslamışlar, plazma miR-200c seviyelerinin kontrole 2.5 kat arttığını, lezyon olan bölgeden alınan dokularda lezyon olmayan bölgeden alınan dokulara ve sağlıklı kontrole göre anlamlı artış olduğunu bildirmişlerdir(190).

Hu ve ark. sağlıklı ve preeklampitik gebelerin (n:23 ve n:19) plasentalarından elde ettikleri hücre kültürlerinde VEGF üretimi ve miR-200c arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. miR-200c inhibitörü kullanılan grupta VEGF mRNA'sı ve proteini yükselirken miR-200c mimiği kullanılan grupta azaldığı gözlemlenmiştir(159).

Carlomosti ve ark. insan umbilikal ven endotelyal hücre kültürünü 8, 16, 24 saat boyunca 200 µM H₂O₂'ye maruz bırakmışlar, miR-200c ekspresyon seviyelerinin arttığını (16saatlik grupta 30kat değişim) bildirmişlerdir. Aynı hücrelerde eNOS, SIRT1, FOXO1 mRNA ve protein seviyelerinin azaldığını ifade etmişlerdir. Lentivirüs ile miR-200c aşırı eksprese eden endotelyal hücrelerde eNOS, SIRT1, FOXO1'in azaldığını desteklemişler, miR-200c inhibitörü verilen hücrelerde ise eNOS, SIRT1, FOXO1'in hafifçe arttığını bulmuşlardır. ROS ile artan miR-200c'nin SIRT1-FOXO1-eNOS arasındaki döngüyü bozarak NO üretimini azalttığını ileri sürmüşlerdir(28).

Magenta ve ark. karotis endarterektomisi yapılan 22 hastanın karotis plaklarından miR-200c düzeylerini çalışmışlardır. miR-200c düzeylerinin karotis plaklarında kontrollere göre anlamlı olarak arttığını (2.12±0.23 kat değişim) ifade etmişlerdir. Stabil (n=10) ve anstabil (n=12) plak grupları ayrı ayrı incelendiğinde stabil grupta 1.46±0.15 kat, anstabil grupta 2,66±0.33 kat artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca 22 aterosklerotik plak hastasının plazma miR-200c düzeylerini 19 kontrol ile karşılaştırmışlar, hasta grubunda miR-200c seviyelerinin

kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulunduğunu ifade etmişler ancak kaç kat değiştiğini belirtmemişlerdir. Preop., postop 1. gün ve postop. 30. gün miR-200c seviyeleri karşılaştırıldığında; postop. 1. Gün anlamlı olarak azaldığı, 30. günde ise preop. seviyelerinden anlamlı bir fark olmadığını belirtmişlerdir. Postop 30.gün, stabil plak grubunda anlamlı olarak azalma olduğu, stabil ve anstabil gruplar arasında anlamlı fark oluştuğunu gözlemlemişlerdir(158).

miR-200c, VEGF'yi hedef alarak mRNA ve protein seviyelerini değiştirdiği, preeklampitik grupta miR-200c ekspresyonlarının artarak VEGF düzeylerini azaltabileceği belirtilmiştir(159).miR-200c'in FOXO1 asetilasyonunu artırarak Mn-SOD aktivitesini azaltabileceği ve bu şekilde süperoksit radikallerinin ve peroksinitritin oluşumunu tetikleyebileceği böylece NO biyoyararlanımını azaltabileceği düşünülmektedir(157). miR-200c'nin hem ROS ile indükleniyor olması hem de ROS artışına sebep olması preeklampsi etyopatogenezine katkıda bulunuyor olabilir.Çalışmamızda miR-200c seviyelerinin preeklampsi hastalarında kontrol grubuna göre artmış olduğunu saptadık.miR-200c düzeyleri ürik asit düzeyleri ile korele bulundu. Önceki çalışmalarla benzer şekilde, çalışmamız miR-200c'nin, ROS düzeylerini artırarak veya VEGF'yi ve NO düzeylerini azaltarak veya biyoyararlanımını düşürerek endotel disfonksiyonunda rol oynayabileceğini doğrulamıştır.

Yapılan çalışmalar genel olarak değerlendirildiğinde, çalışmaların benzer kısıtlamaları olduğu görülmektedir. Bunlar hasta sayısı, hastaların tıbbi tedavilerinin ve kullandıkları ilaçların dikkate alınmaması, örnek alınan gebelik haftasının gözardı edilmesi, ölçümlerin tek sefer yapılmış olmasıdır

Çalışmamızın kısıtlılıkları; endotel fonksiyon ile ilişkili NO, eNOS aktivitesi, HIF-1 α gibi parametrelerin ölçülmesiyle desteklenmemesi, hasta sayısı azlığı ve ölçümlerin tek sefer yapılmış olmasıdır. Hastaların preeklampsi tedavisine başlanılmadan serum ve plazmalarının alınmış olması, homojen alt gruplarımız çalışmamızın güçlü yönleridir.

Çalışmamızın sonuçları, preeklampitik hastalardaki endotel disfonksiyona VPO1 ile miR-200c düzeylerinin artışının ve Humanin ile MOTS-c düzeylerinin ise

azalışının katkıda bulunabileceğini ve bu değişimlerin hastalık patogenezi ve şiddetiyle ilişkili olabileceğini destekler niteliktedir.



