

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PREEKLAMPTİK İNSAN PLASENTASINDAKİ 20Q
TERRA EKSPRESYON SEVİYELERİNİN
BELİRLENMESİ**

Eda ORHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2019-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PREEKLAMPTİK İNSAN PLASENTASINDAKİ 20Q
TERRA EKSPRESYON SEVİYELERİNİN
BELİRLENMESİ**

Eda ORHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Necdet DEMİR

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2017-2840 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2019-ANTALYA

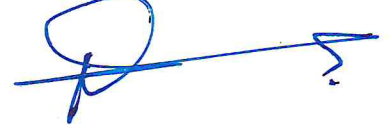
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

25 /01/2019

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Necdet DEMİR
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Saffet ÖZTÜRK
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Kanat GÜLLE
Süleyman Demirel Üniversitesi



Üye : Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Enes SÖZEN
Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi



Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

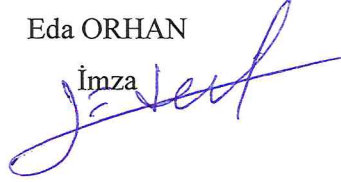
Prof. Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

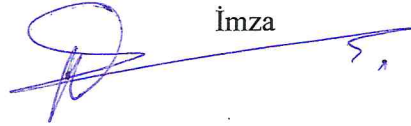
ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Eda ORHAN

İmza 

Prof. Dr. Necdet DEMİR

İmza 

TEŐEKKÜR

Eğitim hayatım boyunca desteğini esirgemeyen, bana inanan ve cesaretlendiren sevgili aileme en içten saygı, sevgi ve teŐekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve tecrübelerini hiçbir zaman esirgemeyen, tezimin planlanması, projelendirilmesi ve değerlendirilmesinde katkılarda bulunan danışman hocam Prof. Dr. Necdet DEMİR'e,

Bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yanımda olan ve tezimin planlanmasında, projelendirilmesinde ve değerlendirilmesinde katkılarda bulunan Dr. Esmâ KONUK'a,

Ders ve tez dönemim süresince bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren Akdeniz Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na

Bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne saygı, minnet ve teŐekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Telomerik tekrarların, kromozom bütünlüğünün korunmasında ve onarım mekanizmalarında görev aldığı bilinmektedir. TERRA transkriptleri ise telomerik bölgelerin korunmasında görevlidir. Preeklampside telomer boyunun kısaldığı yapılan bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Preeklampsideki bu telomer kısalmasının TERRA transkriptleri ile ilişkili olabileceğini düşündük ve “Preekleptik insan plasentasında 20q TERRA ekspresyon seviyesi değişir” hipotezini kurduk. Bu doğrultuda preekleptik insan plasentası ve sağlıklı insan plasentalarında 20q TERRA transkripsiyon seviyelerini inceledik.

Yöntem: Preekleptik insan plasentası (n=6) ve sağlıklı insan plasentası -kontrol- (n=6) olacak şekilde iki grup oluşturuldu. Örnekler, serum fizyolojik ile yıkandı. Her bir örnekten cDNA elde edilerek 20q TERRA transkriptlerinin seviyeleri kantitatif gerçek zamanlı polimarez zincir reaksiyonu (qRT-PCR) deneyi ile analiz edildi. Elde edilen veriler, GraphPad ile değerlendirildi. Ayrıca her örnekten alınan doku örnekleri için rutin parafin takibi yapıldı. Mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alınarak hematoksilin&eoziin boyaması yapıldı ve fotoğraflandı.

Bulgular: Preeklampsi grubunda 20q TERRA ekspresyon seviyesi, mRNA düzeyinde kontrol plasentaya göre artış gösterdi. Histolojik gözlemlerde preekleptik insan plasentadaki trofoblastik tomurcuklar yoğun olarak gözlemlenmiştir.

Sonuç: Preeklampsi grubunda TERRA ekspresyon seviyesi, kontrol grubuna göre artmıştır. Bu sonuçlar, preeklampside görülen telomer kısalmasının TERRA transkripsiyon seviyesinin artması sonucu olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Telomer, TERRA, Preeklampsi

ABSTRACT

Introduction: Telomeric repeats are known to be responsible for chromosome integrity preservation and restoration mechanism. TERRA transcripts are responsible for the conservation of telomeric margins. In preeclampsia, in some studies, telomere length is found to be shortened longitudinally. We anticipated that this telomere shortening in preeclampsia may be associated with TERRA transcripts and we have hypothesized that “In preeclamptic human placenta 20q TERRA expression level may undergo variation”. In that ground, in preeclamptic human placenta and healthy human placenta we explored the 20q TERRA transcription levels.

Material and Methods: Two cohorts were created corresponding to preeclamptic human placenta (n=6) and healthy human placenta-control- (n=6). Samples were immersed with serum physiologic. From each of the samples producing cDNA were transcription levels of 20q TERRA were analyzed via quantitative real time polymerase chain reaction (q RT-PCR) assay. The data investigated by GraphPad. From every sample for the obtained tissue samples, routine paraffine follow-up was performed. The 5µm sections were cut by using microtome, hematoxylin&eosin staining was done and photographed.

Result: In preeclampsia group, 20q TERRA expression level increased compared to the control placenta at mRNA level. Histological observations showed that trophoblastic buds in the preeclamptic human placenta were intensely observed.

Conclusion: In preeclampsia cohort, TERRA expression level increased in comparison with healthy decreased control group. These results indicate that telomere shortening seen in preeclampsia may be the result of increased TERRA transcription level.

Key words: Telomer, TERRA, Preeclampsia

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	
1.1. Telomerler	1
1.2. TERRA (Telomerik tekrar içeren RNA)	1
1.3. Gebelikte telomer ve TERRA	1
1.4. Preeklampsi	2
1.5. Preeklampside telomer ve TERRA	2
2. GENEL BİLGİLER	
2.1. Plasenta	3
2.1.1. Plasenta gelişimi	4
2.1.2. Plasental dolaşım	5
2.1.3. Plasentanın görevleri	7
2.2. Gebelik hipertansiyonu	7
2.3. Preeklampsi	8
2.4. Telomer	11
2.5. Telomerik tekrar içeren RNA (TERRA)	15
2.6. Gebelikte telomer	19

2.7. Gebelikte TERRA	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM	
3.1. Örneklerin elde edilmesi	21
3.2. Rutin parafin takibi	21
3.3. Hematoksilen&eoziin boyaması	22
3.4. Kantitatif gerçek zamanlı PCR (q RT-PCR) deneyi	23
3.4.1. Total RNA izolasyon basamakları	23
3.4.2. DNaz uygulaması	24
3.4.3. Komplementer DNA (cDNA) eldesi	25
3.4.4. Kantitatif gerçek zamanlı PCR (q RT-PCR) uygulaması	25
3.5. İstatistiksel değerlendirme	27
4. BULGULAR	
4.1. Rutin ışık mikroskopisi bulguları	28
4.2. Kantitatif real time PCR (q RT-PCR) bulguları	31
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	35
KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	42

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1	DNaz uygulaması için bir tüpe konması gereken kimyasallar ve miktarları	23
Tablo 3.2	cDNA eldesinde ikincil kıvrımların açılması aşamasında bir tüpe konması gereken kimyasallar ve miktarları	24
Tablo 3.3	cDNA eldesinde bir tüpe konması gereken kimyasallar ve miktarları	24
Tablo 3.4	q RT-PCR reaksiyonunda bir tüpe konması gereken kimyasallar ve miktarları	25
Tablo 3.5	q RT-PCR reaksiyonunda uygulanan sıcaklık değerleri ve süreleri	25
Tablo 3.6	q RT-PCR deneyinde kullanılan primer dizilimleri (Montero ve ark., 2016)(Montero ve ark., 2016)(Montero ve ark., 2016)	25

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	İnsan plasentası şematik çizimi	3
Şekil 2.2	Gelişimin 2. ayında insan embriyosu	4
Şekil 2.3	Gelişimin farklı dönemlerinde villusların yapısı	5
Şekil 2.4	Plasenta zarından geçişi gösteren şematik çizim	6
Şekil 2.5	Normal plasentasyondaki trofoblast invazyonu ve preekleptik plasentada görülen yetersiz trofoblast invazyonu	10
Şekil 2.6	Normal plasentasyondaki trofoblast invazyonu ve preekleptik plasentada görülen yetersiz trofoblast invazyonu	12
Şekil 2.7	Telomeraz aktivitesinin şematik çizimi	14
Şekil 2.8	Memelilerde TERRA biyogenezi ve düzenlenmesi. m7G: 7-metilguanozin	15
Şekil 2.9	Telomerik bölgenin TERRA transkriptleri ile ilişkisi	17
Şekil 2.10	TERRA'nın telomer uzunluğunun düzenlenmesindeki rolü	18
Şekil 2.11	Yaşlanma ile cfTERRA içeren ekzozomların enflamasyonu etkileme modeli	18
Şekil 4.1	Kontrol plasenta kesiti	28
Şekil 4.2	Preekleptik plasenta kesiti	29
Şekil 4.3	Kontrol ve preeklampsi grubunda primer 1'in mRNA düzeyinde ekspresyonunu gösteren grafik	30
Şekil 4.4	Kontrol ve preeklampsi grubunda primer 2'nin mRNA düzeyinde ekspresyonunu gösteren grafik	31
Şekil 4.5	Kontrol ve preeklampsi grubunda primer 3'ün mRNA düzeyinde ekspresyonunu gösteren grafik	31

SİMGELER ve KISALTMALAR

20q TERRA	: 20. kromozomun uzun kolundan transkribe olan TERRA
A	: Amniyon
ACOG	: Amerikan jinekologlar ve kadın doğumcular derneği
AKT Sinyal Yolu	: v-Akt mürin timoma viral onkojen sinyal yolu
ALT	: Alternatif telomer uzaması
ATM/ATR Sinyal Yolu	: Ataksi telenjiektazi mutasyonlu (ATM)/ATM ve RAD3 ile ilişkili (ATR)
BD	: Bağ dokusu
bp	: Baz çifti
cDNA	: Komplementer DNA
cfTERRA	: Hücre içermeyen TERRA
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ICF Sendromu	: İmmün yetmezlik, sentromerik bölge dengesizliği ve yüz anomalisi sendromu
kb	: Kilobaz
KD	: Kan damarları
KP	: Koryonik plak
KV	: Koryonik villuslar
lncRNA	: Uzun kodlanmayan RNA
m7G	: 7-metilguanozin
mRNA	: Mesajcı RNA
PARP1 Sinyal Yolu	: Poli [ADP-riboz] polimeraz 1
POT 1	: Telomer koruyucu 1
q RT-PCR	: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
Rap 1	: Baskılayıcı aktive eden protein1
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SB	: Stratum bazale
TERC/ hTR	: Telomerazın RNA komponenti

TERRA	: Telomerik tekrar içeren RNA
TERT/ hTERT	: Telomerazın geri transkriptazı
TPP 1	: Tripeptidil-Peptidaz 1
TRF 1	: Telomer tekrar-bağlayıcı faktör 1
TRF 2	: Telomer tekrar-bağlayıcı faktör 2



1. GİRİŞ

1.1. Telomer

Telomerler, ökaryotik kromozomların uç kısımlarında bulunan, ‘TTAGGG’ tekrarlarından oluşan 9-15 kb uzunluğunda heterokromatik DNA bölgeleridir (Benetos ve ark., 2001; Xi ve ark., 2013; Arsenis ve ark., 2017; Wagner ve ark., 2017). Telomerler, kromozomların stabilitesinin sağlanmasında, hücrel enzimlerce kısılmasının önlenmesinde ve kromozom uç-uç füzyonunun engellenmesinde görev alırlar (Mackiewicz, 2005). Somatik hücrelerde telomer boyu her replikasyonda kısalır (Xi ve ark., 2013; Arsenis ve ark., 2017; Jylhava ve ark., 2017).

1.2. TERRA (Telomerik Tekrar İçeren RNA)

TERRA, subtelomerik DNA bölgelerinde lokalize olan tekrar kümeleridir (Azzalin ve Lingner, 2015). RNA polimeraz II tarafından transkribe edilirler (Montero ve ark., 2016). Transkripsiyon ürünleri, ‘UUAGGG’ tekrarlarından oluşur ve ‘TERRA transkriptleri’ olarak adlandırılırlar (Luke ve Lingner, 2009; Azzalin ve Lingner, 2015; Montero ve ark., 2016). TERRA, heterokromatin oluşumunda, telomer korunmasında, telomerazın RNA bileşeni ve katalitik alt ünitenin bağlanması ile telomerazın aktif hale gelmesinde görevlidir (Luke ve Lingner, 2009; Montero ve ark., 2016).

TERRA transkriptlerinin hangi kromozomdan transkribe edildiği kesin olarak bilinmemektedir (Porro ve ark., 2010). Montero ve arkadaşları fonksiyonel TERRA transkriptlerinin 20q subtelomerik bölgeden transkribe edildiğini göstermişlerdir (Montero ve ark., 2016)

1.3. Gebelikte Telomer ve TERRA

Oosit telomer uzunluğu, somatik hücrelerdeki telomer uzunluğu ile benzer boyuttadır. Döllenmeden sonra blastosist evresine kadar telomer boyu çarpıcı bir artış gösterir. Telomer boyu uzaması, alternatif telomer uzaması ile gerçekleşir. Blastosist evresinden sonra telomer kısalmaya başlar ve altı ila yedinci haftalarda çarpıcı bir telomer kısalması gerçekleşir. On birinci haftada ise kısalma miktarı azalır (Foust-Wright ve ark., 2017).

Yapılan araştırmalarda, insan plasentasında birçok hücrede telomeraz aktivitesinin varlığı gösterilmiştir (Kudo ve ark., 2000; Mackiewicz, 2005; Fragkiadaki ve ark., 2016). Bonney ve ark. maternal dokulardaki telomer uzunlukları üzerine yaptıkları araştırmada, plasenta ve desidua/uterus telomer boyunun gebelik yaşı ile yüksek korelasyona sahip olduğunu, plasenta ile gebelik yaşı arasında ise belirgin bir korelasyon bulamadıklarını belirtmişlerdir (Bonney ve ark., 2016).

1.4. Preeklampsi

Preeklampsi, gebeliğin yirminci haftasında ortaya çıkar ve tüm gebeliklerin %5-7'sini oluşturur ("Report of the national high blood pressure education program working group on high blood pressure in pregnancy," 2000; George ve ark., 2017). Artan kan basıncı ve rede protein teşhisi ile preeklampsi tanısı konur. 20. haftada üre testinde ≥ 0.3 gr protein varlığı ve kan basıncının 140/90 mm Hg üzerinde ölçülmesi ile preeklampsi tanısı konur (Yi ve ark., 2017).

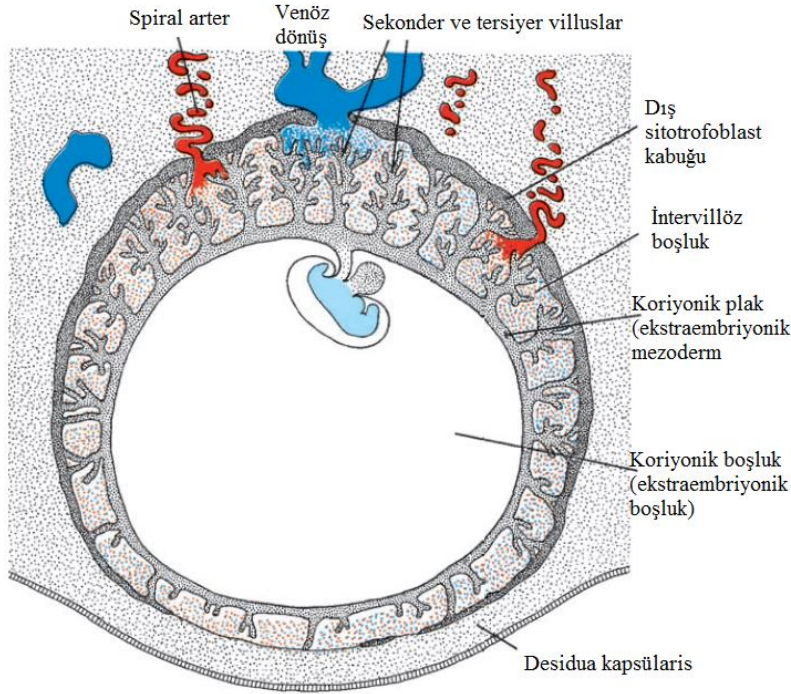
1.5. Preeklampside Telomer ve TERRA

A. J. Broady ve ark. sağlıklı plasenta telomer boyu ile preeklampsi plasenta telomer boyu arasında fark olmadığını göstermişlerdir (Broady ve ark., 2017). R. Halevy ve ark ise preeklampsi gebelikte telomer boyunun sağlıklı gebeliğe göre daha fazla kısaltıldığı gösterilmiştir (Suknik-Halevy ve ark., 2016). Literatürde; preeklampsi gebeliklerde TERRA seviyesinin belirlenmesine yönelik bir araştırma bulunmamaktadır.

Literatürde yer alan bu bilgiler ışığında, preeklampside değişen telomeraz aktivitesinin 20q TERRA ile ilişkili olduğunu düşünerek 'Preeklampsi, insan plasentasında 20q TERRA ekspresyon seviyesinin düşmesine ve kromozomal kararsızlığa neden olur' hipotezini kurduk. Hipotezimizi test etmek için 6 preeklampsi plasenta ve 6 sağlıklı plasenta rneği hastalardan aydınlatılmış onam formu imzalatılarak alındı. Örneklerin her biri hematoksilen&eoziin boyaması ve kantitatif gerçek zamanlı PCR (q RT-PCR) deneyine tabi tutuldu. q RT-PCR deneyi sonucunda preeklampsi grubunda TERRA transkripsiyon seviyesinin kontrol grubuna göre arttığı sonucuna varıldı. Bu alışma, preeklampsi gebelikte TERRA ekspresyonunu araştıran ilk çalışmadır.

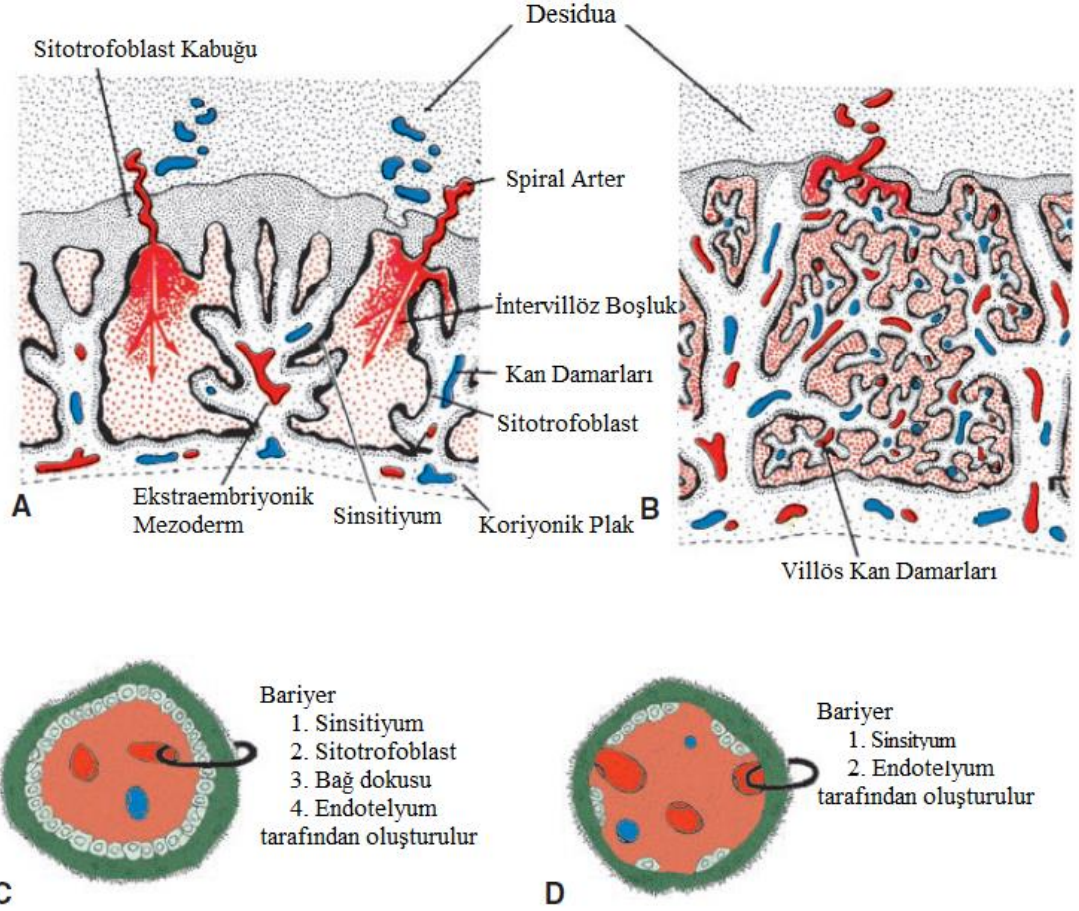
2.1.1. Plasenta Gelişimi

İkinci ayın başında, plasenta çok sayıda sekonder ve tersiyer villus içerir. Villus gövdesi koryonik plağın mezoderminden sitotrofoblastın kabuğuna doğru uzanır. Villusların ortasında bulunan bol damarlı mezoderm, onu dıştan çevreleyen sitotrofoblastik hücreler ve villusu dıştan kaplayan sinsisyum gelişir. Koryon plağı ve bağlantı sapı içinde gelişen kapillerlerle mezodermal kapillerler birleşir ve böylece ekstraembriyonik damar sistemi oluşturur. Anne kanını plsentaya ileten uterus spiral arterleri zamanla sitotrofoblastların damar içi invazyonu ile aşınır ve böylece kan intervillöz boşluklara dolar. Sitotrofoblast hücreleri spiral arterlerin terminal uçlarını istila ederek damar duvarındaki maternal endotel hücrelerinin yerini alır (Şekil 2.2) Böylece, fetal ve maternal hücrelerin bir arada bulunduğu hibrid damarlar oluşturur. dördüncü aya kadar laküner veya intervillöz aralıklara sayısız yeni uzantı eklenir fakat dört ayda sitotrofoblast hücreleri ve bağ dokusu hücrelerinin bir kısmı kaybolur. Sonuçta, maternal ve fetal dolaşım birbirinden yalnızca sinsisyum ve fetal kan damarlarının endotel hücreleri ile ayrılır (Langman ve Sadler). Bu sayede fetal ve maternal kanın birbirine karışmasını önleyen plasental bariyer oluşmuş olur (Ross ve Pawlina).



Şekil 2.2. Gelişimin ikinci ayında insan embriyosu. Sekonder ve tersiyer villusların ve spiral arterlerin gelişimi görülmekte. Düzeltmiştir (Langman ve Sadler)

Plasentanın hacimce büyümesi ve kalınlaşması, 4. ayın sonuna kadar devam eder (Şekil 2.3). Tam gelişmiş bir plasenta, desiduanın yaklaşık %15-30'unu kaplar (ortalama 15-25 cm çapında, 3 cm kalınlığında) ve ağırlığı fetüs ağırlığının yaklaşık 1/6'sı kadardır (ortalama 500-600 gr) (Langman ve Sadler; Moore).



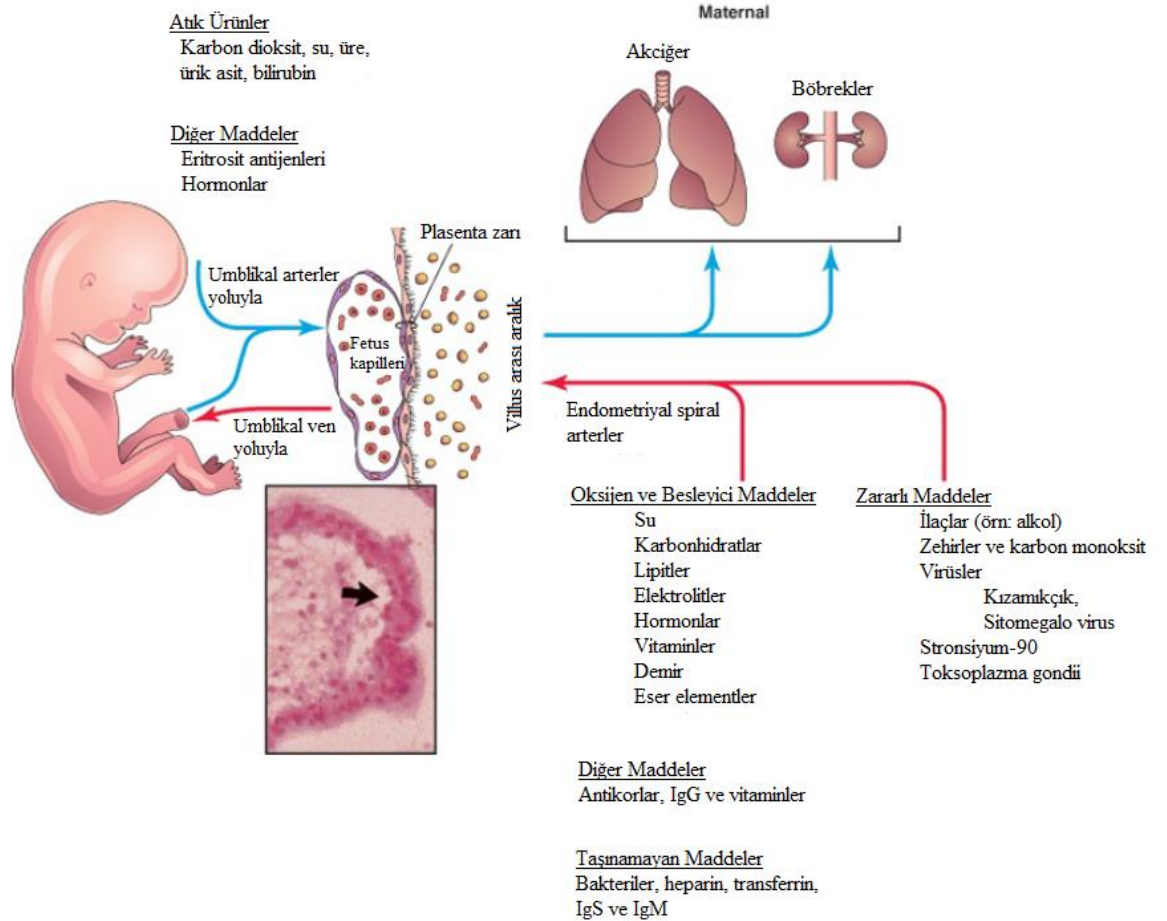
Şekil 2.3. Gelişimin farklı dönemlerinde villusların yapısı. **A)** Dördüncü hafta. Ekstraembriyonik mezoderm villusların içine desidual plak yönünde penetre olmuştur. **B)** Dördüncü ay. Küçük villusların çoğunda kapillerler sinsisyumla doğrudan ilişkilidir. **C, D)** A. ve B.'deki villusların ayrıntılı görünümü. Düzeltmiştir (Langman ve Sadler).

2.1.2. Plasental Dolaşım

Fetal kan fetüsten plasentaya bir çift umbilikal arter üzerinden girer. Göbek bağının plasentaya temas ettiği bölgede birçok dal veren ve radial olarak uzanan koryon arterleri adı verilen birkaç dala ayrılır. Bu damarların dalları arteriyovenöz sistemi oluşturur ve böylece fetal ve maternal kan arasında besin ve gaz değişimi gerçekleşir. Fetal kan

arterlere paralel uzanan ven sistemi üzerinden geri döner ve bu venler tek bir umbilikal veni oluşturmak üzere birleşir (Moore; Ross ve Pawlina).

Villuslar arasındaki boşlukta maternal kan, geçici olarak maternal dolaşım sisteminin dışındadır. Maternal kan plasentaya bazal plağı penetre eden 80-100 endometriyal arter ile ulaşır. Spiral arterlerden gelen kan intervillöz boşlukların bazaline akar. Intervillöz boşluklar dakikada 3-4 kez yenilenen 150 ml civarında maternal kan içerir. Spiral arterdeki kan basıncı, intervillöz boşluklardaki kan basıncından çok daha fazladır ve koryon plağına doğru akar. Basınç azaldığında kan villusların yüzeyine geri akar ve boşlukların bazalinde bulunan endometriyal venlere girer (Şekil 2.4) (Moore; Ross ve Pawlina).



Şekil 2.4. Plasental dolaşımı gösteren şematik çizim. Anneden fetusa, fetustan anneye geçen maddeler görülmekte. Düzeltmiştir (Moore).

2.1.3. Plasentanın Görevleri

Plasenta, maternal ve fetal dolaşım arasında gazların ve metabolitlerin değişim yeridir. Kan villusların üzerinden geçerken oksijen, karbondioksit, karbonmonoksit, amino asitler, serbest yağ asitleri, karbonhidratların değişimi gerçekleşir. Su, oksijen, metabolitler, elektrolitler, vitaminler, hormonlar ve bazı antikorlar anneden fetusa geçer (Langman ve Sadler; Ross ve Pawlina).

Plasenta endokrin organ fonksiyonu görür. Steroid ve peptid hormonlarını ve prostaglandinleri üretir. Gebeliğin devamında etkili olan progesteronun yanı sıra estriol ve östrojenik hormonlar da salgılar. Bunlara ek olarak insan koryonik gonadotropini (hCG), insan koryonik somatomammotropini (hCS), insülin benzeri büyüme hormonu 1 (GF-I) ve insülin benzeri büyüme hormonu 2 (IGF-II), endotelial büyüme faktörü (EGF), relaktin, leptin gibi peptid hormonları da plasenta tarafından salgılanır (Langman ve Sadler; Ross ve Pawlina).

2.1.4. Gebelik Hipertansiyonu

Gebelikte ortaya çıkan hastalıklardan biri de hipertansiyondur. Tüm gebeliklerin %6-8'inde ve ilk gebeliklerin %70'inde görülür. Altı saat ara ile elde edilen kan basıncı değerinin 140/90 mm Hg veya üzerinde ölçülmesinin ya da yirminci gebelik haftasından önce kan basıncı değerinde sistolik 30 mm Hg veya daha fazla, diastolik 15 mm Hg veya daha fazla yükselme olması gebelik hipertansiyonu tanısı konmasında en önemli kriterlerdir (Vest ve Cho, 2014; Magee ve von Dadelszen, 2018).