8. KAYNAKLAR

1. American College of Obstetricians, Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2013;122(5):1122–31.
2. Abalos E, Cuesta C, Grosso AL, Chou D, Say L. Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: A systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* [Internet]. 2013;170(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2013.05.005>
3. Ananth C V, Keyes KM, Wapner RJ. Pre-eclampsia rates in the United States, 1980-2010: age-period-cohort analysis. *Bmj.* 2013;347:f6564.
4. Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gulmezoglu AM, Van Look PF. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet.* 2006/04/04. 2006;367(9516):1066–74.
5. Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype: One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest.* 1997;99(9):2152–64.
6. Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: Challenging the current hypothesis. *Hypertension.* 2008;51(4 PART 2 SUPPL.):970–5.
7. Klonoff Cohen HS, Savitz DA, Cefalo RC, Mccann MF. An Epidemiologic Study of Contraception and Preeclampsia. *JAMA J Am Med Assoc.* 1989;262(22):3143–7.
8. Mills JL, Klebanoff MA, Graubard BII, Carey JC, Berendes HW. Barrier Contraceptive Methods and Preeclampsia. *JAMA J Am Med Assoc.* 1991;265(1):70–3.
9. Lachmeijer AM, Dekker GA, Pals G, Aarnoudse JG, ten Kate LP, Arngrimsson R. Searching for preeclampsia genes: the current position. *Eur J Obs Gynecol Reprod Biol.* 2002/10/17. 2002;105(2):94–113.
10. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science (80-).* 2005/06/11. 2005;308(5728):1592–4.
11. Germain SJ, Sacks GP, Sooranna SR, Sargent IL, Redman CW. Systemic inflammatory

- priming in normal pregnancy and preeclampsia: the role of circulating syncytiotrophoblast microparticles. *J Immunol*. 2007/04/20. 2007;178(9):5949–56.
12. Granger JP, Alexander BT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of pregnancy-induced hypertension. *Am J Hypertens*. 2001/06/20. 2001;14(6 Pt 2):178s-185s.
 13. Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obs Gynecol*. 1999/02/13. 1999;180(2 Pt 1):499–506.
 14. Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest*. 1997/05/01. 1997;99(9):2152–64.
 15. Makris A, Thornton C, Thompson J, Thomson S, Martin R, Ogle R, et al. Uteroplacental ischemia results in proteinuric hypertension and elevated sFLT-1. *Kidney Int*. 2007/03/23. 2007;71(10):977–84.
 16. Wang X, Athayde N, Trudinger B. A proinflammatory cytokine response is present in the fetal placental vasculature in placental insufficiency. *Am J Obs Gynecol*. 2003/11/25. 2003;189(5):1445–51.
 17. Maynard S, Epstein FH, Karumanchi SA. Preeclampsia and angiogenic imbalance. *Annu Rev Med*. 2007/10/17. 2008;59:61–78.
 18. Robillard PY, Hulsey TC, Perianin J, Janky E, Miri EH, Papiernik E. Association of pregnancy-induced hypertension with duration of sexual cohabitation before conception. *Lancet*. 1994/10/08. 1994;344(8928):973–5.
 19. Wang JX, Knottnerus AM, Schuit G, Norman RJ, Chan A, Dekker GA. Surgically obtained sperm, and risk of gestational hypertension and pre-eclampsia. *Lancet*. 2002;359(9307):673–4.
 20. Einarsson JI, Sangi-Haghpeykar H, Gardner MO. Sperm exposure and development of preeclampsia. *Am J Obs Gynecol*. 2003/05/16. 2003;188(5):1241–3.
 21. Smith GN, Walker M, Tessier JL, Millar KG. Increased incidence of preeclampsia in women conceiving by intrauterine insemination with donor versus partner sperm for treatment of primary infertility. *Am J Obs Gynecol*. 1997/08/01. 1997;177(2):455–8.

22. Mackay AP, Berg CJ, Atrash HK. Pregnancy-related mortality from preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol.* 2001;97(4):533–8.
23. Roberts JM, Taylor RN, Goldfien A. Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia. *Am J Hypertens.* 1991/08/01. 1991;4(8):700–8.
24. Zeisler H, Llurba E, Chantraine F, Vatish M, Staff AC, Sennström M, et al. Predictive value of the sFlt-1:PIGF ratio in women with suspected preeclampsia. *N Engl J Med.* 2016;374(1):13–22.
25. Pineles BL, Romero R, Montenegro D, Tarca AL, Han YM, Kim YM, et al. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196(3):261.e1-261.e6.
26. Mouillet JF, Chu T, Hubel CA, Nelson DM, Parks WT, Sadovsky Y. The levels of hypoxia-regulated microRNAs in plasma of pregnant women with fetal growth restriction. *Placenta* [Internet]. 2010;31(9):781–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2010.07.001>
27. Magenta A, Cencioni C, Fasanaro P, Zaccagnini G, Greco S, Sarra-Ferraris G, et al. MiR-200c is upregulated by oxidative stress and induces endothelial cell apoptosis and senescence via ZEB1 inhibition. *Cell Death Differ.* 2011;18(10):1628–39.
28. Carlomosti F, D’Agostino M, Beji S, Torcinaro A, Rizzi R, Zaccagnini G, et al. Oxidative Stress-Induced miR-200c Disrupts the Regulatory Loop among SIRT1, FOXO1, and eNOS. *Antioxidants Redox Signal.* 2017;27(6):328–44.
29. Cheng G, Salerno JC, Cao Z, Pagano PJ, Lambeth JD. Identification and characterization of VPO1, a new animal heme-containing peroxidase. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2008;45(12):1682–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.009>
30. Li H, Cao Z, Zhang G, Thannickal VJ, Cheng G. Vascular peroxidase 1 catalyzes the formation of hypohalous acids: Characterization of its substrate specificity and enzymatic properties. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2012;53(10):1954–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.597>