Gebelik hipertansiyonu pek çok araştırmacı tarafından çeşitli sınıflara ayrılmıştır. Gebelik hipertansiyonu etiyolojik olarak iki gruba ayrılır. Birincisi gebeliğin neden olduğu, gebelikte ortaya çıkan ve gebelikten sonra bulguların ortadan kalktığı, gebelik hipertansiyonu, ikincisi ise gebelikten önce mevcut olan ve gebeliğe eşlik eden kronik hipertansiyondur (Vest ve Cho, 2014; Magee ve von Dadelszen, 2018). 1972 yılında ACOG'un (Amerikan Jinekologlar ve Obstetristenler Derneği) yaptığı sınıflandırmaya göre gebelik hipertansiyonu geçici hipertansiyon, preeklampsi, eklampsi ve kronik hipertansiyon olarak sınıflandırılmıştır ("Report of the national high blood pressure education program working group on high blood pressure in pregnancy," 2000; Scantlebury ve ark., 2013; Suranyi ve ark., 2017; Magee ve von Dadelszen, 2018).

Geçici hipertansiyon: Gebeliğin ikinci yarısında veya postpartum 24 saati içinde ortaya çıkar. Proteinüri veya ödem eşlik etmez ve doğum sonrası on gün içinde normale döner (Vest ve Cho, 2014).

Preeklampsi: Gebeliğin ikinci yarısında veya doğum sonrası ilk 24 saat içinde ortaya çıkar. Proteinüri veya ödem eşlik eder (Vest ve Cho, 2014; Gilbert ve ark., 2019).

Eklampsi: Preeklamapsili hastada koma gelişmesi durumu eklampsi olarak nitelendirilir. Gebeliğin ikinci yarısında veya doğumdan sonra ilk 24 saat içinde ortaya çıkar. Proteinüri veya ödem eşlik eder. Konvülsiyon veya koma gelişebilir (Vest ve Cho, 2014).

Kronik hipertansiyon: Gebelikten önce veya yirminci gebelik haftasından önce hipertansiyon vardır. Doğumdan sonra, altı haftadan daha uzun süre hipertansiyon devam eder (Vest ve Cho, 2014).

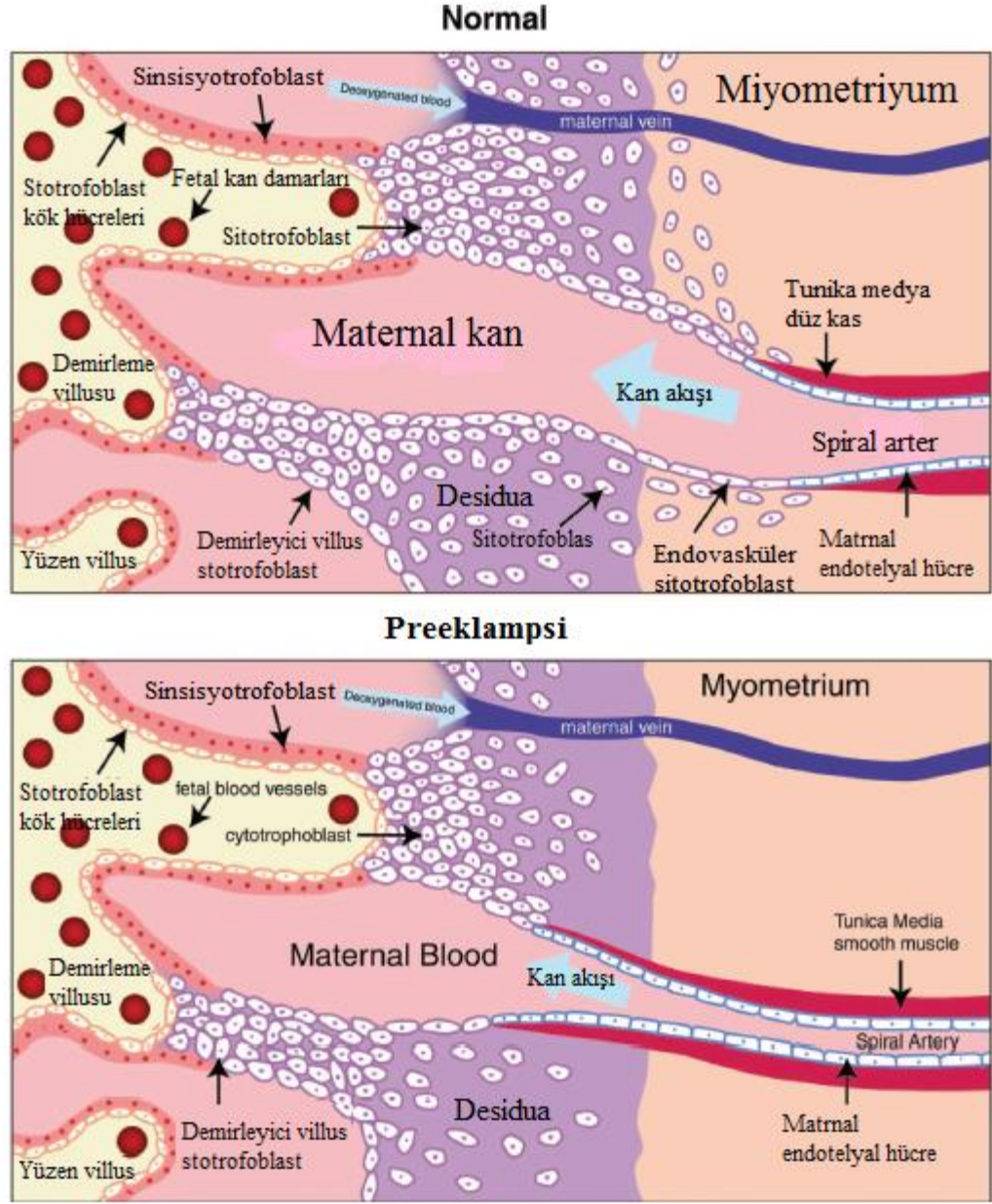
2.2. Preeklampsi

Preeklampsi, tüm gebeliklerin % 3-5'inde görülen, gebeliğinyirminci haftasında yüksek tansiyon ve proteinüri ile karakterize bir hastalıktır. Preeklampsi semptomları gebelikten on iki hafta sonra ortadan kalkmaktadır. Yirmi haftalık gebelikten önce normotansif olan bir kadının 24 saatlik üre testinde 0.3 gr ve üzerinde protein varlığı ve kan basıncının 140/90 mm Hg ve üzerinde ölçülmesi ile preeklampsi tanısı konur (Powe, Levine et al. 2011). (Bokslag ve ark., 2017). Başka hastalıklar da hipertansiyon ve proteinüri ile sonuçlanabilir. Bu nedenle, preeklampsi tanısının kesinliğini arttırmak için kan basıncının 160/110 mm Hg ve üzerinde olması, 24 saatlik üre testinde ≥ 2 gr proteinüri ölçülmesi, serum kreatinin düzeyinin ≥ 1.2 mg/dL olması, trombosit sayımı ≥ 100.000 hücre/mm³ olması, karaciğer enzim aktivitelerinin yükselmesi, hastanın sürekli baş ağrısı veya diğer serebral ve/veya görsel bozukluklar belirmesi, hastanın sürekli epigastrik ağrı bildirmesi gibi bulgular kullanılabilir ("Report of the national high blood pressure education program working group on high blood pressure in pregnancy," 2000; Bokslag ve ark., 2017).

Primigravid (ilk gebelik), nullipar (kısır) olmak, aile hikayesinde preeklampsi, maternal yaşın 20'den küçük veya 35'ten büyük olması, kronik hipertansiyon, hipertansiyona zemin hazırlayacak hastalık öyküsü olması, diabet mellitus, çoğul gebelikler, Rh uyuşmazlığı, siyah ırka mensup olmak, obezite, antifosfolipid sendromu, 2700 m'nin üzerindeki rakımlı bölgelerdeki gebelikler preeklampsi riskinin artmasının başlıca nedenleridir (Matheson ve ark., 2016).

Oksidatif stres, artmış inflamasyon, aşırı apoptoz, maternal immün bozukluk ve beslenme dengesizliği gibi bozukluklar preeklampsi gelişmesiyle ilişkili olabileceğini söyleyen araştırmalar olmasına rağmen, preeklampsi etiyolojisi ve patogenezi hala net olarak bilinmemektedir ("Report of the national high blood pressure education program working group on high blood pressure in pregnancy," 2000; Powe ve ark., 2011). Kronik hipertansiyon, kronik böbrek yetmezliği, tromboz öyküsü, çoklu gebelik, *in vitro* fertilizasyon, ailede preeklampsi öyküsü, diyabet, obezite, gebelik yaşının 40 ve üstünde olması, kadınlarda preeklampsi görölme olasılığını artırır (Yi ve ark., 2017).

Preeklampsinin nedeni bilinmemektedir. Birçok kişi plasentada preeklampsinin tüm belirtileri için patojenik odağı göz önünde bulundurur, çünkü doğum, bu hastalık için tek kesin tedavidir. Normal bir gebeliğin erken döneminde spiral arterler (uterus arterinin terminal dalları) kalın duvarlı müsküler arterden kese benzeri zayıf damarlara dönüşür ve sonuçta uterin kan akımında 10 kat artış olur. Bu dönüşüm, spiral arterlerin plasentanın endovasküler trofoblast hücreleri tarafından invazyonunu içerir ("Report of the national high blood pressure education program working group on high blood pressure in pregnancy," 2000). Preeklampside, plasental spiral arterler kas elastikiyetlerini kaybetmezler. Bu durum, plasental perfüzyonun azalmasına yol açar (Sibai ve ark., 1990; Lyall ve ark., 2001). Plasental hipoksi, endotel bozukluğuna neden olan faktörlerin plasentada üretilmesine neden olur ve böylece preeklampsi gelişir (Şekil 1.5) (Cushen ve Goulopoulou, 2017). Oksidatif stres, plasental steroidogenez, anjiyotensin II reseptörüne karşı agonist oto-antikor oluşumu, gebeliğin koagületesinin artması ve insüline direnç preeklampsi gelişmesine neden olan diğer faktörlerdir (Scantlebury ve ark., 2013).



Şekil 2.5: Normal plasentasyondaki trofoblast invazyonu ve preeklempitik plasentada görülen yetersiz trofoblast invazyonu. Spiral arterlerde normalde olması gereken genişleme gerçekleşemez. Düzeltmiştir (Powe ve ark., 2011).

Preeklampsi, Ulusal yüksek tansiyon eğitim programı çalışma grubunun gebelikte yüksek tansiyon çalışmasında iki grupta sınıflandırıldı.

Hafif preeklampsi: Hafif preeklampsi teşhisinin konulabilmesi için annede gebelikte görülen hipertansiyonun 140/90 mm Hg ve 24 saatlik idrar ölçümünde potteinürinin

0.3gr/dl'den fazla olması gerekmektedir (Vest ve Cho, 2014; Magee ve von Dadelszen, 2018).

Ağır preeklampsi: Ağır preeklampsi teşhisi konulabilmesi için yatak istirahatindeki bir gebede 6 saat ara ile ölçülen diastolik kan basıncı değerlerinin 100 mm Hg üzerinde olması, 24 saatlik idrarda 5 gr proteinüri teşhisi, oligoüri (24 saatte çıkılan idrar miktarının ≤ 500 ml'den az olması durumu), fetal büyüme geriliği, baş ağrısı, bilinç bulanıklığı gibi serebral veya vizüel bozukluklar, karaciğer fonksiyonlarında meydana gelen bozulma, pulmoner ödem bulgularından bir veya birkaçının olması gerekmektedir (Vest ve Cho, 2014; Magee ve von Dadelszen, 2018).

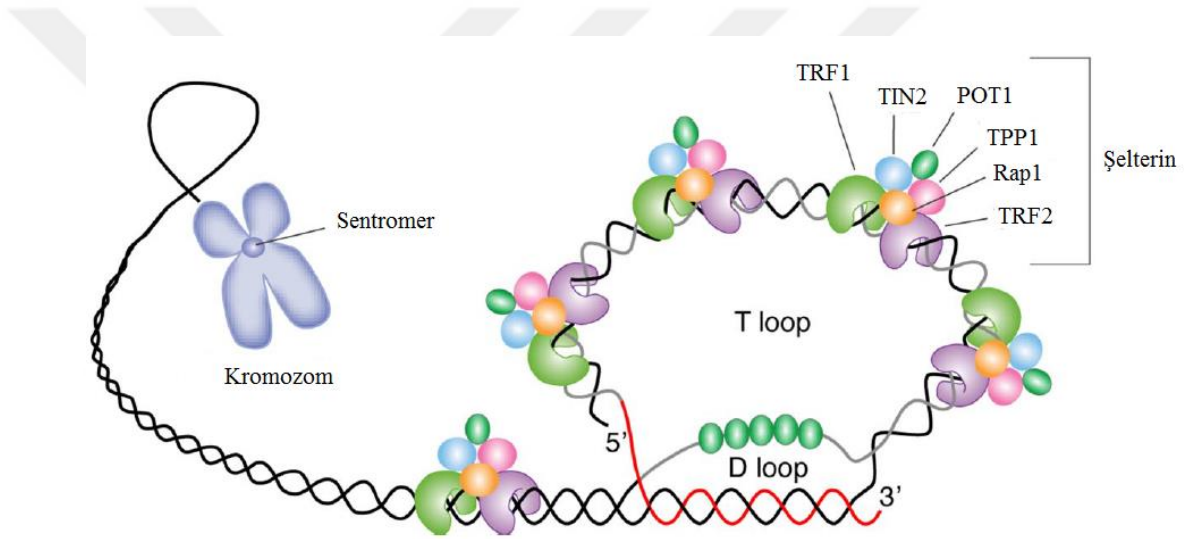
Preeklampsi öyküsü olan kadınlarda kardiovasküler hastalıkların görülme ihtimali artmaktadır (Ayansina ve ark., 2016; Bokslag ve ark., 2017). Uzun dönem böbrek hasarı, tip I diyabet ile preeklampsi arasında ilişki olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (McDonald ve ark., 2010; Ayansina ve ark., 2016). Şiddetli preeklampsi hastalığında beyinde ödem, karaciğer bozuklukları, damar tıkanıklığı gözlenmiştir. Preeklampsi, fetusta düşük doğum ağırlığı, prematüre doğum ve fetal ölümle sonuçlanan intrauterin büyüme bozukluğuna neden olabilir (Maaliki ve ark., 2018).

2.3. Telomer

Telomerler, ökaryotik kromozomların uç kısımlarında bulunan, protein kodu içermeyen, kısa DNA tekrarları (omurgalılarda TTAGGG) ve bunlarla ilişkili proteinlerden oluşan heterokromatik bölgelerdir (Davinelli ve ark., 2018; de Punder ve ark., 2018; Mangaonkar ve Patnaik, 2018; Q. Wang ve ark., 2018; Lin ve ark., 2019). Telomerler genomik bütünlüğün korunması, kromozomların istenmeyen uç kaynaşmalarından (füzyon) korunması, kromatin organizasyonu, kromozom uçlarının çift zincir kırığı gibi diğer DNA uçlarından ayırt edilmesi ve böylece DNA tamir mekanizmasının aktive olmasında ve kromozomların çekirdek zarına tutunarak belirli bir pozisyonda kalmasında görevlidirler (Assani ve ark., 2018; de Punder ve ark., 2018; Q. Wang ve ark., 2018; Zhu ve ark., 2018; Miri ve ark., 2019). Bu görevlerini, telomerik tekrar bölgelerine [5'-(TTAGGG)_n-3'] bağlanarak telomerlerin korunmasını sağlayan şeltilerin

kompleksi ve telomerik tekrarların transkripsiyonunu sağlayan telomeraz enzimi sayesinde gerçekleştirmektedir (de Punder ve ark., 2018).

Memelilerde telomer bölgesi 9-15 kilo baz (kb) uzunluğunda, 5'-TTAGGG-3' tekrarlarından oluşan çift iplikli DNA ve bu tekrarlara bitişik birkaç yüz nükleotit uzunluğunda guanince zengin tek iplikli DNA'dan oluşur (Assani ve ark., 2018; Zhu ve ark., 2018). Guanince zengin bölge kendi üzerinde dönerek 5'-TTAGGG-3' bölgesinde komplementeri olan ipliğe bağlanır ve T-loop ile D-loop yapılarını oluşturur (Şekil 2.6) (Calado ve Young, 2008; Assani ve ark., 2018; Zhu ve ark., 2018).



Şekil 2.6. Telomer tekrarlarının kromozom üzerindeki yeri. Telomer korunmasında rol alan şelterin kompleksi ve loop yapıları. Düzeltilmiştir. (Calado ve Young, 2008)

Şelterin kompleksi, telomerik bölgelere özgü altı proteinin telomerik bölgelere belirli bir komformasyonda bağlanmasıyla oluşur. TRF1 (Telomer tekrar faktörü 1) ve TRF2 (Telomer tekrar faktörü 2), çift iplikli DNA tekrarlarına bağlanır. POT1 (Telomer koruma 1), TPP1 (Tripeptidil-Peptidaz 1), Rap1 (baskılayıcı aktive eden protein 1) ise TRF1 ve TRF2'ye bağlanır. Böylece şelterin kompleksi oluşur (Calado ve Young, 2008; Assani ve ark., 2018; De Vitis ve ark., 2018).

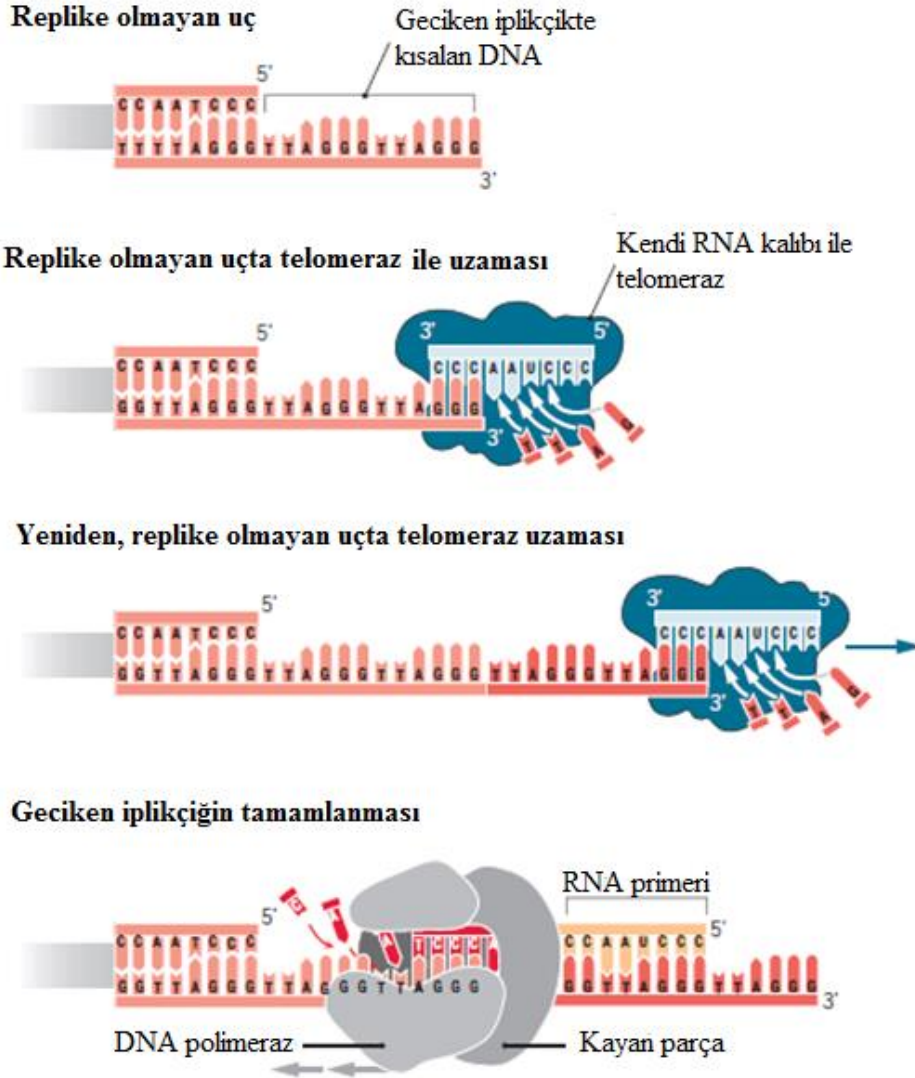
Doğumda insan hücreleri heterojenite göstermekle birlikte telomer boyu ortalama 10-15 kb uzunluğundadır (Davinelli ve ark., 2018). Somatik hücrelerde her replikasyon esnasında, kesintisiz zincirde herhangi bir sentez problemi olmadan sentez sonlanırken,

kesintili zincirde RNA primeri yapıdan uzaklaştığında uç kısımda bir sentez problemi oluşur. Normal olarak 3'OH grubuna nükleotit ilavesi yapılarak primerin uzaklaşması sonucu oluşan boşluklar doldurulmalıdır. RNA primeri kromozomun ortasındaki replikasyon çatalından uzaklaştığında, oluşan boşluk DNA polimeraz tarafından doldurulur. Ancak DNA molekülünün uç kısmında 3'OH grubunu sağlayacak kalıp zincir yoktur. Dolayısıyla her replikasyonda kromozom, uç kısmından 50-100 baz çifti kadar kısılır (Calado ve Young, 2008; Davinelli ve ark., 2018; Zhu ve ark., 2018).

Somatik hücrelerdeki uç replikasyon problemi, her hücrenin belirli sayıda replikasyon geçirmesine müsaade eder. Bu limit Hayflick limiti olarak adlandırılır (Assani ve ark., 2018; Romaniuk ve ark., 2018; Zhu ve ark., 2018). Hayflick limitine ulaşan hücre ya replike olmaz ve yaşlı hücre olarak hücrel faaliyetlerine devam eder ya da programlı hücre ölümü (apoptoz) geçirir (Davinelli ve ark., 2018).

Kök hücreler, aktif lenfositler, embriyo, kanser ve kanser kök hücreleri gibi yüksek replikasyon kapasitesine sahip hücrelerde telomer kısalmasını engellemek için alternatif telomer uzaması (ALT) veya telomeraz aktivitesi bulunmaktadır (Calado ve Young, 2008; Romaniuk ve ark., 2018). Telomeraz enzimi, TERT (Telomeraz geri transkriptazı) ve TERC (Telomeraz RNA bileşeni) olmak üzere iki proteinden oluşmaktadır (Assani ve ark., 2018; de Punder ve ark., 2018).

Telomeraz enzimi, TTAGGG tekrar dizisinin birçok kopyasını kesintili zincirin 3'ucuna 5'→3' sentez yönünde ilave eder. Böylece kromozomun kısalması engellenmiş olur. İlave edilen diziler 'saç tokası' gibi kendi üzerine kıvrılır ve karşı karşıya gelen guaninler arasında 'anortodoks bağları (G=G)' oluşur. Bu, yapının dayanıklılığını sağlar. Saç tokasının sonunda ortaya çıkan serbest 3'OH ucu DNA polimeraz I'in substratı olarak iş görür. Kromozomda oluşan boşluk böylece tamamlanmış olur. Enzimatik RNA dizisinin bir kısmı telomerik DNA ile baz çifti oluştururken, RNA'nın geri kalan kısmı kesintili zincirin ucu ile çakışır. RNA kalıbı üzerinden DNA sentezleyen bu çakışan dizinin geri transkripsiyonu, kesintili zincirin uzamasına yol açar. Bundan sonra enzim yer değiştirerek kesintili zincirin sonuna doğru taşınır (translokasyon) ve bu işlem tekrarlanır (Şekil 2.7) (Calado ve Young, 2008; Assani ve ark., 2018; Mangaonkar ve Patnaik, 2018).



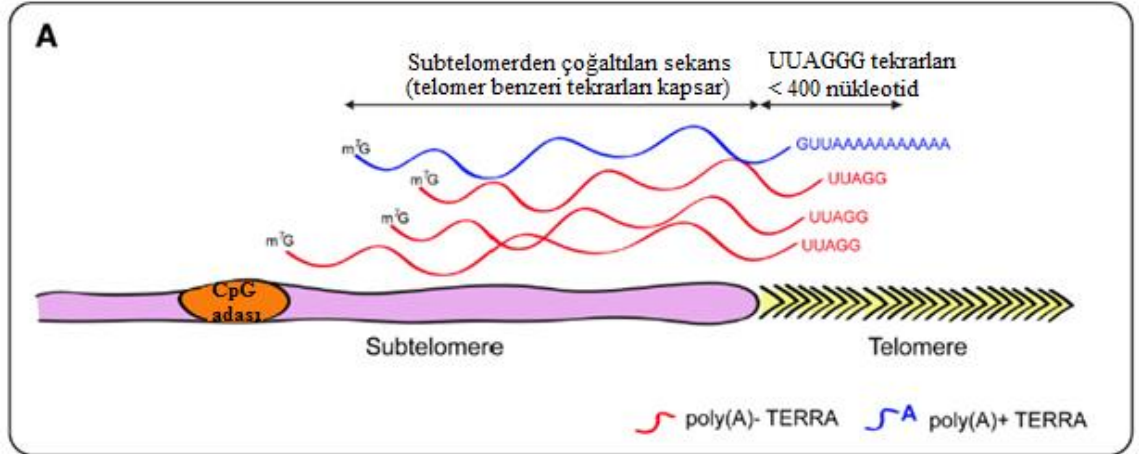
Şekil 2.7. Telomeraz aktivitesinin şematik çizimi. Gecikmeli iplikte RNA kalıbı telomerik tekrarların uç kısmına bağlanır ve telomeraz geri transkriptazı aracılığı ile telomk tekrarlar uzatılır. Uzatılan bu kısım, replikasyonda kalıp olarak kullanılır ve telomer boyu korunur. Düzeltiştir (Blackburn ve ark., 2015).

Hücre aktivasyonunu, dolayısıyla hücre içi mekanizmaları etkileyen birçok faktör telomerler üzerinde de etkili olabilmektedir. Hava kirliliği üzerine yapılan bir çalışmada, partiküler maddelere uzun süre maruz kalmanın replikasyon kapasitesini artırarak veya her replikasyonda telomer kısalma miktarını artırarak telomer boyunun kısılmasına neden olabileceği bildirilmiştir (Miri ve ark., 2019). Buna ek olarak hücre telomer boyunun kısılmasıyla PARP1; ATM/ATR, AKT sinyal yolları aracılığıyla ROS üretimini artırır ve mitokondriyel fonksiyon bozukluğuna neden olarak inflamasyon aracılı yaşlanmayı tetikleyebilir (Zhu ve ark., 2018).

Telomer kısalmasının depresyon, anksiyete bozuklukları, şizofreni, alzheimer gibi nörolojik hastalıklar; kemik iliği yetmezliği, diskeratozis konjenite, aplastik anemi gibi immün sistem hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Calado ve Young, 2008; de Punder ve ark., 2018; Mangaonkar ve Patnaik, 2018; Romaniuk ve ark., 2018; Solana ve ark., 2018; Q. Wang ve ark., 2018). Telomer boyunun hastalıklar sonucu kısalması, telomer boyunun hastalık teşhisinde bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Lin ve ark., 2019).

2.4. Telomerik Tekrar İçeren RNA (TERRA)

Telomerik tekrar içeren RNA olarak adlandırılan TERRA bir uzun kodlanmayan RNA (uzun kodlanmayan RNA: lncRNA) çeşididir (Oliva-Rico ve Herrera, 2017). TERRA, subtelomerik DNA bölgelerinde yerleşim gösterir. Sentromerden telomere doğru, transkripsiyonun yapıldığı subtelomerik bölgede yer alan transkripsiyon başlangıç bölgesinin lokalizasyonuna bağlı olarak RNA polimeraz II tarafından transkribe olduğu için 100 bp ile 9 kb arasında değişen uzunluklarda olabilir (Şekil 2.8) (Azzalin ve Lingner, 2015; C. Wang ve ark., 2015; Montero ve ark., 2016; Z. Wang ve Lieberman, 2016; Oliva-Rico ve Herrera, 2017). Transkripsiyon ürünleri, 5'-UUAGGG-3' tekrarlarından oluşur ve 'TERRA transkriptleri' olarak adlandırılırlar (Luke ve Lingner, 2009; Azzalin ve Lingner, 2015; Montero ve ark., 2016).



Şekil 2.8. Memelilerde TERRA biyogenezi ve düzenlenmesi. TERRA subtelomerik bölgeden transkribe olur ve UUAGGG tekrarlarından oluşan yaklaşık 400 nükleotit uzunluğunda transkriptlerdir. m7G: 7-metilguanozin. Düzeltmiştir (Feuerhahn ve ark., 2010)

İnsan TERRA'sının yaklaşık %7'si poli-A kuyruğu taşır. (Feuerhahn ve ark., 2010; Azzalin ve Lingner, 2015; Oliva-Rico ve Herrera, 2017). Poli-A kuyruğu, TERRA transkriptlerinin stabilitesini artırır. Ayrıca, TRF2 aracılığıyla telomerik tekrarlarla bağlandığını gösteren çalışmalar vardır. TERRA'nın telomerik tekrarlarla RNA-DNA hibritleri oluşturarak bağlandığı savunulmaktadır (Azzalin ve Lingner, 2015; Cusanelli ve Chartrand, 2015). Buna ek olarak bazı çalışmalar, TERRA'nın telomerik tekrarlarda guanince zengin bölgeleri aracılığıyla bağlanabileceğini vurgulamaktadır (Azzalin ve Lingner, 2015; Oliva-Rico ve Herrera, 2017).

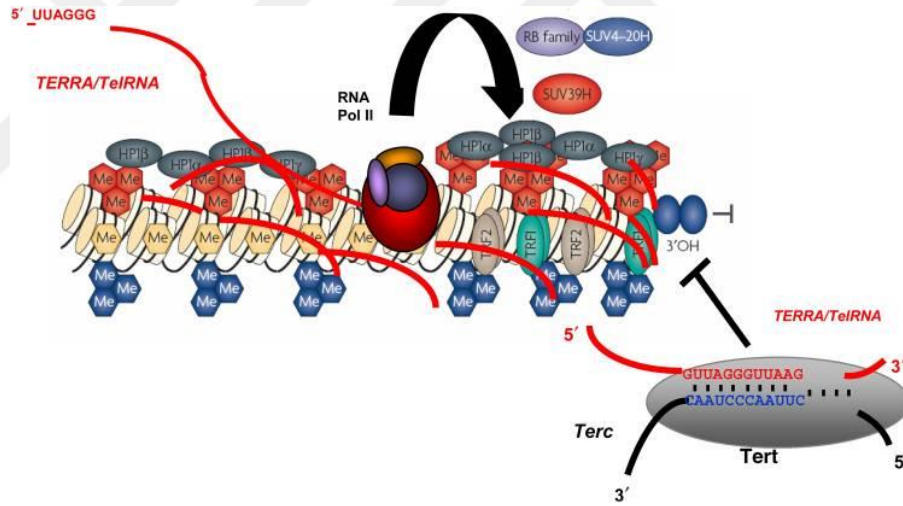
Yapılan ilk çalışmalarda insan TERRA moleküllerinin belirli bir korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Daha sonra, TERRA heterojenitesinin farklı telomer boylarıyla ilişkili olabileceği düşünüldü. Telomer boyu ile TERRA arasındaki ilk korelasyon ICF (immün yetmezlik, sentromerik bölge dengesizliği ve yüz anomalisi) sendromu görülen hastalardan elde edilen fibroblast hücrelerinde ve çeşitli insan hücrelerinde yapılan deneylerle gösterilmiştir (Yehezkel ve ark., 2008; C. Wang ve ark., 2015; Z. Wang ve Lieberman, 2016; Diman ve Decottignies, 2018). Yüz anomalisi görülen hastalardan elde edilen primer hücrelerde TERRA seviyesinin, kontrol hücrelere göre artması bunu desteklemektedir (Azzalin ve Lingner, 2015; C. Wang ve ark., 2015).