31. Zhang YZ, Wang L, Zhang JJ, Xiong XM, Zhang D, Tang XM, et al. Vascular peroxide 1 promotes ox-LDL-induced programmed necrosis in endothelial cells through a mechanism involving β -catenin signaling. *Atherosclerosis* [Internet]. 2018;274:128–38. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.04.031>
32. Liu B, Luo XJ, Yang ZB, Zhang JJ, Li TB, Zhang XJ, et al. Inhibition of NOX/VPO1 pathway and inflammatory reaction by trimethoxystilbene in prevention of cardiovascular remodeling in hypoxia-induced pulmonary hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2014;63(6):567–76.
33. Bai YP, Hu CP, Yuan Q, Peng J, Shi RZ, Yang TL, et al. Role of VPO1, a newly identified heme-containing peroxidase, in ox-LDL induced endothelial cell apoptosis. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2011;51(8):1492–500. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.07.004>
34. Yang L, Bai Y, Li N, Hu C, Peng J, Cheng G, et al. Vascular VPO1 expression is related to the endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2013;439(4):511–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.09.012>
35. Liu SY, Yuan Q, Li XH, Hu CP, Hu R, Zhang GG, et al. Role of vascular peroxidase 1 in senescence of endothelial cells in diabetes rats. *Int J Cardiol*. 2015/07/05. 2015;197:182–91.
36. Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, Yasukawa T, Sudo H, Ito Y, et al. A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and A β . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(11):6336–41.
37. Yen K, Lee C, Mehta H, Cohen P. The emerging role of the mitochondrial-derived peptide humanin in stress resistance. *J Mol Endocrinol*. 2013;50(1):1–15.
38. Bachar AR, Scheffer L, Schroeder AS, Nakamura HK, Cobb LJ, Oh YK, et al. Humanin is expressed in human vascular walls and has a cytoprotective effect against oxidized LDL-induced oxidative stress. *Cardiovasc Res*. 2010;88(2):360–6.
39. Lee C, Wan J, Miyazaki B, Fang Y, Guevara-Aguirre J, Yen K, et al. IGF-I regulates the age-dependent signaling peptide humanin. *Aging Cell*. 2014;13(5):958–61.

40. Oh YK, Bachar AR, Zacharias DG, Kim SG, Wan J, Cobb LJ, et al. Humanin preserves endothelial function and prevents atherosclerotic plaque progression in hypercholesterolemic ApoE deficient mice. *Atherosclerosis* [Internet]. 2011;219(1):65–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.06.038>
41. Widmer RJ, Flammer AJ, Herrmann J, Rodriguez-Porcel M, Wan J, Cohen P, et al. Circulating humanin levels are associated with preserved coronary endothelial function. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2013;304(3):393–7.
42. Nikolakopoulos P, Tzimagiorgis G, Goulis DG, Chatzopoulou F, Zepiridis L, Vavilis D. Serum humanin concentrations in women with pre-eclampsia compared to women with uncomplicated pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2017/01/24. 2018;31(3):305–11.
43. Qin Q, Delrio S, Wan J, Jay Widmer R, Cohen P, Lerman LO, et al. Downregulation of circulating MOTS-c levels in patients with coronary endothelial dysfunction. *Int J Cardiol* [Internet]. 2018;254:23–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.12.001>
44. Grindheim G, Estensen ME, Langesaeter E, Rosseland LA, Toska K. Changes in blood pressure during healthy pregnancy: A longitudinal cohort study. *J Hypertens*. 2012;30(2):342–50.
45. ACOG. ACOG Practice Bulletin Clinical Management Guidelines for Obstetrician Gynecologists. Gestational Hypertension and Preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 2020;135(6):e237–60.
46. Payne B, Magee LA, Von Dadelszen P. Assessment, surveillance and prognosis in pre-eclampsia. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* [Internet]. 2011;25(4):449–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2011.02.003>
47. Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, Roberts J, Sibai BM, Steyn W, et al. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens*. 2014;4(2):97–104.
48. Nugent CE, Punch MR, Barr M, LeBlanc L, Johnson MP, Evans MI. Persistence of partial molar placenta and severe preeclampsia after selective termination in a twin pregnancy. *Obstet Gynecol*. 1996;87(5 PART 2):829–31.

49. Ditisheim A, Sibai B, Tatevian N. Placental Findings in Postpartum Preeclampsia: A Comparative Retrospective Study. *Am J Perinatol*. 2019;31266066.
50. Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: Implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod*. 2003;69(1):1–7.
51. Pijnenborg R, Vercruysse L, Hanssens M. The Uterine Spiral Arteries In Human Pregnancy: Facts and Controversies. *Placenta*. 2006;27(9–10):939–58.
52. Pritchard, JA M. No Title. In: *Williams Obstetrics*. 16th Editi. New York: McGraw Hill; 1980. p. 25.
53. Zhou Y, Damsky CH, Chiu K, Roberts JM, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J Clin Invest*. 1993;91(3):950–60.
54. Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, MCFadyen IR, van Asshe A. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 1994;101(8):669–74.
55. Uptodate. Abnormal placentation in preeclampsia [Internet]. 2020. Available from: [https://www.uptodate.com/contents/image?imageKey=OBGYN%2F89125&topicKey=OBGYN%2F6760&search=preeclampsia pathophysiology&source=outline_link&selectedTitle=1~150](https://www.uptodate.com/contents/image?imageKey=OBGYN%2F89125&topicKey=OBGYN%2F6760&search=preeclampsia%20pathophysiology&source=outline_link&selectedTitle=1~150)
56. Brosens I, Pijnenborg R, Vercruysse L, Romero R. The “great Obstetrical Syndromes” are associated with disorders of deep placentation. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2011;204(3):193–201. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2010.08.009>
57. Ilekis J V., Reddy UM, Roberts JM. Review article: Preeclampsia - A pressing problem: An executive summary of a national institute of child health and human development workshop. *Reprod Sci*. 2007;14(6):508–23.
58. Lim KH, Zhou Y, Janatpour M, McMaster M, Bass K, Chun SH, et al. Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre- eclampsia. *Am J Pathol*. 1997;151(6):1809–18.
59. Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human

- cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype: One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest*. 1997;99(9):2152–64.
60. Dekker GA. Risk factors for preeclampsia. *Clin Obstet Gynecol* [Internet]. 1999 Sep;42(3):422–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10451762>
 61. Mastrobattista JM, Skupski DW, Monga M, Blanco JD, August P. The rate of severe preeclampsia is increased in triplet as compared to twin gestations. *Am J Perinatol*. 1997;14(5):263–5.
 62. Palmer SK, Moore LG, Young DA, Cregger B, Berman JC, Zamudio S. Altered blood pressure course during normal pregnancy and increased preeclampsia at high altitude (3100 meters) in Colorado. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;180(5):1161–8.
 63. Gerretsen G, Huisjes HJ, Elema JD. Morphological Changes of the Spiral Arteries in the Placentae Bed in Relation To Pre-Eclampsia and Fetal Growth Retardation. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 1981;88(9):876–81.
 64. De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. The ultrastructure of acute atherosclerosis in hypertensive pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1975;123(2):164–74. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378\(75\)90522-0](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378(75)90522-0)
 65. Salafia CM, Pezzullo JC, Ghidini A, Lopèz-Zeno JA, Whittington SS. Clinical correlations of patterns of placental pathology in preterm pre-eclampsia. *Placenta*. 1998;19(1):67–72.
 66. Walker JJ. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2000;356(9237):1260–5.
 67. Redman CWG, Sargent IL. Preeclampsia and the systemic inflammatory response. *Semin Nephrol*. 2004;24(6 SPEC.ISS.):565–70.
 68. Garrido-Gomez T, Dominguez F, Quiñonero A, Diaz-Gimeno P, Kapidzic M, Gormley M, et al. Defective decidualization during and after severe preeclampsia reveals a possible maternal contribution to the etiology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(40):E8468–77.
 69. Rabaglino MB, Conrad KP. Evidence for shared molecular pathways of dysregulated decidualization in preeclampsia and endometrial disorders revealed by microarray data integration. *FASEB J*. 2019;33(11):11682–95.
 70. Sahu MB, Deepak V, Gonzales SK, Rimawi B, Watkins KK, Smith AK, et al. Decidual cells

- from women with preeclampsia exhibit inadequate decidualization and reduced sFlt1 suppression. *Pregnancy Hypertens* [Internet]. 2019;15(November 2018):64–71. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2018.11.003>
71. Saftlas AF, Rubenstein L, Prater K, Harland KK, Field E, Triche EW. Cumulative exposure to paternal seminal fluid prior to conception and subsequent risk of preeclampsia. *J Reprod Immunol* [Internet]. 2014;101–102(1):104–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2013.07.006>
 72. Klonoff-Cohen HS, Savitz DA, Cefalo RC, McCann MF. An epidemiologic study of contraception and preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv*. 1991;46(6):349–51.
 73. Einarsson JI, Sangi-Haghpeykar H, Gardner MO. Sperm exposure and development of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;188(5):1241–3.
 74. Koelman CA, Coumans ABC, Nijman HW, Doxiadis IIN, Dekker GA, Claas FHJ. Correlation between oral sex and a low incidence of preeclampsia: A role for soluble HLA in seminal fluid? *J Reprod Immunol*. 2000;46(2):155–66.
 75. Giannakou K, Evangelou E, Papatheodorou SI. Genetic and non-genetic risk factors for pre-eclampsia: umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2018;51(6):720–30.
 76. Masoudian P, Nasr A, De Nanassy J, Fung-Kee-Fung K, Bainbridge SA, El Demellawy D. Oocyte donation pregnancies and the risk of preeclampsia or gestational hypertension: A systematic review and metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2016;214(3):328–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2015.11.020>
 77. Gleicher N. Why much of the pathophysiology of preeclampsia-eclampsia must be of an autoimmune nature. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2007;196(1):5.e1-5.e7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2006.09.016>
 78. Loke YW, King A. Immunology of implantation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* [Internet]. 2000 Oct;14(5):827–37. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521693400901226>
 79. Huang SJ, Chen CP, Schatz F, Rahman M, Abrahams VM, Lockwood CJ. Pre-eclampsia is associated with dendritic cell recruitment into the uterine decidua. *J Pathol*.

2008;214(3):328–36.

80. Dechend R, Müller DN, Wallukat G, Homuth V, Krause M, Dudenhausen J, et al. AT1 receptor agonistic antibodies, hypertension, and preeclampsia. *Semin Nephrol.* 2004;24(6 SPEC.ISS.):571–9.
81. Xia Y, Wen H, Bobst S, Day MC, Kellems RE. Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human trophoblast cells. *J Soc Gynecol Investig.* 2003;10(2):82–93.
82. Thway TM, Shlykov SG, Day MC, Sanborn BM, Gilstrap LC, Xia Y, et al. Antibodies from preeclamptic patients stimulate increased intracellular Ca²⁺ mobilization through angiotensin receptor activation. *Circulation.* 2004;110(12):1612–9.
83. Dechend R, Homuth V, Wallukat G, Kreuzer J, Park JK, Theuer J, et al. AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients cause vascular cells to express tissue factor. *Circulation.* 2000;101(20):2382–7.
84. Hiby SE, Walker JJ, O’Shaughnessy KM, Redman CWG, Carrington M, Trowsdale J, et al. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med.* 2004;200(8):957–65.
85. Cincotta RB, Brennecke SP. Family history of pre-eclampsia as a predictor for pre-eclampsia in primigravidas. *Int J Gynecol Obstet.* 1998;60(1):23–7.
86. Skjærven R, Vatten LJ, Wilcox AJ, Rønning T, Irgens LM, Lie RT. Recurrence of pre-eclampsia across generations: Exploring fetal and maternal genetic components in a population based cohort. *Br Med J.* 2005;331(7521):877–9.
87. Cnattingius S, Reilly M, Pawitan Y, Lichtenstein P. Maternal and fetal genetic factors account for most of familial aggregation of preeclampsia: A population-based swedish cohort study. *Am J Med Genet.* 2004;130 A(4):365–71.
88. Lachmeijer AMA, Arngrímsson R, Bastiaans EJ, Frigge ML, Pals G, Sigurdardóttir S, et al. A genome-wide scan for preeclampsia in the Netherlands. *Eur J Hum Genet.* 2001;9(10):758–64.
89. Moses EK, Lade JA, Guo G, Wilton AN, Grehan M, Freed K, et al. A genome scan in families from Australia and New Zealand confirms the presence of a maternal susceptibility locus

- for pre-eclampsia, on chromosome 2. *Am J Hum Genet.* 2000;67(6):1581–5.
90. Arngrímsson R, Sigurðardóttir S, Frigge ML, Bjarnadóttir RI, Jónsson T, Stefánsson H, et al. A genome-wide scan reveals a maternal susceptibility locus for pre-eclampsia on chromosome 2p13. *Hum Mol Genet.* 1999;8(9):1799–805.
 91. England TN. *Journal Medicine.* 2001;344(12):867–72.
 92. Van Dijk M, Mulders J, Poutsma A, Könst AAM, Lachmeijer AMA, Dekker GA, et al. Maternal segregation of the Dutch preeclampsia locus at 10q22 with a new member of the winged helix gene family. *Nat Genet.* 2005;37(5):514–9.
 93. Treloar SA, Cooper DW, Brennecke SP, Grehan MM, Martin NG. An Australian twin study of the genetic basis of preeclampsia and eclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184(3):374–81.
 94. Bdolah Y, Palomaki GE, Yaron Y, Bdolah-Abram T, Goldman M, Levine RJ, et al. Circulating angiogenic proteins in trisomy 13. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194(1):239–45.
 95. Zera CA, Seely EW, Wilkins-Haug LE, Lim KH, Parry SI, McElrath TF. The association of body mass index with serum angiogenic markers in normal and abnormal pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2014;211(3):247.e1-247.e7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2014.03.020>
 96. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* (80-). 2005;308(5728):1592–4.
 97. Hartley JDR, Ferguson BJ, Moffett A. The role of shed placental DNA in the systemic inflammatory syndrome of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2015;213(3):268–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2015.03.026>
 98. Germain SJ, Sacks GP, Soorana SR, Sargent IL, Redman CW. Systemic Inflammatory Priming in Normal Pregnancy and Preeclampsia: The Role of Circulating Syncytiotrophoblast Microparticles. *J Immunol.* 2007;178(9):5949–56.
 99. Levine RJ, Qian C, Leshane ES, Yu KF, England LJ, Schisterman EF, et al. Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190(3):707–13.

100. Rajakumar A, Cerdeira AS, Rana S, Zsengeller Z, Edmunds L, Jeyabalan A, et al. Transcriptionally active syncytial aggregates in the maternal circulation may contribute to circulating soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia. *Hypertension*. 2012;59(2):256–64.
101. Tannetta DS, Dragovic RA, Gardiner C, Redman CW, Sargent IL. Characterisation of Syncytiotrophoblast Vesicles in Normal Pregnancy and Pre-Eclampsia: Expression of Flt-1 and Endoglin. *PLoS One*. 2013;8(2).
102. Granger JP, Alexander BT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of Pregnancy-Induced Hypertension. 2001;178–85.
103. Quitterer U, Fu X, Pohl A, Bayoumy KM, Langer A, AbdAlla S. Beta-Arrestin1 Prevents Preeclampsia by Downregulation of Mechanosensitive AT1-B2 Receptor Heteromers. *Cell* [Internet]. 2019;176(1–2):318–333.e19. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.050>
104. AbdAlla S, Lothar H, El Massiery A, Quitterer U. Increased AT1 receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med*. 2001;7(9):1003–9.
105. Zhou CC, Zhang Y, Irani RA, Zhang H, Mi T, Popek EJ, et al. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice. *Nat Med*. 2008;14(8):855–62.
106. Wenzel K, Rajakumar A, Haase H, Geusens N, Hubner N, Schulz H, et al. Angiotensin II type 1 receptor antibodies and increased angiotensin II sensitivity in pregnant rats. *Hypertension*. 2011;58(1):77–84.
107. Kim MY, Buyon JP, Guerra MM, Rana S, Zhang D, Laskin CA, et al. Angiogenic factor imbalance early in pregnancy predicts adverse outcomes in patients with lupus and antiphospholipid antibodies: Results of the PROMISSE study. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2016;214(1):108.e1–108.e14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2015.09.066>
108. Buyon JP, Kim MY, Guerra MM, Laskin CA, Petri M, Lockshin MD, et al. Predictors of pregnancy outcomes in patients with lupus: A cohort study. *Ann Intern Med*. 2015;163(3):153–63.

109. Girardi G, Berman J, Redecha P, Spruce L, Thurman JM, Kraus D, et al. Complement C5a receptors and neutrophils mediate fetal injury in the antiphospholipid syndrome. *J Clin Invest.* 2003;112(11):1644–54.
110. Cohen D, Buurma A, Goemaere NN, Girardi G, Le Cessie S, Scherjon S, et al. Classical complement activation as a footprint for murine and human antiphospholipid antibody-induced fetal loss. *J Pathol.* 2011;225(4):502–11.
111. Burwick RM, Fichorova RN, Dawood HY, Yamamoto HS, Feinberg BB. Urinary excretion of C5b-9 in severe preeclampsia tipping the balance of complement activation in pregnancy. *Hypertension.* 2013;62(6):1040–5.
112. Guseh SH, Feinberg BB, Dawood HY, Yamamoto HS, Fichorova RN, Burwick RM. Urinary excretion of C5b-9 is associated with the anti-angiogenic state in severe preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2015;73(5):437–44.
113. Salmon JE, Heuser C, Triebwasser M, Liszewski MK, Kavanagh D, Roumenina L, et al. Mutations in complement regulatory proteins predispose to preeclampsia: A genetic analysis of the PROMISSE cohort. *PLoS Med.* 2011;8(3):1–9.
114. Friedman SA, Schiff E, Emeis JJ, Dekker GA, Sibai BM. Biochemical corroboration of endothelial involvement in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;172(1 PART 1):202–3.
115. Taylor RN, Crombleholme WR, Friedman SA, Jones LA, Casal DC, Roberts JM. High plasma cellular fibronectin levels correlate with biochemical and clinical features of preeclampsia but cannot be attributed to hypertension alone. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1991;165(4 PART 1):895–901. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378\(91\)90435-T](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378(91)90435-T)
116. Hsu CD, Iriye B, Johnson TRB, Witter FR, Hong SF, Chan DW. Elevated circulating thrombomodulin in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;169(1):148–9.
117. Roberts JM, Edep ME, Goldfien A, Taylor RN. Sera from preeclamptic women specifically activate human umbilical vein endothelial cells in vitro: morphological and biochemical evidence. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 1992;27(3–4):101–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1418401>

118. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*. 2002;20(21):4368–80.
119. Nash AD, Baca M, Wright C, Scotney PD. The biology of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B). *Pulm Pharmacol Ther*. 2006;19(1):61–9.
120. Karumanchi SA, Epstein FH. Placental ischemia and soluble fms-like tyrosine kinase 1: Cause or consequence of preeclampsia? *Kidney Int* [Internet]. 2007;71(10):959–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ki.5002281>
121. McKeeman GC, Ardill JES, Caldwell CM, Hunter AJ, McClure N. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFlt-1) is increased throughout gestation in patients who have preeclampsia develop. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191(4):1240–6.
122. Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, et al. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest*. 2003;111(5):707–16.
123. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating Angiogenic Factors and the Risk of Preeclampsia. *N Engl J Med*. 2004;350(7):672–83.
124. Tsatsaris V, Goffin F, Munaut C, Brichant JF, Pignon MR, Noel A, et al. Overexpression of the Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor in Preeclamptic Patients: Pathophysiological Consequences. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(11):5555–63.
125. Ahmad S, Ahmed A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ Res*. 2004;95(9):884–91.
126. Maynard SE, Min J, Merchan J, Lim K-H, Li J, Mondal S, et al. Excess Placental Soluble fms-like Hypertension , and Proteinuria in. *J Clin Invest* [Internet]. 2003;111(5):649–58. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/17189>
127. Koga K, Osuga Y, Yoshino O, Hirota Y, Ruimeng X, Hirata T, et al. Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) levels in women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(5):2348–51.
128. Chaiworapongsa T, Romero R, Espinoza J, Bujold E, Mee Kim Y, Gonçalves LF, et al. Evidence supporting a role for blockade of the vascular endothelial growth factor system

- in the pathophysiology of preeclampsia: Young Investigator Award. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190(6):1541–7.
129. Tjoa ML, Van Vugt JMG, Mulders MAM, Schutgens RBH, Oudejans CBM, Van Wijk IJ. Plasma placenta growth factor levels in midtrimester pregnancies. *Obstet Gynecol.* 2001;98(4):600–7.
 130. Taylor RN, Grimwood J, Taylor RS, McMaster MT, Fisher SJ, North RA. Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: Evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188(1):177–82.
 131. Thadhani R, Mutter WP, Wolf M, Levine RJ, Taylor RN, Sukhatme VP, et al. First Trimester Placental Growth Factor and Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase 1 and Risk for Preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(2):770–5.
 132. Polliotti BM, Fry AG, Saller DN, Mooney RA, Cox C, Miller RK. Second-trimester maternal serum placental growth factor and vascular endothelial growth factor for predicting severe, early-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2003;101(6):1266–74.
 133. Tidwell SC, Ho HN, Chiu WH, Torry RJ, Torry DS. Low maternal serum levels of placenta growth factor as an antecedent of clinical preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184(6):1267–72.
 134. Su YN, Lee CN, Cheng WF, Shau WY, Chow SN, Hsieh FJ. Decreased maternal serum placenta growth factor in early second trimester and preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2001;97(6):898–904.
 135. Chaiworapongsa T, Romero R, Korzeniewski SJ, Cortez JM, Pappas A, Tarca AL, et al. Plasma concentrations of angiogenic/anti-angiogenic factors have prognostic value in women presenting with suspected preeclampsia to the obstetrical triage area: A prospective study. *J Matern Neonatal Med.* 2014;27(2):132–44.
 136. Moore AG, Young H, Keller JM, Ojo LR, Yan J, Simas TAM, et al. Angiogenic biomarkers for prediction of maternal and neonatal complications in suspected preeclampsia. *J Matern Neonatal Med.* 2012;25(12):2651–7.
 137. Widmer M, Villar J, Benigni A, Conde-Agudelo A, Karumanchi SA, Lindheimer M. Mapping the theories of preeclampsia and the role of angiogenic factors: A systematic review.

Obstet Gynecol. 2007;109(1):168–80.