TERRA, heterokromatin oluşumunda, telomer korunmasında, RPA'nın POT1'e dönüşümünü sağlayarak ALT'nin aktivasyonunda, homolog rekombinasyon ile DNA-TERRA hibritleri oluşturarak telomer uzamasında, hTR-hTERT telomeraz korkompleksinin bağlanması ile telomerazın aktif hale gelmesinde görevlidir (Luke ve Lingner, 2009; Montero ve ark., 2016). Flynn ve ark.'nın, 2011'de yaptığı bir çalışmada TERRA'nın hücre döngüsünde tek iplikli telomerik bölgeye bağlanan proteinlerin değiş-tokuşunu sağlayarak telomerik bölgenin kapanmasını sağladığını belirtmektedirler (Şekil 2.9) (Flynn ve ark., 2011).

TERRA transkriptlerinin hangi kromozomdan sentezlendiği yakın zamana kadar bilinmemekteydi. Başlangıçta tüm kromozomların subtelomerik bölgelerinden transkribe olabileceğini düşünmüşlerdir. Daha sonra HeLa (Henrietta Lacks) hücrelerinde yapılan bir çalışma, on farklı kromozom ucunda TTAGGG tekrarlarının 5-10 kb uzağına yerleşmiş iki farklı subtelomerik promotor bulunduğunu bildirmiştir (Porro ve ark.,

2010; Diman ve Decottignies, 2018). Juan Jose´ Montero ve arkadaşları U2OS, HeLa, HCT116 ve IMR90 insan kanser hücre hatlarında TERRA transkriptlerinin esas olarak 20q kromozomunun subtelomerlerinden transkribe olduğunu ve bu transkript ürünlerinin muhtemelen fonksiyonel TERRA olduğu sonucuna vardılar (Montero ve ark., 2016).

Telomerik tekrarların bulunduğu kromozom bölgesi şeltrin kompleksi aracılığıyla korunmaktadır, bu bölgede metilasyon yoktur. Ancak subtelomerik bölgenin korunumu, metilasyon yolu ile olmaktadır. Subtelomerik bölgeden TERRA transkripsiyonu olacağı zaman metilasyon gevşer ve RNA polimeraz II aracılığı ile transkripsiyon gerçekleşir. Yapılan çalışmalar, TRF1'in knockdown edilmesi ile TERRA transkriptlerinin sayısının ciddi bir şekilde azaldığını göstermektedir. Bu da, TRF1'in TERRA transkripsiyonunda görevli olabileceğini göstermektedir (Oliva-Rico ve Herrera, 2017).

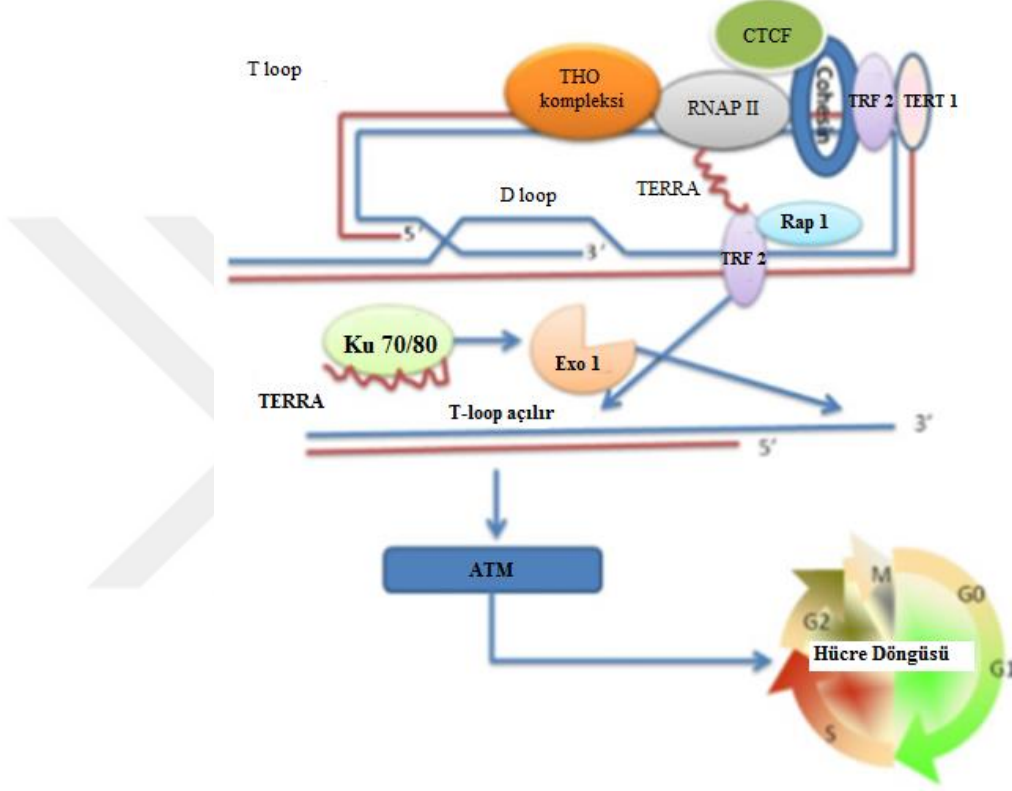


Şekil 2.9. Telomerik bölgenin TERRA transkriptleri ile ilişkisi. TERRA transkriptleri telomerik bölgelere DNA-RNA hibridleri oluşturarak bağlanır (Schoeftner ve Blasco, 2009).

TERRA'nın tam olarak hangi yolağı kullanarak telomer boyunun korunmasında görev aldığı bilinmemektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, TRF1 ve TRF2'nin aktivitesini düzenleyerek telomer korunmasında görevli olabileceğini belirtmektedir (Arora ve Azzalin, 2015; Cusanelli ve Chartrand, 2015).

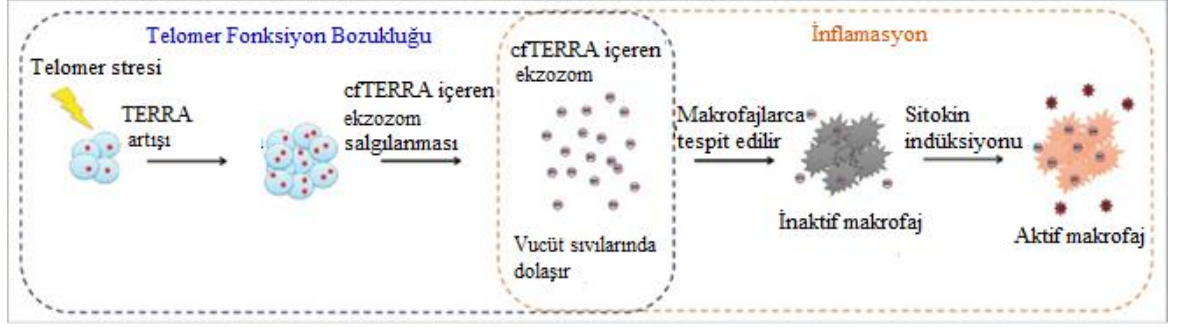
TERRA, telomer uzunluğunun düzenlenmesinde çeşitli yollarla görev almaktadır. İlk olarak, telomeraz aktivitesini engelleyerek telomer boyunun kışalmasına neden olur. İkinci olarak kromozom uçlarında ekzonükleaz 1'in telomerik tekrarları kesmesi ile

telomer boyunun ksalmasına neden olabilir. Ökromatin oluşumunu arttırarak heterokromatin oluşumunu azaltabilir (Şekil 2.10) (Cusanelli ve Chartrand, 2015). Böylece TERRA, telomeraz aktivitesi olmayan telomer boyu kısa hücrelerde DNA hasar yanıtını tetikleyerek anti-kanser bir ajan görevi görür (C. Wang ve ark., 2015).



Şekil 2.10. TERRA'nın telomer uzunluğunun düzenlenmesindeki rolü. Düzeltilmiştir (Cusanelli ve Chartrand, 2015).

2016'da yapılan bir çalışmada, kanser hücre kültüründe ve insan kan plazmasında hücre dışı mikroveziküler ekzozomların bir nükleoprotein bileşeni olan hücre içermeyen TERRA (hücre içermeyen TERRA: cfTERRA) formu bulundu. Yaşlı hücrelerde telomer boyunun ksalmasıyla oluşan stres, TERRA ekspresyonunu ve ekzozomlar aracılığı ile cfTERRA salınımını indükler. cfTERRA içeren ekzozomlar, vücut sıvısında dolaşır (Şekil 2.11) (Z. Wang ve Lieberman, 2016).



Şekil 2.11. Yaşlanma ile cfTERRA içeren ekzozomların inflamasyonu etkileme modeli. Telomer stresi oluştuğunda TERRA artar ve cfTERRA salınımını artırır. cfTERRA vücut sıvılarında dolaşır ve inflamasyon durumunda makrofajların aktif hale gelmelerini sağlar. Düzeltilmiştir (Z. Wang ve Lieberman, 2016).

2.5. Gebelikte Telomer

Oosit telomer uzunluğu, somatik hücrelerdeki telomer uzunluğu ile benzer boyuttadır. Döllenmeden sonra blastosist evresine kadar telomer boyu çarpıcı bir artış gösterir. Telomer boyu uzaması, kardeş kromatit değişimi yoluyla gerçekleşen alternatif telomer uzaması ile gerçekleşir. Blastosist evresinden sonra telomer kısalmaya başlar ve 6-7. haftalarda çarpıcı bir telomer kısalması gerçekleşir. On birinci haftada ise kısalma miktarı azalır (Foust-Wright ve ark., 2017).

Yapılan araştırmalarda, insan plasentasında birçok hücrede telomeraz aktivitesinin varlığı gösterilmiştir (Kudo, Izutsu et al. 2000; Mackiewicz 2005; Fragkiadaki, Tsoukalas et al. 2016). E. A. Bonney ve ark. maternal dokulardaki telomer uzunlukları üzerine yaptıkları araştırmada, plasenta ve desidua/uterus telomer boyunun gebelik yaşı ile yüksek bir ilişkiye sahip olduğunu, plasenta ile gebelik yaşı arasında ise belirgin bir korelasyon bulamadıklarını belirtmişlerdir (Bonney, Krebs et al. 2016). Zygmunt Mackiewicz ve ark. plasenta hücrelerinin çoğunda telomeraz aktivitesinin varlığını göstermiştir (Mackiewicz 2005). S. L. Wilson ve ark. dişi bebeğe ve erkek bebeğe ait plasentaların telomer boyları arasında fark olmadığını göstermiştir (Wilson ve ark., 2016).

Prenatal dönemde sigara içen annelerin bebeklerinde, telomer boyu değerlendirilmiş ve telomer boyunun sigara içen kadınların bebeklerinde daha kısa olduğu sonucuna varılmıştır. Bu bulgular, tütün dumanına maruz kalmaktan kaynaklanan yaşlanma ile,

intrauterin fetal programlama olduğunu kanıtlamaktadır. Gebeliği sırasında hipertansiyon öyküsü geçirmiş kadınların bebeklerinin telomer boyları, kontrole oranla belirgin biçimde azalmıştır. Bu bilgiler bize annenin hamilelik öncesi ve hamilelik sırasında geçirdiği hastalıklar ve yaşam tarzının bebek genomunda telomer dinamiğine olumsuz etki ettiğini desteklemektedir (Whiteman ve ark., 2017).

2.6. Gebelikte TERRA

Yaptığımız literatür taramalarında gebelikte 20q TERRA araştırılmamıştır. Sunulan çalışma, preeklemtik plasentada yapılan ilk çalışmadır.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Örneklerin Elde Edilmesi

Örnekler, Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na başvuran 6 sağlıklı gebe ve 6 preeklampsi teşhisi konan gebenin plasentalarından alındı. Tüm hastalara aydınlatılmış onam formu imzalatıldı. Doğum sonrası plasenta örnekleri buz içinde muhafaza edilerek Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına olabildiğince hızlı bir şekilde getirildi.

Her bir plasenta örneği, buz üstünde Akdeniz Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına heparin eklenmiş serum fizyolojik ile tüm kanından arındırılana kadar yıkandı. Doku kandan tamamen arındırıldıktan sonra plasentanın maternal ve fetal kısımlarından eşit oranda olacak şekilde deneyler için örnek alındı. Hematoksilen&eozi boyaması için %10 formaldehit içine alınan dokular, doku takip protokolüne uygun olarak takip edildi ve parafin içine gömüldü. q RT-PCR deneyi için ise kriyo tüplere alınan örnekler -80 °C derin dondurucuda saklandı.

3.2. Rutin Parafin Takibi

Elde edilen 6 normal gebelik ve 6 preekleptik gebelik plasentalarından alınan doku örnekleri, aşağıdaki protokole uygun olarak takip edildi.

1. Kabaca parçalanmış plasenta dokuları %10 formalin içine alındı ve 12 saat boyunca bekletildi. 12 saat sonunda kesit alınabilecek kadar küçük olacak şekilde trimlendi ve 12 saat daha %10 formalin içinde bekletildi. Böylece, örneklerin otolizi önleni ve fikse edildi.

2. 4 saat boyunca çeşme altında akar suyla yıkandı. Böylece, %10 formalinin dokulardan uzaklaşması sağlandı.

3. Yıkamanın ardından doku örnekleri 1 gün boyunca %50 etanole maruz bırakıldı. %70 etanolde 2 gün bekletildi (%70 etanolde 1 gün kaldıktan sonra alkol solüsyonu

yenilendi). %80, %90 etanolde ise birer gün ve %100 etanolde 4 saat tutuldu. Böylece plasenta örnekleri kademeli olarak dehidrate edildi.

4. Üç seri ksilolde (ksilol 1, ksilol 2, ksilol 3) birer dakika toplamda 3 dakika tutuldu. Böylece, dokudaki etanol ile ksilolün yer değiştirmesi ve dokunun şeffaflaşması sağlandı.

5. Üç parafin serisinde (parafin 1, parafin 2, parafin 3) birer saat, toplamda 3 saat bekletildi ve dokudaki ksilolün parafinle yer değiştirmesi ile tüm dokunun içine parafin girmesi sağlandı. Süre sonunda parafin içine gömülen dokular etiketlenerek kuru, nemsiz ve ışık görmeyen ortamda saklandı. Mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alınan doku örnekleri, hematoksilin&eozin boyaması için kullanıldı.