138. Hypothesis for the role of sFlt1 in preeclampsia [Internet]. 2020 [cited 2020 Aug 1]. Available from: https://www.uptodate.com/contents/image?imageKey=OBGYN%2F73060&topicKey=OBGYN%2F6760&search=preeklampsi&source=outline_link&selectedTitle=6~150&sp=0
139. Nagamatsu T, Fujii T, Kusumi M, Zou L, Yamashita T, Osuga Y, et al. Cytotrophoblasts up-regulate soluble Fms-like tyrosine kinase-1 expression under reduced oxygen: An implication for the placental vascular development and the pathophysiology of preeclampsia. *Endocrinology*. 2004;145(11):4838–45.
140. Bdolah Y, Lam C, Rajakumar A, Shivalingappa V, Mutter W, Sachs BP, et al. Twin pregnancy and the risk of preeclampsia: bigger placenta or relative ischemia? *Am J Obstet Gynecol*. 2008;198(4):428.e1-428.e6.
141. Burke SD, Zsengellér ZK, Khankin E V., Lo AS, Rajakumar A, DuPont JJ, et al. Soluble FMS-like Tyrosine Kinase 1 promotes angiotensin II sensitivity in preeclampsia. *J Clin Invest*. 2016;126(7):2561–74.
142. Rana S, Powe CE, Salahuddin S, Verlohren S, Perschel FH, Levine RJ, et al. Angiogenic factors and the risk of adverse outcomes in women with suspected preeclampsia. *Circulation*. 2012;125(7):911–9.
143. Thadhani R, Kisner T, Hagmann H, Bossung V, Noack S, Schaarschmidt W, et al. Pilot study of extracorporeal removal of soluble Fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia. *Circulation*. 2011;124(8):940–50.
144. Thadhani R, Hagmann H, Schaarschmidt W, Roth B, Cingoz T, Karumanchi SA, et al. Removal of soluble fms-like tyrosine kinase-1 by dextran sulfate apheresis in preeclampsia. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(3):903–13.
145. Rana S, Rajakumar A, Geahchan C, Salahuddin S, Cerdeira AS, Burke SD, et al. Ouabain inhibits placental sFlt1 production by repressing HSP27-dependent HIF-1 α pathway. *FASEB J*. 2014;28(10):4324–34.
146. Kumasawa K, Ikawa M, Kidoya H, Hasuwa H, Saito-Fujita T, Morioka Y, et al. Pravastatin induces placental growth factor (PGF) and ameliorates preeclampsia in a mouse model.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(4):1451–5.

147. Rolnik DL, Wright D, Poon LCY, Syngelaki A, O’Gorman N, de Paco Matallana C, et al. ASPRE trial: performance of screening for preterm pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. 2017 Oct;50(4):492–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28741785>
148. Li C, Raikwar NS, Santillan MK, Santillan DA, Thomas CP. Aspirin inhibits expression of sFLT1 from human cytotrophoblasts induced by hypoxia, via cyclo-oxygenase 1. *Placenta*. 2015;36(4):446–53.
149. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai JJ, Mammoto T, Kim YM, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med*. 2006;12(6):642–9.
150. Luft FC. Soluble endoglin (sEng) joins the soluble fms-like tyrosine kinase (sFlt) receptor as a pre-eclampsia molecule. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(11):3052–4.
151. Rouse DJ. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia: Commentary. *Obstet Gynecol Surv*. 2007;62(2):82–3.
152. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol*. 2019;234(5):5451–65.
153. Pineles BL, Romero R, Montenegro D, Tarca AL, Han YM, Kim YM, et al. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. *Am J Obs Gynecol* [Internet]. 2007;196(3):261.e1-261.e6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002937807000440>
154. Merve Mutlu, Özge Saatçi, Umar Raza, Erol Eyüpoglu, Emre Yurdusev ÖS. MIR200C (microRNA 200c) [Internet]. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. 2014 [cited 2020 Nov 4]. Available from: http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_MIR200C.html
155. Byun Y, Choi YC, Jeong Y, Lee G, Yoon S, Jeong Y, et al. MiR-200c downregulates HIF-1 α and inhibits migration of lung cancer cells. *Cell Mol Biol Lett*. 2019;24(1):1–14.
156. Noris M, Perico N, Remuzzi G. Mechanisms of disease: Pre-eclampsia. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2005;1(2):98–114.

157. Carlomosti F, D'Agostino M, Beji S, Torcinaro A, Rizzi R, Zaccagnini G, et al. Oxidative Stress-Induced miR-200c Disrupts the Regulatory Loop Among SIRT1, FOXO1, and eNOS. *Antioxid Redox Signal*. 2016/12/15. 2017;27(6):328–44.
158. Magenta A, Sileno S, D'Agostino M, Persiani F, Beji S, Paolini A, et al. Atherosclerotic plaque instability in carotid arteries: miR-200c as a promising biomarker. *Clin Sci*. 2018/11/06. 2018;
159. Hu TX, Wang G, Guo XJ, Sun QQ, He P, Gu H, et al. MiR 20a,-20b and -200c are involved in hydrogen sulfide stimulation of VEGF production in human placental trophoblasts. *Placenta* [Internet]. 2016;39:101–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2016.01.019>
160. Molnár, M, Söto T, Tóth T, Hertelendy F. Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1994 May;170(5):1458–66. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937813904889>
161. Zhang X, Ge YW, Wang ZX, Xu QL, Guo R, Xu HY. MiR-200c regulates apoptosis of placental trophoblasts in preeclampsia rats through Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23(17):7209–16.
162. Cheng G, Salerno JC, Cao Z, Pagano PJ, Lambeth JD. Identification and characterization of VPO1, a new animal heme-containing peroxidase. *Free Radic Biol Med*. 2008/10/22. 2008;45(12):1682–94.
163. Ma QL, Zhang GG, Peng J. Vascular peroxidase 1: A novel enzyme in promoting oxidative stress in cardiovascular system. *Trends Cardiovasc Med* [Internet]. 2013;23(5):179–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcm.2012.11.002>
164. Liu Z, Xu Q, Yang Q, Cao J, Wu C, Peng H, et al. Vascular peroxidase 1 is a novel regulator of cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Redox Biol* [Internet]. 2019;22(February):101151. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101151>
165. Wang EL, Jia MM, Luo FM, Li T, Peng JJ, Luo XJ, et al. Coordination between NADPH oxidase and vascular peroxidase 1 promotes dysfunctions of endothelial progenitor cells in hypoxia-induced pulmonary hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* [Internet].

- 2019;857(December 2018):172459. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172459>
166. Zhang YZ, Wang L, Zhang JJ, Xiong XM, Zhang D, Tang XM, et al. Vascular peroxide 1 promotes ox-LDL-induced programmed necrosis in endothelial cells through a mechanism involving beta-catenin signaling. *Atherosclerosis*. 2018/05/18. 2018;274:128–38.
 167. Ma QL, Zhang GG, Peng J. Vascular peroxidase 1: a novel enzyme in promoting oxidative stress in cardiovascular system. *Trends Cardiovasc Med*. 2013/01/30. 2013;23(5):179–83.
 168. Vile GF, Rothwell LA, Kettle AJ. Initiation of rapid, p53-dependent growth arrest in cultured human skin fibroblasts by reactive chlorine species. *Arch Biochem Biophys*. 2000;377(1):122–8.
 169. Taysi S, Tascan AS, Ugur MG, Demir M. Radicals, Oxidative/Nitrosative Stress and Preeclampsia. *Mini-Reviews Med Chem*. 2018;19(3):178–93.
 170. Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, Yasukawa T, Sudo H, Ito Y, et al. A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and A β . *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98(11):6336–41.
 171. Yen K, Lee C, Mehta H, Cohen P. The emerging role of the mitochondrial-derived peptide humanin in stress resistance. *J Mol Endocrinol*. 2013;50(1):R11–9.
 172. Lee C, Yen K, Cohen P. Humanin: A harbinger of mitochondrial-derived peptides? *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24(5):222–8.
 173. Nishimoto I, Matsuoka M, Niikura T. Unravelling the role of Humanin. *Trends Mol Med*. 2004;10(3):102–5.
 174. Allaire AD, Ballenger KA, Wells SR, McMahon MJ, Lessey BA. Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 2000;96(2):271–6.
 175. Muzumdar RH, Huffman DM, Calvert JW, Jha S, Weinberg Y, Cui L, et al. Acute humanin therapy attenuates myocardial ischemia and reperfusion injury in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2010 Oct;30(10):1940–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20651283>

176. Klein LE, Cui L, Gong Z, Su K, Muzumdar R. A humanin analog decreases oxidative stress and preserves mitochondrial integrity in cardiac myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2013;440(2):197–203. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.08.055>
177. Jin H, Liu T, Wang W-X, Xu J-H, Yang P-B, Lu H-X, et al. Protective effects of [Gly14]-Humanin on β -amyloid-induced PC12 cell death by preventing mitochondrial dysfunction. *Neurochem Int* [Internet]. 2010 Feb;56(3):417–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197018609003209>
178. Kariya S, Takahashi N, Hirano M, Ueno S. Humanin improves impaired metabolic activity and prolongs survival of serum-deprived human lymphocytes. *Mol Cell Biochem*. 2003;254(1–2):83–9.
179. Bachar AR, Scheffer L, Schroeder AS, Nakamura HK, Cobb LJ, Oh YK, et al. Humanin is expressed in human vascular walls and has a cytoprotective effect against oxidized LDL-induced oxidative stress. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2010 Nov 1;88(2):360–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20562421>
180. Lee C, Zeng J, Drew BG, Sallam T, Martin-Montalvo A, Wan J, et al. The mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance. *Cell Metab* [Internet]. 2015;21(3):443–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.02.009>
181. Kim KH, Son JM, Benayoun BA, Lee C. The Mitochondrial-Encoded Peptide MOTS-c Translocates to the Nucleus to Regulate Nuclear Gene Expression in Response to Metabolic Stress. *Cell Metab* [Internet]. 2018;28(3):516–524.e7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29983246>
182. Zhai D, Ye Z, Jiang Y, Xu C, Ruan B, Yang Y, et al. MOTS-c peptide increases survival and decreases bacterial load in mice infected with MRSA. *Mol Immunol* [Internet]. 2017;92(June):151–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.10.017>
183. Du C, Zhang C, Wu W, Liang Y, Wang A, Wu S, et al. Circulating MOTS-c levels are decreased in obese male children and adolescents and associated with insulin resistance. *Pediatr Diabetes* [Internet]. 2018 Apr 25; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29691953>

184. Lu H, Wei M, Zhai Y, Li Q, Ye Z, Wang L, et al. MOTS-c peptide regulates adipose homeostasis to prevent ovariectomy-induced metabolic dysfunction. *J Mol Med*. 2019;97(4):473–85.
185. Qin Q, Delrio S, Wan J, Jay Widmer R, Cohen P, Lerman LO, et al. Downregulation of circulating MOTS-c levels in patients with coronary endothelial dysfunction. *Int J Cardiol*. 2017/12/16. 2018;254:23–7.
186. Bai YP, Hu CP, Yuan Q, Peng J, Shi RZ, Yang TL, et al. Role of VPO1, a newly identified heme-containing peroxidase, in ox-LDL induced endothelial cell apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2011/08/09. 2011;51(8):1492–500.
187. Ramanjaneya M, Bettahi I, Jerobin J, Chandra P, Khalil CA, Skarulis M, et al. Mitochondrial-derived peptides are down regulated in diabetes subjects. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10(MAY):1–10.
188. Wei M, Gan L, Liu Z, Liu L, Chang JR, Yin DC, et al. Mitochondrial-Derived Peptide MOTS-c Attenuates Vascular Calcification and Secondary Myocardial Remodeling via Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase Signaling Pathway. *CardioRenal Med*. 2020;10(1):42–50.
189. Ma Y, Li S, Wei X, Huang J, Lai M, Wang N, et al. Comparison of serum concentrations of humanin in women with and without gestational diabetes mellitus. *Gynecol Endocrinol [Internet]*. 2018;34(12):1064–7. Available from: <https://doi.org/10.1080/09513590.2018.1482869>
190. Magenta A, D'Agostino M, Sileno S, Di Vito L, Uras C, Abeni D, et al. The Oxidative Stress-Induced miR-200c Is Upregulated in Psoriasis and Correlates with Disease Severity and Determinants of Cardiovascular Risk. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019(Lv).