3.3. Hematoksilin&Eozin Boyaması

1. Mikrotom yardımıyla 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve 60 °C’de 1 gece boyunca dokunun lama yapışması sağlandı.

2. İki ksilol serisinde (ksilol 1, ksilol 2) onar dakika, toplamda 20 dakika bekletilerek parafinin dokudan uzaklaşması sağlandı.

3. %100, %90, %80, %70’lik etanol serilerinde beşer dakika bekletildi ve ksilol ile etanolün yer değiştirerek ksilolün uzaklaştırılması sağlandı. Azalan etanol serisi ile dokunun içindeki su, kademeli olarak artırıldı. Distile su içinde 5 dakika bekletilerek, dokunun tamamen su ile yıkanması sağlandı.

4. Hematoksilin boyasında 1 dakika tutuldu ve çeşme altında akarsu ile bolca yıkandı. Böylece çekirdeklerin boyanması sağlandı.

5. Eozin boyasında 30 saniye tutuldu ve çeşme suyunda yıkandı. Böylece, sitoplazmanın boyanması sağlandı.

6. %70, %80, %90’lık etanolde daldır-çıkartma tekniği ile 3’er saniye bekletildi ve %100’lük etanolde 5 dakika bekletildi. Böylece, dokudaki su kademeli olarak uzaklaştırıldı.

7. İki ksilol serisinde (ksilol 1, ksilol 2) 10'ar dakika bekletildi ve dokudaki etanol ile ksilolün yer değiştirmesi sağlandı.

8. Entellan ile kapama yapıldı ve kuruması için 1 gün muhafaza edildi. Süre sonunda dokuların fotoğrafları Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakóltesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalına zimmetli "Nikon Eclipse E200 MQD42070" marka kamera, "Dell Optiplex 3020" marka bilgisayar ile "Kameram" programında fotoğraflandırıldı.

3.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (q RT-PCR) Deneyi

Kantitatif gerçek zamanlı PCR, preekleptik insan plasentasında TERRA ekspresyonu mRNA düzeyinde miktarsal olarak değerlendirildi. mRNA izolasyonu, izole edilen mRNA'lardan reverse transkripsiyon ile cDNA eldesi ve elde edilen cDNA örnekleri ile real-time PCR yapılarak amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. Total RNA İzolasyon Basamakları

Kontrol ve preekleptik plasentanın maternal ve fetal yüzlerinden eşit olacak şekilde 0.1 gr trimlendi ve RNA izolasyonu manuel olarak yapıldı.

1. Trimlenen plasenta parçası 1.5 ml'lik tüpe alınarak üzerine 1 ml TRIzol reagent eklendi ve homojenizatör yardımıyla iyice parçalara ayrılması sağlandı.

2. Tüp, oda ısısında 5 dakika inkübe edildi ve süre sonunda 200 µl kloroform eklendi ve 3 dakika daha oda ısısında inkübe edildi.

3. İnkübasyon sonunda tüp 15 dakika +4 °C'de, 13200 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüpte 3 faz ayrılır: en altta protein, ortada DNA ve en üstte ise RNA. RNA'nın bulunduğu şeffaf kısım mikropipet yardımıyla 1.5 ml'lik ependorfa alındı.

4. Tüpün içine 500 µl izopropanol eklendi ve pipetaj yapılarak oda ısısında 10 dakika inkübe edildi. +4 °C'de 13200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve dipte kalan peletin üstüne 1 ml %70 etanol eklenerek yavaşça pipetaj yapıldı.

5. 10 dakika +4 °C'de 13200 rpm'de santrifüj edildi ve yine supernatant atıldı. Dipte kalan peletten %70 etanolün tamamen uzaklaşması için ağzı açılarak havada kuruması sağlandı.

6. Etanol tamamen uzaklaştığında ise üzerine 50 µl nükleaz içermeyen su eklendi ve oda ısısında çözünmesi sağlandı.

7. Tamamen çözündüğünde DNaz uygulaması için nano drop ile miktar tayini yapıldı.

3.4.2. DNaz Uygulaması

1. Miktarı belirlenen RNA, 0.2 ml'lik tüpe 10 µg'lık hacimde alınarak aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi örnekler hazırlandı.

Tablo3.1. DNaz uygulaması için bir tüpe konması gereken kimyasallar ve miktarları

Malzeme	Miktar
Elde edilen RNA	10 µg'lık µl'lik hacimde
Dnaz I enzimi	1 µl
10X Dnaz I tampon	10 µg'lık hacmin %10'u kadar µl
Nükleaz içermeyen su	12 µl'ye tamamlandı

Hazırlanan örnekler, 37 °C'de 45 dakika termal cycle cihazında inkübe edildi.

2. İnkübasyon sonunda, tüpe 1.2 µl DNaz I inaktivasyon solüsyonu eklendi ve pipetaj yapılarak 2 dakika oda ısısında inkübe edildi. 13200 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant yeni 0.2 ml'lik bir tüpe alındı.

3. Tüp tekrar 13200 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve yine süpernatant 0.2 ml'lik yeni bir tüpe aktarıldı. DNaz inaktive edilen örneklerde, nano drop yardımıyla miktar tayini yapıldı. Örnekler -20 °C buzdolabında saklandı.

3.4.3. Komplementer DNA (cDNA) Eldesi

1. Miktarı belirlenen RNA örneği ile aşağıda tabloda belirtildiği gibi örnekler hazırlandı.

Tablo 3.2. cDNA eldesinde ikincil kıvrımların açılması aşamasında bir tüpe konması gereken kimyasallar ve miktarları

Malzeme	Miktar
RNA örneği	2 µg'lık hacimde
Random dekamer	2 µl
Nükleaz içermeyen su	12 µl'ye tamamlandı

Hazırlanan örnekler, 85 °C'de 3 dakika boyunca termal cycle cihazında inkübe edildi.

2. Süre sonunda aşağıdaki tabloda belirtilen karışım hazırlandı ve tüpün üzerine eklendi.

Tablo 3.3. cDNA eldesinde bir tüpe konması gereken kimyasallar ve miktarları

Malzeme	Hacim	Son konsantrasyon
10X tampon RT	2.0 µl	1X
dNTP (her bir dNTP 2.5 mM)	4.0 µl	0.5 mM/ her bir dNTP
RNaz inhibitörü (10 unit/µl)	1.0 µl	10 unit/ 20 µl reaksiyon karışımında
MMLV-geri transkriptaz	1.0 µl	100 unit/ 20 µl reaksiyon karışımında

Hazırlanan bu karışım (toplam 8 µl) reaksiyon tüpüne eklendi ve 44 °C'de 60 dakika ve 95 °C'de 10 dakika termal cycle cihazında inkübe edildi.

3. İnkübasyon sonunda elde edilen cDNA, -20 °C'de saklandı.

3.4.4. Kantitatif Real Time PCR (q RT-PCR) Uygulaması

TERRA transkripsiyon miktarını belirlemek için primer 1, primer 2, primer 3 primerleri için aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi reaksiyon tüpleri hazırlandı ve termal cycle cihazında inkübe edildi.

Tablo 3.4. q RT-PCR reaksiyonunda bir tüpe konması gereken kimyasallar ve miktarları

Malzeme	Miktar
2X SybrGreen Supermix	12.5 µl
Primer Forward	0.5 µl
Primer Reverse	0.5 µl
Nükleaz içermeyen su	10.5 µl
cDNA	1 µl

Kantitatif gerçek zamanlı PCR deneyi, “Qiagen Rotor-Gene Q” cihazında “Rotor-Gene Q Software” programında aşağıda verilen sıcaklık ve zaman çizelgesine uygun olarak analiz gerçekleştirildi.

Tablo 3.5. q RT-PCR reaksiyonunda uygulanan sıcaklık değerleri ve süreleri

Ayar	Başlangıç Denatürasyonu	Denatürasyon	Annealing	Extension
Sıcaklık	95 °C	95 °C	51 °C	72 °C
Zaman	3 dakika	20 saniye	20 saniye	30 saniye

Tablo 3.6. q RT-PCR deneyinde kullanılan primer dizilimleri (Montero ve ark., 2016)

Primer Adı	Primer Dizilimleri (5'-3') 20q
Primer 1 İleri	20q-qpcr CTGGTGCCAGAGTGGATT
Primer 1 Geri	20q-qpcr CACCTGTTCTCTTTGTCTGG
Primer 2 İleri	20q-qpcr ACATGGGCGATACTCAGG
Primer 2 Geri	20q-qpcr CCCACTACTGTGCCTCAA
Primer 3 İleri	20q-qpcr GAAGTTGCTGGGTTCTATGG
Primer 3 Geri	20q-qpcr ATGGTGCAGACACTGTGG

Preekleptik insan plasentası (n=6) ve kontrol plasentası (n=6) örneklerinin her birinden yukarıda anlatıldığı gibi cDNA izolasyonu yapıldı. TERRA transkriptleri için tasarlanan primerler (Primer 1, Primer 2, Primer 3) için q RT-PCR analizi yapıldı. Her bir Primer için ayrı reaksiyon tüpleri hazırlandı ve tüm örnekler üçer kez tekrar edildi. Deney sonuçlarından elde edilen Ct (siklus eşiği) değerleri, istatistiksel değerlendirme yapıldı.

3.5. İstatistiksel Değerlendirme

Preeklampsi (n=6) ve kontrol (n=6) gruplarında her bir örnek için Primer 1, Primer 2, Primer 3 primerleri ile analiz edildi. Elde edilen Ct (siklus eşiği) değerlerinden $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri Windows 7 Microsoft Excel 2010 programı ile hesaplandı. Elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri, Windows için GraphPad Prism 5 kullanılarak grafiklendirildi ve anlamlılıkları *t-testi* ile değerlendirildi. $P<0.05$; istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Rutin Işık Mikroskobisi Bulguları

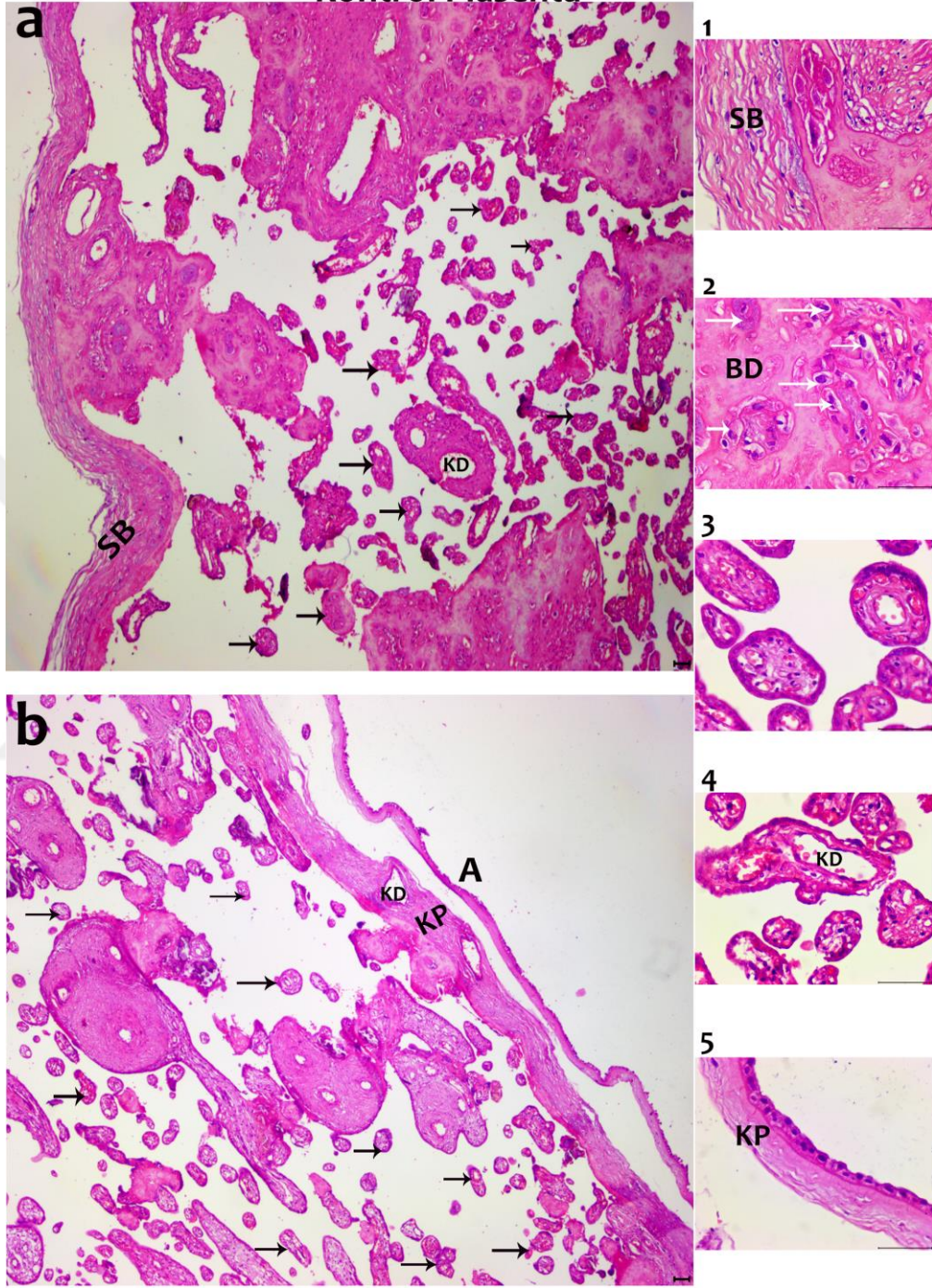
Hematoksilen&eoizin boyama yöntemi uygulanan preekleptik insan plasentası ve kontrol plasenta örnekleri, ışık mikroskobu ile incelendi.

Şekil 4.1.a ve 4.2.a'da plasentanın maternal yüzeyinden plasentanın içine uzanan bir kesit gösterilmektedir. Bazal plak ya da stratum bazale (SB) mikrografın sol tarafında görülmektedir. Stratum bazale, uterusun koryonik villuslarının bazılarının sabitlendiği parçasıdır. Stratum bazalenin bir parçası olan stromal bağ dokusu (BD)'da belirgin şekilde görülmektedir. Stratum bazalenin ve bağ dokusu yapısındaki stromanın içinde bağ dokusu hücrelerinden gelişen kümeler halinde bulunan ve epitelyal görünüme sahip desidual hücreler (kırmızı oklarla gösterilmiştir) bulunur. Farklı büyüklüklerdeki villusların içinde bulunan kan damarları (KD) belirgindir. küçük villuslar, karşılıklı değişimin gerçekleştiği kapillerleri içermektedir.

Şekil 4.1.b ve 4.2.b'de plasentanın fetal yüzeyinden plasentanın içine uzanan bir kesit gösterilmektedir. Amniyon (A), koryonik plak (KP) ve koryonik villuslar görülmektedir. Amniyon, tek katlı kübik epitelle çevrilidir ve epitelin altında bağ dokusu yer almaktadır. Koryonik plak, umbilikal arterlerin ve venin dallarını içeren kalın bir bağ dokusu kütesidir. Arterlerin ve venin ayrımını yapmak hematoksilen&eoizin boyamasıyla mümkün değildir; bu yüzden basitçe kan damarı (KD) olarak ifade edildi. Plasenta farklı büyüklükte koryonik villuslardan oluşmaktadır. Koryonik plaktan kök villuslar çıkar ve gittikçe küçülen villuslara dallanır. Umbilikal arterlerin ve venin dalları kök villuslara girer ve villöz ağ boyunca dallanırlar.

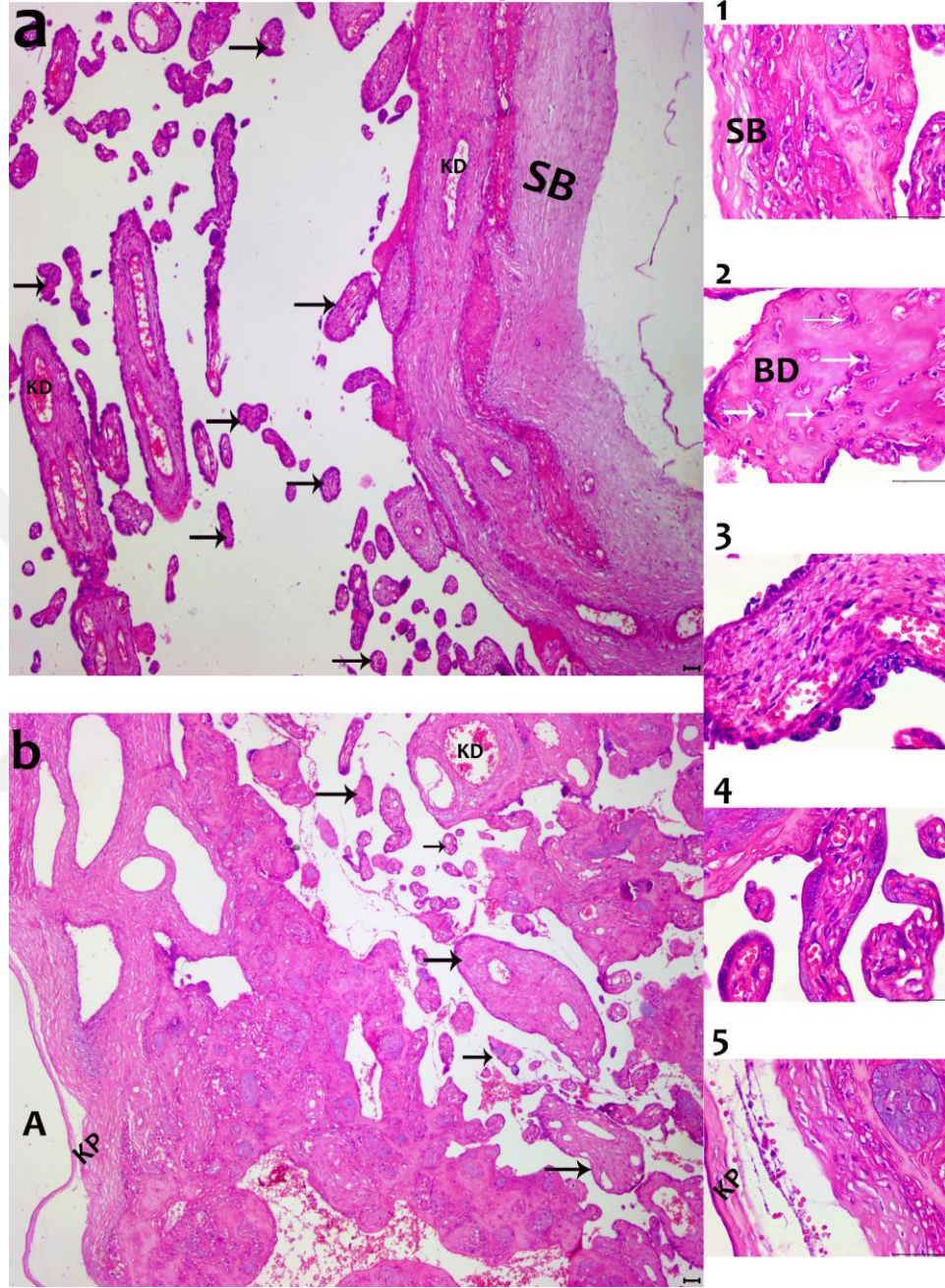
Preekleptik insan plasentası, histolojik olarak gelişmekte olan bir plasentaya benzer. Şekil 4.2'de preekleptik plasentaya ait villusların yapmış olduğu trofoblastik tomurcuklar net olarak gözlemlendi. Gelişmiş bir plasentada gözlenmeyen sitotrofoblast hücre tabakası, sinsisyotrofoblast hücrelerinin altında tek hücreli bir tabaka olarak gözlemlendi.

Kontrol Plasenta



Şekil 4.1. Kontrol plasenta kesiti **a.** Maternal yüzey. Stratum bazale (SB) ve altında farklı büyüklüklerde koryonik villuslar (siyah ok ile gösterildi) görülmektedir. Koryonik villusların içindeki içinde kan damarları (KD) gözlenmektedir. **b.** Amniyotik yüzey. Tek katlı kübik epitel ve altındaki bağ doku tabakasının oluşturduğu amniyon (A) görülmektedir. Koryonik plak (KP) görülmektedir. **1.** Stratum bazale (SB) ve koryonik villuslar. Koryonik villusların içindeki kan damarları da görülmektedir. **2.** Stratum bazalenin parçası olan bağ dokusu (BD) ve dentritik hücreler (beyaz okla gösterilmiştir). **3.** ve **4.** Koryonik villuslar. Koryonik villusları çevreleyen sinsisyotrofoblast ve bağ doku alanları içinde bulunan kan damarları belirgindir. **5.** Amniyon. Amniyonu oluşturan tek katlı kübik epitel ve altındaki bağ dokusunun oluşturduğu koryonik plak (KP) görülmektedir.

Preeklampitik Plasenta



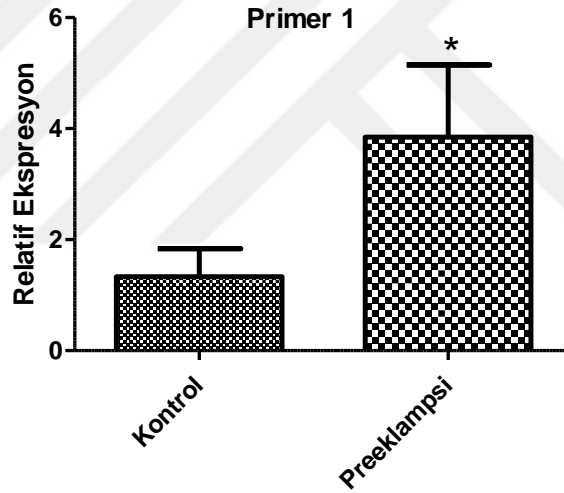
Şekil 4.2. Preeklampitik plasenta kesiti **a.** Maternal yüzey. Stratum bazale (SB) ve altında farklı büyüklüklerde koryonik villuslar (siyah ok ile gösterildi) görülmektedir. Koryonik villusların içinde kan damarları (KD) görülmektedir. **b.** Amniyotik yüzey. Tek katlı kübik epitel ve altındaki bağ doku tabakasının oluşturduğu amniyon (A) görülmektedir. Koryonik plak (KP) görülmektedir. **1.** Stratum bazale (SB) ve koryonik villuslar. Koryonik villusların içindeki kan damarları da görülmektedir. **2.** Stratum bazalenin parçası olan bağ dokusu (BD) ve dentritik hücreler (beyaz okla gösterilmiştir). **3.** ve **4.** Koryonik villuslar. Koryonik villusları çevreleyen sinsisyotrofoblast ve bağ doku alanları içinde bulunan kan damarları belirgindir. Gelişmekte olan plasentalarda belirgin olarak gözlemlenen sinsisyotrofoblastların oluşturduğu tofoblastik tomurcuklar da görülmektedir. Sinsisyotrofoblast tabakasının altında yer alan sitotrofoblast hücreleri de görülebilmektedir. **5.** Amniyon. Amniyonu oluşturan tek katlı kübik epitel ve altındaki bağ dokusunun oluşturduğu koryonik plak (KP) görülmekte.

Sağlıklı gebeliğe ait plasentanın histolojik yapısı beklendiği gibi gözlendi (Şekil 4.1). Gelişmekte olan plasentada gözlenen sinsisyotrofoblastların oluşturduğu trofoblastik tomurcuklar preeklampatik plasenta örneklerinde belirgin şekilde gözlemlenmektedir (Şekil 4.2).

4.2. Kantitatif Real Time PCR (q RT-PCR) Bulguları

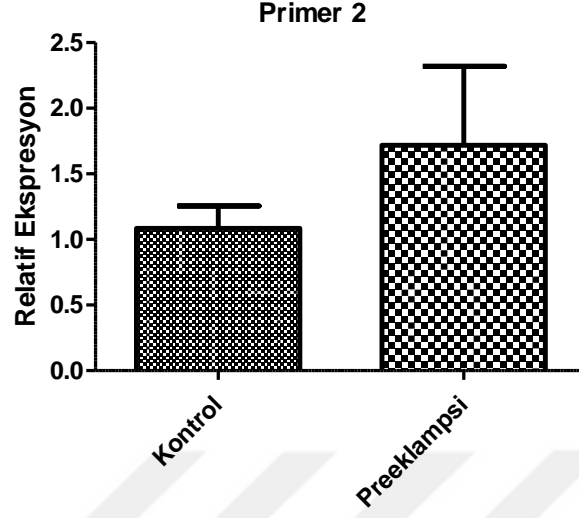
Preeklampatik insan plasenta ve kontrol plasenta örneklerinin her birinin Primer 1, Primer 2, Primer 3 için q RT-PCR analizinden elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri, t-testi ile değerlendirildi.

Preeklampsi grubunda Primer 1'in ekspresyonu mRNA düzeyinde artış göstermiştir. Bu artış, istatistiksel olarak anlamlıdır (p= 0.03) (Şekil 4.3).

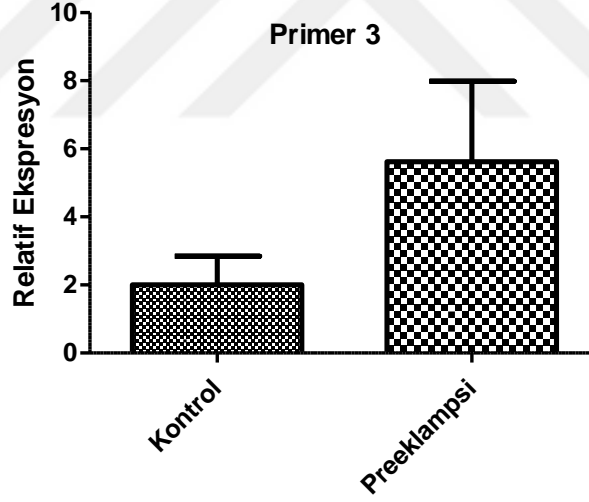


Şekil 4.3. Kontrol ve preeklampsi grubunda primer 1'in mrna düzeyinde ekspresyonunu gösteren grafik (p=0.03)

Primer 2 (p= 0.5) ve primer 3'ün (p= 0.1) ekspresyonları da kontrole göre artmıştır (Şekil 4.4, Şekil 4.5).



Şekil 4.4. Kontrol ve preeklampsi grubunda primer 2'nin mRNA düzeyinde ekspresyonunu gösteren grafik (p=0.5)



Şekil 4.5. Kontrol ve preeklampsi grubunda primer 3'ün mRNA düzeyinde ekspresyonunu gösteren grafik (p=0.1)

Primer 1, primer 2 ve primer 3'ün $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin ortalamasının alınmasıyla elde edilen verilerin Graphpad ile değerlendirilmesi sonucunda, preeklampsi grubunda TERRA ekspresyon seviyesinin mRNA düzeyinde kontrol grubuna göre arttığı gösterilmiştir (p= 0.08) (Şekil 4.6).

5. TARTIŞMA

Preeklampsi günümüzde pek çok araştırmanın konusu olmakla birlikte hastalığın temel sebebi hala tam olarak anlaşılamamıştır. Bu durum, hastalığın tedavisinde ve önlenmesinde önemli bir sorun yaratmaktadır. Preeklampside oluşan değişiklikleri açıklamak hastalığın önlenmesi ve tedavisinde önemli bir aşamadır.

Zygmunt Mackiewicz ve ark. plasenta hücrelerinin çoğunda telomeraz aktivitesinin varlığını göstermiştir (Mackiewicz, 2005). Broady ve ark.'nın gebeliğin son trimesterinde yaptıkları bir çalışma preeklemtik gebelik ve normal gebelik plasentalarında telomer boyunun değişmediğini göstermektedir (Broady ve ark., 2017). TERRA'nın telomer biyolojisinde önemli olduğu, TERRA transkriptlerinin telomerik tekrarlar da birikerek telomeraz aktivitesini engellediği ve böylece telomer boyunun kısalmasına neden olduğu daha önce yapılan pek çok çalışmada gösterilmiştir (Luke ve Lingner, 2009; Nergadze ve ark., 2009; Deng ve ark., 2010; Sampl ve ark., 2012; Redon ve ark., 2013). ICF (immün yetmezlik, sentromerik bölge dengesizliği ve yüz anomalisi) sendromu görülen hastalardan elde edilen fibroblastlarda ve çeşitli insan hücrelerinde yapılan deneylerde telomer boyunun azalması ile TERRA transkripsiyon seviyesinin arttığı sonucuna varılmıştır (Azzalin ve Lingner, 2015; C. Wang ve ark., 2015). Bizim çalışmamız, preeklemtik plasentada TERRA transkripsiyon seviyesinin normal gebeliğe oranla arttığını göstermektedir. Bu da, TERRA seviyesine bağlı olarak telomer boyunda bir değişiklik olması gerektiği anlamına gelir. Bu bulgumuz, Broady ve ark.'nın yaptığı çalışma ile çelişirken (Broady ve ark., 2017), çeşitli hastalık durumlarında TERRA transkripsiyon seviyesinin arttığını, telomer boyunun kısaldığını söyleyen çalışmalarla (Azzalin ve Lingner, 2015; Cusanelli ve Chartrand, 2015; C. Wang ve ark., 2015) uyumludur. Bu hastalıklardaki telomer kısalmasının sebebi, TERRA'nın aşırı ekspre olması olabilir.

Yapılan çalışmalar, HeLa (insan servikal karsinom hücre hattı), HLF (insan akciğer fibroblast hücre hattı), HEK293 (insan embriyonik böbrek hücre hattı), HTC116 (insan kolorektal karsinom hücre hattı), U2OS (insan osteosarkom kemik iliği hücre hattı) hücre hatlarında farklı transkripsiyon seviyelerinde TERRA'nın varlığını göstermiştir

(Porro ve ark., 2010; Montero ve ark., 2016). Bu çalışma, sağlıklı gebelerin plasentalarında ve preeklampitik gebelerin plasentalarında 20q TERRA transkripsiyonunun varlığını gösteren ilk çalışmadır.

Preeklampitik plasentada TERRA transkripsiyon seviyesinin artması; TERRA transkripsiyon seviyesinin preeklampsi tanısında biyobelirteç olarak kullanılabileceği anlamına gelmektedir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma, insan normal gebelik ve preeklemtik gebelik plasentasında fonksiyonel TERRA transkripsiyonunu gösteren ilk çalışmadır.

Bu çalışma, preeklemtik plasentada TERRA ekspresyonunun kontrole göre arttığını göstermektedir. Bu da telomer boyundaki kısalmanın TERRA transkripsiyonunun artması nedeniyle meydana gelmiş olabileceğini göstermektedir.

Daha önce TERRA'nın hangi kromozomdan sentezlendiği bilinmemekteydi. Montero ve arkadaşları fonksiyonel TERRA'nın 20q kromozomundan sentezlendiğini göstermiştir. TERRA üzerine yapılan çalışmalar farklı kromozomlar üzerinde durmaktadır. Bu durum bizlere TERRA'nın hangi kromozomdan sentezlendiğinin kesinleşmesi gerektiğini ve yapılan çalışmaların ortak bir paydada buluşması gerektiğini göstermektedir.

TERRA transkripsiyonunun artması, preeklampside kromozom kararlılığında bir dengesizlik olduğu anlamına gelebilir. Bu da, preeklemtik plasentada kromozom stabilitesinin detaylı bir şekilde araştırılması gerektiğini göstermektedir.

TERRA transkriptleri telomerik tekrarların korunmasında ve boyunun düzenlenmesinde görevlidir. Bu yüzden, sağlıklı gebelik plasentasında telomer boyu, telomeraz aktivitesi ve TERRA transkripsiyonu birlikte ele alınarak incelenmeli ve fonksiyonel ilişkisi değerlendirilmelidir. Preeklaptik plasentada da telomer boyu, telomeraz aktivitesi ve TERRA transkriptleri incelenerek olası fonksiyon bozukluğu açıklanabilir.

KAYNAKLAR

Arora, R., & Azzalin, C. M. Telomere elongation chooses terra alternatives. *RNA biology*. 2015; 12 (9): 938-941.

Arsenis, N. C., You, T., Ogawa, E. F., Tinsley, G. M., & Zuo, L. Physical activity and telomere length: Impact of aging and potential mechanisms of action. *Oncotarget*. 2017.

Assani, G., Xiong, Y., Zhou, F., & Zhou, Y. Effect of therapies-mediated modulation of telomere and/or telomerase on cancer cells radiosensitivity. *Oncotarget*. 2018; 9 (79): 35008-35025.

Ayansina, D., Black, C., Hall, S. J., Marks, A., Millar, C., Prescott, G. J., . . . Bhattacharya, S. Long term effects of gestational hypertension and pre-eclampsia on kidney function: Record linkage study. *Pregnancy hypertension*. 2016; 6 (4): 344-349.

Azzalin, C. M., & Lingner, J. Telomere functions grounding on terra firma. *Trends in cell biology*. 2015; 25 (1): 29-36.

Benetos, A., Okuda, K., Lajemi, M., Kimura, M., Thomas, F., Skurnick, J., . . . Aviv, A. Telomere length as an indicator of biological aging: The gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. *Hypertension*. 2001; 37 (2 Pt 2): 381-385.

Blackburn, E. H., Epel, E. S., & Lin, J. Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science*. 2015; 350 (6265): 1193-1198.

Bokslag, A., Teunissen, P. W., Franssen, C., van Kesteren, F., Kamp, O., Ganzevoort, W., . . . de Groot, C. J. M. Effect of early-onset preeclampsia on cardiovascular risk in the fifth decade of life. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2017; 216 (5): 523 e521-523 e527.

Bonney, E. A., Krebs, K., Saade, G., Kechichian, T., Trivedi, J., Huaizhi, Y., & Menon, R. Differential senescence in feto-maternal tissues during mouse pregnancy. *Placenta*. 2016; 43: 26-34.

Broady, A. J., Loichinger, M. H., Ahn, H. J., Davy, P. M., Allsopp, R. C., & Bryant-Greenwood, G. D. Protective proteins and telomere length in placentas from patients with pre-eclampsia in the last trimester of gestation. *Placenta*. 2017; 50: 44-52.

Calado, R. T., & Young, N. S. Telomere maintenance and human bone marrow failure. *Blood*. 2008; 111 (9): 4446-4455.

Cusanelli, E., & Chartrand, P. Telomeric repeat-containing rna terra: A noncoding rna connecting telomere biology to genome integrity. *Frontiers in genetics*. 2015; 6: 143.

Cushen, S. C., & Goulopoulou, S. New models of pregnancy-associated hypertension. *American journal of hypertension*. 2017; 30 (11): 1053-1062.

Davinelli, S., Trichopoulou, A., Corbi, G., De Vivo, I., & Scapagnini, G. The potential nutrigenoprotective role of mediterranean diet and its functional components on telomere length dynamics. *Ageing research reviews*. 2018; 49: 1-10.

de Punder, K., Heim, C., Wadhwa, P. D., & Entringer, S. Stress and immunosenescence: The role of telomerase. *Psychoneuroendocrinology*. 2018; 101: 87-100.

De Vitis, M., Berardinelli, F., & Sgura, A. Telomere length maintenance in cancer: At the crossroad between telomerase and alternative lengthening of telomeres (alt). *International journal of molecular sciences*. 2018; 19 (2).

Deng, Z., Campbell, A. E., & Lieberman, P. M. Terra, cpg methylation and telomere heterochromatin: Lessons from icf syndrome cells. *Cell Cycle*. 2010; 9 (1): 69-74.

Diman, A., & Decottignies, A. Genomic origin and nuclear localization of terra telomeric repeat-containing rna: From darkness to dawn. *The FEBS journal*. 2018; 285 (8): 1389-1398.

Feuerhahn, S., Iglesias, N., Panza, A., Porro, A., & Lingner, J. Terra biogenesis, turnover and implications for function. *FEBS letters*. 2010; 584 (17): 3812-3818.

Flynn, R. L., Centore, R. C., O'Sullivan, R. J., Rai, R., Tse, A., Songyang, Z., . . . Zou, L. Terra and hnrnp1 orchestrate an rpa-to-pot1 switch on telomeric single-stranded DNA. *Nature*. 2011; 471 (7339): 532-536.

Foust-Wright, C. E., Pulliam, S. J., Batalden, R. P., Berk, T. K., Weinstein, M. M., Wakamatsu, M. M., & Phillippe, M. Hormone modulation of toll-like receptor 5 in cultured human bladder epithelial cells. *Reprod Sci*. 2017; 24 (5): 713-719.

Fragkiadaki, P., Tsoukalas, D., Fragkiadoulaki, I., Psycharakis, C., Nikitovic, D., Spandidos, D. A., & Tsatsakis, A. M. Telomerase activity in pregnancy complications (review). *Molecular medicine reports*. 2016; 14 (1): 16-21.

George, E. M., Cockrell, K., Arany, M., Stec, D. E., Rimoldi, J. M., Gadepalli, R. S. V., & Granger, J. P. Carbon monoxide releasing molecules blunt placental ischemia-induced hypertension. *American journal of hypertension*. 2017.

Gilbert, A. L., Prasad, S., & Mallery, R. M. Neuro-ophthalmic disorders in pregnancy. *Neurologic clinics*. 2019; 37 (1): 85-102.

Jylhava, J., Pedersen, N. L., & Hagg, S. Biological age predictors. *EBioMedicine*. 2017.

Kudo, T., Izutsu, T., & Sato, T. Telomerase activity and apoptosis as indicators of ageing in placenta with and without intrauterine growth retardation. *Placenta*. 2000; 21 (5-6): 493-500.

Langman, J., & Sadler, T. W. Langman's medical embryology (Fifth edition / ed.); p:

Lin, J., Smith, D. L., Esteves, K., & Drury, S. Telomere length measurement by qpcr - summary of critical factors and recommendations for assay design. *Psychoneuroendocrinology*. 2019; 99: 271-278.

Luke, B., & Lingner, J. Terra: Telomeric repeat-containing rna. *The EMBO journal*. 2009; 28 (17): 2503-2510.

Lyall, F., Bulmer, J. N., Duffie, E., Cousins, F., Theriault, A., & Robson, S. C. Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: The role of pecam-1 in normal pregnancy, preeclampsia, and fetal growth restriction. *The American journal of pathology*. 2001; 158 (5): 1713-1721.

Maaliki, D., Issa, K., Al Shehabi, T., El-Yazbi, A., & Eid, A. H. The role of alpha2-adrenergic receptors in hypertensive preeclampsia: A hypothesis. *Microcirculation*. 2018: e12511.

Mackiewicz, Z. Telomerase activity in human placenta cells. *ACTA MEDICA LITUANICA*. 2005; 12.

Magee, L. A., & von Dadelszen, P. State-of-the-art diagnosis and treatment of hypertension in pregnancy. *Mayo Clinic proceedings*. 2018; 93 (11): 1664-1677.

Mangaonkar, A. A., & Patnaik, M. M. Short telomere syndromes in clinical practice: Bridging bench and bedside. *Mayo Clinic proceedings*. 2018; 93 (7): 904-916.

Matheson, H., Veerbeek, J. H., Charnock-Jones, D. S., Burton, G. J., & Yung, H. W. Morphological and molecular changes in the murine placenta exposed to normobaric hypoxia throughout pregnancy. *The Journal of physiology*. 2016; 594 (5): 1371-1388.

McDonald, S. D., Han, Z., Walsh, M. W., Gerstein, H. C., & Devereaux, P. J. Kidney disease after preeclampsia: A systematic review and meta-analysis. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2010; 55 (6): 1026-1039.

Miri, M., Nazarzadeh, M., Alahabadi, A., Ehrampoush, M. H., Rad, A., Lotfi, M. H., . . . Dadvand, P. Air pollution and telomere length in adults: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Environ Pollut*. 2019; 244: 636-647.

Montero, J. J., Lopez de Silanes, I., Grana, O., & Blasco, M. A. Telomeric rnas are essential to maintain telomeres. *Nature communications*. 2016; 7: 12534.

Moore, K. L. *The developing human : Clinically oriented embryology* (Second edition. ed.); p:

Nergadze, S. G., Farnung, B. O., Wischnewski, H., Khoraiuli, L., Vitelli, V., Chawla, R., . . . Azzalin, C. M. CpG-island promoters drive transcription of human telomeres. *RNA*. 2009; 15 (12): 2186-2194.

Oliva-Rico, D., & Herrera, L. A. Regulated expression of the lncRNA TERRA and its impact on telomere biology. *Mechanisms of ageing and development*. 2017; 167: 16-23.

Porro, A., Feuerhahn, S., Reichenbach, P., & Lingner, J. Molecular dissection of telomeric repeat-containing RNA biogenesis unveils the presence of distinct and multiple regulatory pathways. *Molecular and cellular biology*. 2010; 30 (20): 4808-4817.

Powe, C. E., Levine, R. J., & Karumanchi, S. A. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: The role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation*. 2011; 123 (24): 2856-2869.

Redon, S., Zemp, I., & Lingner, J. A three-state model for the regulation of telomerase by TERRA and hTERT. *Nucleic acids research*. 2013; 41 (19): 9117-9128.

Report of the national high blood pressure education program working group on high blood pressure in pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2000; 183 (1): S1-S22.

Romaniuk, A., Pazel-Jaworska, A., Toton, E., Lisiak, N., Holysz, H., Krolak, A., . . . Rubis, B. The non-canonical functions of telomerase: To turn off or not to turn off. *Molecular biology reports*. 2018.

Ross, M. H., & Pawlina, W. *Histology : A text and atlas : With correlated cell and molecular biology (Fifth edition. ed.)*; p:

Sampl, S., Pramhas, S., Stern, C., Preusser, M., Marosi, C., & Holzmann, K. Expression of telomeres in astrocytoma WHO grade 2 to 4: TERRA level correlates with telomere length, telomerase activity, and advanced clinical grade. *Translational oncology*. 2012; 5 (1): 56-65.

Scantlebury, D. C., Schwartz, G. L., Acquah, L. A., White, W. M., Moser, M., & Garovic, V. D. The treatment of hypertension during pregnancy: When should blood pressure medications be started? *Current cardiology reports*. 2013; 15 (11): 412.

Schoeftner, S., & Blasco, M. A. A 'higher order' of telomere regulation: Telomere heterochromatin and telomeric RNAs. *The EMBO journal*. 2009; 28 (16): 2323-2336.

Sibai, B. M., Mabie, W. C., Shamsa, F., Villar, M. A., & Anderson, G. D. A comparison of no medication versus methyldopa or labetalol in chronic hypertension during pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1990; 162 (4): 960-966; discussion 966-967.

Solana, C., Pereira, D., & Tarazona, R. Early senescence and leukocyte telomere shortening in schizophrenia: A role for cytomegalovirus infection? *Brain sciences*. 2018; 8 (10).

Sukenik-Halevy, R., Amiel, A., Kidron, D., Liberman, M., Ganor-Paz, Y., & Biron-Shental, T. Telomere homeostasis in trophoblasts and in cord blood cells from pregnancies complicated with preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2016; 214 (2): 283 e281-283 e287.

Suranyi, A., Altorjay, A., Kaiser, L., Nyari, T., & Nemeth, G. Evaluation of placental vascularization by three-dimensional ultrasound examination in second and third trimester of pregnancies complicated by chronic hypertension, gestational hypertension or pre-eclampsia. *Pregnancy hypertension*. 2017; 8: 51-59.

Vest, A. R., & Cho, L. S. Hypertension in pregnancy. *Current atherosclerosis reports*. 2014; 16 (3): 395.

Wagner, K. D., Ying, Y., Leong, W., Jiang, J., Hu, X., Chen, Y., . . . Ye, J. The differential spatiotemporal expression pattern of shelterin genes throughout lifespan. *Aging*. 2017; 9 (4): 1219-1232.

Wang, C., Zhao, L., & Lu, S. Role of terra in the regulation of telomere length. *International journal of biological sciences*. 2015; 11 (3): 316-323.

Wang, Q., Zhan, Y., Pedersen, N. L., Fang, F., & Hagg, S. Telomere length and all-cause mortality: A meta-analysis. *Ageing research reviews*. 2018; 48: 11-20.

Wang, Z., & Lieberman, P. M. The crosstalk of telomere dysfunction and inflammation through cell-free terra containing exosomes. *RNA biology*. 2016; 13 (8): 690-695.

Whiteman, V. E., Goswami, A., & Salihu, H. M. Telomere length and fetal programming: A review of recent scientific advances. *Am J Reprod Immunol*. 2017; 77 (5).

Wilson, S. L., Liu, Y., & Robinson, W. P. Placental telomere length decline with gestational age differs by sex and tert, dnmt1, and dnmt3a DNA methylation. *Placenta*. 2016; 48: 26-33.

Xi, H., Li, C., Ren, F., Zhang, H., & Zhang, L. Telomere, aging and age-related diseases. *Aging clinical and experimental research*. 2013; 25 (2): 139-146.

Yehezkel, S., Segev, Y., Viegas-Pequignot, E., Skorecki, K., & Selig, S. Hypomethylation of subtelomeric regions in icf syndrome is associated with abnormally short telomeres and enhanced transcription from telomeric regions. *Human molecular genetics*. 2008; 17 (18): 2776-2789.

Yi, Y. H., Yang, Z., Han, Y. W., & Huai, J. Effects of rapamycin on clinical manifestations and blood lipid parameters in different preeclampsia-like mouse models. *Chinese medical journal*. 2017; 130 (9): 1033-1041.

Zhu, Y., Liu, X., Ding, X., Wang, F., & Geng, X. Telomere and its role in the aging pathways: Telomere shortening, cell senescence and mitochondria dysfunction. *Biogerontology*. 2018.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Eda	Uyruğu	T.C.
Soyadı	ORHAN	Tel no	538 346 08 18
Doğum tarihi	28.02.1994	e-posta	edaorhan@gmail.com

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Bursa Orhangazi Çok Programlı Lisesi	2012
Lisans	Uşak Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2016
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2019

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)

Burslar-Ödüller:

Yayınlar ve Bildiriler: