

## Plasental Anjiogenezde Rol Alan Genlerin Gestasyonel Diyabeti Olan Gebelerde DNA Metilasyon Profilleri

### DNA Methylation Profiles of Genes Effective in Placental Angiogenesis for Pregnants with Gestational Diabetes

Fatma Selcen ÖNDER <sup>1</sup>, Baha ORAL <sup>1</sup>

1. Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, Türkiye

#### ÖZET

**Amaç:** Gestasyonel diyabet için erken tanı ve tedavi modalitelerinin geliştirilememesinin nedeni etyopatolojilerinin aydınlatılmamış olmasıdır. Bu patolojilerde plasentanın rolünü tanımlamak önemlidir. Placenta genetik ve epigenetik faktörlerin etkisinde fetal gelişimi belirler. DNA metilasyonu değiştirilebilir epigenetik mekanizmalardandır. Günümüzde tanı ve tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Çalışmamızda GDM (Gestasyonel Diyabet) gebelerde, plasental anjiogenezde etkili genlerden VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü), PIGF (Plasental Büyüme Faktörü) ve sFLT-1 (soluble fms like tirozin kinaz) 'nin DNA metilasyon değişiklikleri değerlendirilecektir.

**Gereçler ve Yöntem:** 2016-2017 tarihlerinde Süleyman Demirel Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümü'nden takipli; 15 GDM tanılı ve 16 sağlıklı gebeden plasental örnekler alınmıştır. DNA metilasyon düzeyleri 'Yeni Nesil Sekanslama' ile belirlenmiştir. Verilerin dağılımlarına göre Manny Whitney U analizi; veriler arasındaki ilişkiler için Spearman korelasyon analizi kullanılmıştır.

**Bulgular:** Genlerin metilasyon oranları ile yaş, gebelik haftası, bebeğin cinsiyet ve ağırlığı arasında ikililer arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır ( $p>0.05$ ). Placenta ağırlığı artarken sFLT-1 geninin P92186.Pozisyondaki promotör metilasyon düzeyinin azaldığı görülmüştür. PIGF geninin metilasyon değerlerinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmamaktadır. sFLT 1 geninin bölgesel analizlerine göre P92186. , P92344., P92456. pozisyonlarındaki primer noktalarının hipometile; VEGF geninin bölgesel analizlerine göre P92668., P92710., P92863. pozisyonlarındaki primer noktalarının hipermetile olduğu saptanmıştır.

**Sonuç:** Bulgularımız literatürle uyumludur ve anjiogenezde etkili genlerin bazı lokuslarındaki DNA metilasyon değişimlerinin GDM patogenezindeki yerine katkı sağlamıştır. Ancak prediktif değere ulaşabilmesi için, geniş hasta gruplarıyla yapılacak genom çalışmaları ile ilgili gen bölgeleri netleştirilmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** DNA metilasyonu, VEGF, sFLT1, gestasyonel diyabet

#### ABSTRACT

**Objective:** The reason of absence preventive processes from GDM and early treatment modalities is unsettled etiopathologies. Defining the role of the placenta is important for these pathologies. Fetal growth is adjusted due to placental genetic and epigenetic factors. DNA methylation which is an epigenetic mechanism, is modifiable and utizable for diagnosis and treatment recently. DNA methylation changes of VEGF, sFLT-1, PIGF genes, have roles on placentation were evaluated according to GDM.

#### İletişim:

**Sorumlu Yazar:** Fatma Selcen ÖNDER

**Adres:** Süleyman Demirel Üniversitesi, Çünür Mahallesi, İstiklal Caddesi, 32000 Isparta, Türkiye

**Tel:** +90 (246) 211 10 00

**E-Posta:** f.selcencbe@gmail.com

**Makale Geliş:** 06.05.2018

**Makale Kabul:** 08.05.2018

**DOI:** <http://dx.doi.org/10.16948/zktpb.421432>

**Material and Methods:** All placental samples had taken from pregnant who routinely followed at Suleyman Demirel University Gynecology and Obstetrics Department, compatible with study criteria and diagnosed as GDM (n=15) and healthy pregnant (n=16). DNA Methylation levels were analysed by 'New Generation DNA Sequencing' method. Data collections analysed via SPSS 23 programme. Because of data distribution Manny Whitney U tests are used for means; SPEARMAN correlation analysis is used to reveal relation between datas.

**Results:** The methylation levels were not changed significantly due to demographic characteristics. The analyses that examine differences in methylation levels of PIGF were established no statistically significant difference. There was statistically significant difference in levels of methylation of sFLT-1 gene at the position of P92186. , P92344., P92456. primer regions as hypomethylated and VEGF gene at the position of P92668., P92710., P92863. primer regions as hypermethylated.

**Conclusion:** The findings of our study indicates changes of DNA methylation in some regions of VEGF, sFLT-1 genes and it is compatible with literature. But clarifying of related regions of genes via whole genom studies with a large population is necessary to reach predictive values.

**Keywords:** DNA methylation, VEGF, FLT1, gestational diabetes

## GİRİŞ

### GDM - DNA METİLYASYONU

Placenta hormonlar, sitokinler ve büyüme faktörleri aracılığıyla gebeliğin devamı ve fetal gelişimde etkilidir. Morfolojik ve fonksiyonel plasental adaptasyonlar, transport mekanizmalarını ve fetal yararlanımı etkiler (1). Placenta boyutu, ağırlığı, yüzey alanı, şekli ve vaskularitesinin gebelikte salgılanan metabolik moleküllerin etkisi altında olduğu ve fetal gelişimin bu yörüngede şekillendiği bilinmektedir. Plasental vaskularizasyon, morfolojik maturasyon ve transport fonksiyonları intrinsek (fetal-plasental genler ve gelişim programları) ve ekstrinsek faktörlerle (maternal beslenme, stres, çevresel faktörler) modifiye olmaktadır (2). Bundan yola çıkılarak yapılan çalışmalarda maternal obezite ve yetersiz beslenmenin de inutero gelişimi ve postnatal yaşamı etkilediği gösterilmiştir (3).

Obezitenin ve ileri yaşlarda gebeliklerin artmasına bağlı olarak gestasyonel diyabet insidansı da artmıştır. Gestasyonel diyabet ilk kez gebelikte tanı alan ve doğumu takiben ortadan kalkan glukoz intoleransdır. Bu hastaların sonraki yaşamlarında tip 2 diyabet gelişme riski yüksektir. Halbuki, gebelikte yapılan müdahalelerin sonuçları iyileştirdiğini gösteren kanıtlar mevcuttur (4, 5).

Gebeliğin son evresinde artan adiposite, HPL, östrojen ve prolaktin aracılı yükselen insülin rezistan-sına bağlı olarak insülin gereksinimi de artar. Çünkü GDM' lu gebelerde besinlere insülin yanıtı ve dokuların insüline yanıtı daha azdır (6). Böylece, anneden kolaylaştırılmış difüzyonla fetüse geçen glukoz, amino asitler ve yağ asitleri; fetal hiperglisemiye ve hiperinsülinemiye yol açar. Fetal hiperinsülinemi organomegali, makrozomi, neonatal hipoglisemi yanı sıra (7); organogenez defektlerine, konjenital anomalilere, akciğerde sürfaktan yapımının azalmasına bağlı respiratuar distres sendromu gelişme riskinde artışa neden olur. Fetal metabolizmanın hatalı programlanmasına bağlı olarak bu bebeklerin ileri yaşlarda obezite, tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, otizm ve nöropsikiyatrik hastalık riski de artmaktadır (8-10). Günümüzde bu durumun hiperglisemik intrauterin mikro çevrenin epigenetik aracılı etkilerinin olduğu düşünülmektedir (11).

Epigenetik, fetal gelişimsel programlama üzerinde etkili genetik ve çevresel faktörlerin birbirileri ile ilişkilerini anlamlandırmada yeni bir bakış açısı oluşturmuştur. DNA'yı değiştirmeden ve replikasyonu etkilemeden genom üzerinde oluşan bu değişikliklerin en etkili DNA metilasyonudur (12).

DNA metilasyonu gen replikasyon düzeyini etkilemesi ve geri dönüştürülebilir olması açısından da önem arz etmektedir. Daha çok aktif genler üzerindeki değişikliklerle klinik semptomlara neden olmaktadır (13). GDM' li gebelerin plasentalarında global metilasyon artışı saptayan çalışmalar mevcuttur (14). Metabolizma ve fetal ağırlığı etkileyen genlerle ilgili yapılan araştırmalarda da metilasyon değişikliklerine rastlanmıştır (15, 16). Ayrıca gen lokuslarının tek tek değerlendirildiği çalışmalarda farklı sonuçlar da elde edilmiştir (17, 18). Bu durum GDM' ye sekonder gelişen sorunlar hakkında fikir verebilir.

Hiperglisemi sonucunda proteinler, enzimatik olmayan yoldan glikozla birleşirler ve sonuçta glikolize hemoglobinin (HbA1c) ortaya çıkar. Hemoglobinin oksijen taşıma işlevi bozulur ve kapiller doku hipoksisi gelişir (19). Hipoksi ve hipoglisemiye bağlı oluşan hasar sonrası endotelial rejenerasyon sürecinde angiogenezden sorumlu PIGF ve VEGF'nin dokulardaki yoğunluğunun arttığı, buna karşın hiperglisemi ve dislipidemi varlığında VEGF yoğunluğunun azaldığı gösterilmiştir. Bu değişimde DNA metilasyon düzeyinin etkili olduğu düşünülmektedir (20-22).

GDM'li kadınlarda diyet tedavisinin amacı normoglisemi elde ederek komplikasyonları azaltmak, ketoasidozu önlemek, uygun kilo alımı sağlamak ve fetal iyilik haline katkıda bulunmaktır. Bu süreçlere geri dönüştürülebilir DNA metilasyon mekanizmalarının katkı sağlayacağını düşünüyoruz. Çalışmamızda GDM (Gestasyonel Diyabet) gebelerde, plasental angiogenezde etkili genlerden VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü), PIGF (Plasental Büyüme Faktörü) ve sFLT-1 (soluble fms like tirozinkinaz)'nin DNA metilasyon değişiklikleri değerlendirilecektir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamız; tek merkezli, multidisipliner, prospektif, olgu-kontrollü bir klinik araştırma olarak planlandı. Plasental örnekler, Ocak 2016- Şubat 2017 tarihleri arasında Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na başvuran, 18-45 yaş arasında ve son adet tarihine göre 35.-40. gebelik haftasında tekil gebeliği olan hastalardan; Süleyman Demirel Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayını takiben toplandı. Bu tarihler arasında çalışmaya bilgilendirilen ve onam formu alınan 15'i GDM grubu, 17'si sağlıklı bireyler olmak üzere toplam 32 gebe dâhil edildi.

### Primerler

FLT1 (NM\_002019), VEGF (NM\_001025366) ve PIGF (NM\_002643) genlerinin promotör bölgelerine ait diziler Ensembl veri tabanından (<http://www.ensembl.org>) indirilmiştir. Metile olabilecek CpG bölgeleri işaretlenmiş ve bisülfite çevrimine uygun olacak şekilde tüm C'ler T'ye dönüştürülmüştür. Primer tasarımı bu diziler üzerinden, PRIMER 2.0 (Scientific & Educational Software, USA) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Primer tasarımı yapılırken primer bölgelerinin üzerine CpG bölgelerinin gelmemesine dikkat edilmiştir; yalnız PIGF geni uygun geri primer bulunamadığı için bir adet CpG bölgesinin, primerin 5' ucuna yakın olmak koşulu ile primer bölgesinin üzerine gelmesine izin verilmiştir. Bu primer sipariş edilirken de bu nokta için G ve A'yı temsil eden R belirsizlik kodu (ambiguity code) kullanılarak, hem metile olma hem de metile olmama durumuna da uygun primer sentezlenmesi sağlanmıştır. Tasarlanan primeler Tablo 1' de gösterilmiştir.

**Tablo 1:** Çalışılan primer bölgelerinin tasarımı.

Primer	Oryantasyon	Sekans (5'→3')
FLT1 mthy_F1	İleri	GGAAGTAGAAGATTGAGGAAATGATTGG
FLT1 mthy_R1	Geri	TCAAAAAATCCTTACAAACTCCCTCCAC
VEGF mthy_F1	İleri	ATGTAGTTGTTTGGGAGGTTAGAAATAGG
VEGF mthy_R1	Geri	AAAATTCACAACCTAAAAATTACCCATCC
PIGF mthy_F1	İleri	GTTGGGGGAAGGTAATAGAAATAGATAAGG
PIGF mthy_R1	Geri	CCAACRAAACTTACCTAACTCTCCCTCC

### DNA İzolasyonu

DNA izolasyonları, yaklaşık 50 mg doku örneklerinden, QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc.) kullanılarak yapılmıştır. Doku örnekleri önce 200 µl distile su ve 50 µl Proteinaz K (10 mg/ml) içerisine alınmış ve dokular tamamen çözülünceye kadar (yaklaşık 1 saat) 56 °C inkübe edilmiştir. İzolatlar bir sonraki aşamaya kadar -200 C saklanmıştır.

### Primerler

Bisülfite çevrimi, EpiTect Fast Bisulfite Kit, (Qiagen, Valencia, CA, USA) kiti kullanılarak yapılmıştır. Üreticinin önerdiği protokole sadık kalınmıştır.

## PCR

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin bant uzunlukları FLT1: 436bp, VEGF: 482bp, PIGF: 586bp olarak belirlendi. Her bir örneğe ait PCR'lar birleştirilerek PCR havuzları oluşturulmuştur. PCR havuzları oluşturulurken agaroz jel elektroforezinde tespit edilen amplifikasyon miktarları, daha homojen bir havuz oluşturma amacıyla göz önüne alınmıştır; amplifikasyonu zayıf olan PCR ürünlerinden daha fazla alınmıştır.

## Sekanslama

Pürifiye ve standardize edilen PCR havuzları NexteraXT örnek hazırlama kiti (Illumina Inc.) kullanılarak, yeni nesil sekanslamaya hazır hale getirilmiştir. Miseq (Illumina Inc.) yeni nesil DNA dizileme cihazı kullanılarak sekanslama gerçekleştirilmiştir. Kit olarak MiSeq Reagent Kit v2 2x150 kullanılmıştır (MS-102-2002, Illumina Inc.).

## İstatiksel Veri Analizi

Bisülfid çevriminden sonra metile olmayan C'ler T'ye dönüştüğü için sonuçtaki C'ler C+T'ye oranlanarak metilasyon oranları hesaplanmıştır. C yerine N olarak değiştirilmiş dizi üzerine hizalanmıştır. Hizalanma sonucunda metilasyon noktalarında elde edilen C ve T okumaları belirlenmiş ve C/ (C+T) oranı 100 ile çarpılarak her bir nokta için yüzde metilasyon oranı hesaplanmıştır. Ayrıca her bir gen için 4-6 adet metile olma ihtimali olmayan (CpG olmayan) C noktası seçilmiş ve bu noktalardan elde edilen yüzde metilasyon oranları ile arkaplan gürültü hesaplanmıştır. Verilerin analizi için SPSS 23 programı kullanılmıştır. Öncelikle katılımcılara ait betimsel istatistikler sayı ve yüzde olarak her grup ve kategori için ayrı ayrı hesaplanmıştır. SPSS'te yapılacak analiz türünü seçmek için verilerin dağılımına bakılmış ve verilerin normal dağılım özelliği göstermediği ayrıca örneklem sayısının normal dağılım için yetersiz olduğu görülmüştür. Bu doğrultuda 2 bağımsız grubun ortalamalarını karşılaştırmak için Manny Whitney U analizi yapılmıştır. Diğer taraftan aralarında ilişki olup olmadığı incelenen değişkenler arasında nasıl bir ilişki olduğunu ortaya çıkarmak için Spearman korelasyon analizi yapılmıştır. Sonuçlar .05 manidarlık düzeyinde rapor edilmiştir.

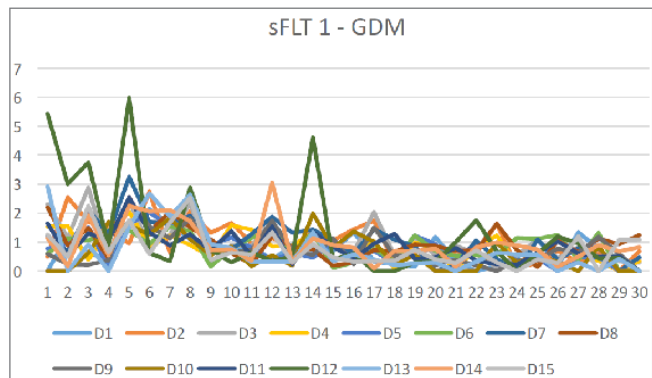
## BULGULAR

Araştırmaya katılan örneklem gruplarına ait betimsel bulgular Tablo 2'de yer almaktadır. Her iki grupta da benzer dağılım olmasına özen gösterildi. Preeklampsi, hipertansiyon, tiroit bozukluğu gibi komorbidite gelişen GDM li gebeler çalışmadan çıkarıldı.

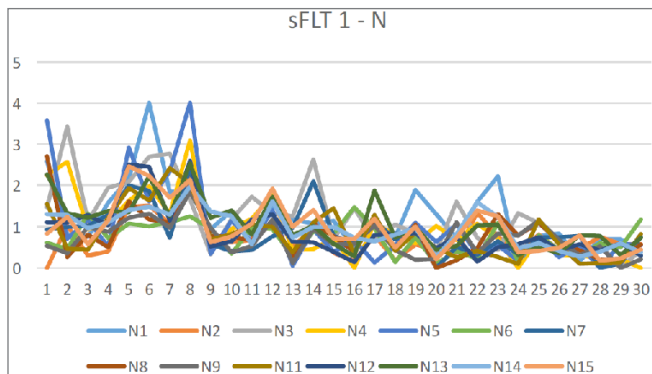
Gestasyonel diyabeti olan ve tamamen sağlıklı olan gebelerden alınan plasental örneklerde bakılan genlerin lokuslarının DNA metilasyon düzeyleri grafiklerde belirtilmiştir (Grafik 1, 2, 3, 4, 5, 6) Primer tasarımı içinde olan FLT1 geninden 30, VEGF geninden 24 ve PIGF geninden 29 nokta incelenmiştir.

**Tablo 2:** Katılımcılara Ait Demografik Bilgiler Tablosu.

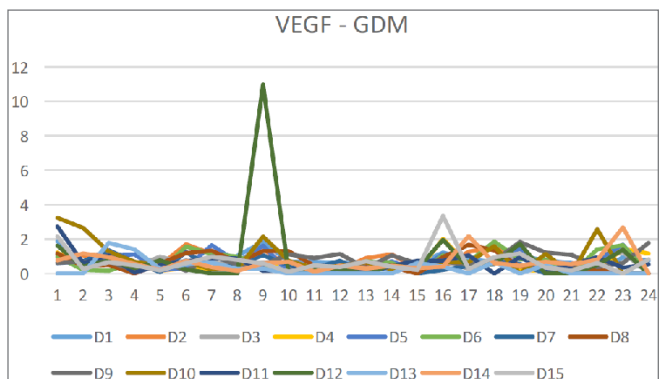
Demografik Değişken	Kategori	N		%	
		Sağlıklı Birey	Diyabetli Birey	Sağlıklı Birey	Diyabetli Birey
Yaş	20-29 yaş	5	5	31,3	33,3
	30-39 yaş	9	8	56,3	53,3
	40-45 yaş	2	2	12,5	13,3
Gebelik Günü	245-259gün	4	4	25,0	26,7
	260-280gün	12	11	75,0	73,3
Plasenta Ağırlığı	450-650gr	11	7	68,8	46,7
	651-1000gr	5	8	31,3	53,3
Bebek Kilo	1900-2700gr	3	2	18,8	13,3
	2701-3300gr	9	7	56,3	46,7
	3301-4000gr	3	3	18,8	20,0
	4001-5000gr	1	3	6,3	20,0
Bebek Cinsiyet	Kız	8	9	50,0	60,0
	Erkek	8	6	50,0	40,0



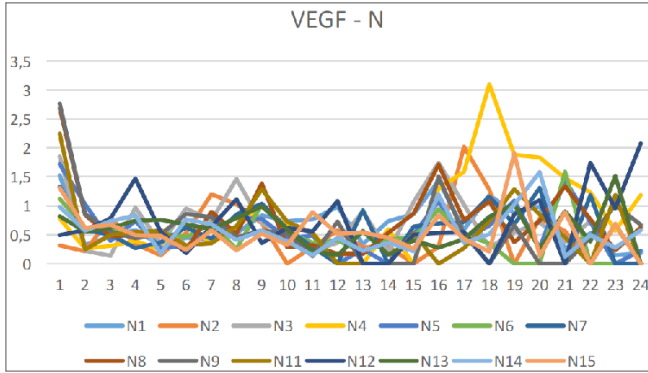
**Grafik 1:** GDM gebelerin sFLT 1 gen bölgelerine ait metilasyon değerleri.



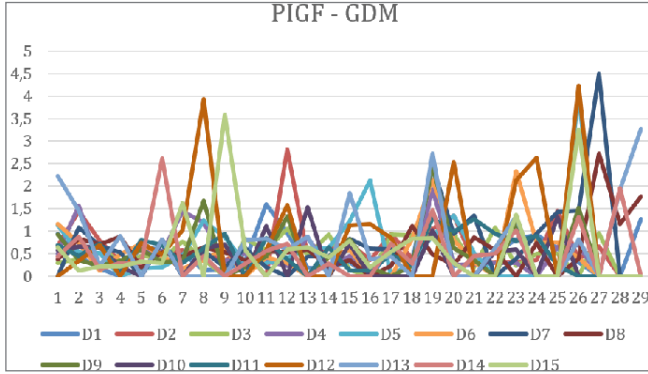
**Grafik 2:** Sağlıklı bireylerin sFLT 1 gen bölgelerine ait metilasyon değerleri.



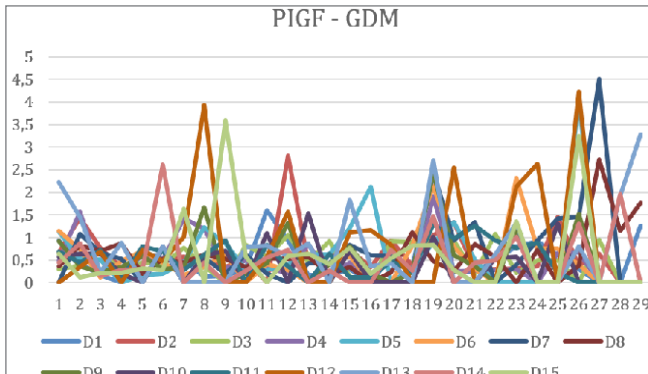
**Grafik 3:** GDM gebelerin VEGF gen bölgelerine ait metilasyon değerleri.



Grafik 4: Sağlıklı bireylerin VEGF gen bölgelerine ait metilasyon değerleri.



Grafik 5: GDM gebelerin PIGF gen bölgelerine ait metilasyon değerleri.



Grafik 6: Sağlıklı bireylerin PIGF gen bölgelerine ait metilasyon değerleri.

Gestasyonel Diyabet olan gebeler ile sağlıklı bireylerin sFLT-1 geni promoter metilasyon düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığını ortaya çıkarmak için yapılan Manny Whitney U analizi sonucunda sFLT-1 geninde bakılan 30 primer bölgesinin 3'ünde anlamlı farklılık bulunmuştur (Tablo 3) P92186. Pozisyondaki primer bölgesi, sağlıklı bireylerin sıra ortalaması (19,75) ile Gestasyonel Diyabet olan gebelerin sıra ortalaması (12,00) arasında anlamlı bir fark görülmüştür ( $U=-2,372$ ,  $p=,018$ ). P92344. Pozisyondaki primer bölgesi, sağlıklı bireylerin sıra ortalaması (19,19) ile Gestasyonel Diyabet olan gebelerin sıra ortalaması (12,60) arasında anlamlı bir fark görülmüştür ( $U=-2,016$ ,  $p=,044$ ). P92456. Pozisyondaki primer bölgesi, sağlıklı bireylerin sıra ortalaması (19,25) ile Gestasyonel Diyabet olan gebelerin sıra ortalaması (12,53) arasında anlamlı bir fark görülmüştür ( $U=-2,055$ ,  $p=,040$ ). Diğer bir ifade ile Gestasyonel Diyabet olan gebelerin P92186. , P92344. , P92456. Pozisyondaki primer bölgeleri metilasyon düzeyleri sağlıklı bireylerden daha düşük saptanmıştır.

Tablo 3: Gestasyonel Diyabet olan gebeler ile sağlıklı bireylerin sFLT-1 geni promotör metilasyon düzeylerinin karşılaştırılması.

sFLT-1	Gruplar	N	Sıra Ortalaması	Sıra Toplam	U	p
P92186	Sağlıklı Birey	16	19,75	316,00	-2,372	,018
	Diyabetli Birey	15	12,00	180,00		
P92344	Sağlıklı Birey	16	19,19	69,00	-2,016	,044
	Diyabetli Birey	15	12,60	198,00		
P92456	Sağlıklı Birey	16	19,25	68,00	-2,055	,040
	Diyabetli Birey	15	12,53	188,00		

Gestasyonel Diyabet olan gebeler ile sağlıklı bireylerin VEGF geni promoter metilasyon düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığını ortaya çıkarmak için yapılan Manny Whitney U analizi sonucunda bakılan 24 bölgenin 3'ünde anlamlı farklılık bulunmuştur.

P92668. Pozisyondaki primer bölgesi, sağlıklı bireylerin sıra ortalaması (11,31) ile Gestasyonel Diyabet olan gebelerin sıra ortalaması (21,00) arasında anlamlı bir fark görülmüştür ( $U=-2,965$ ,  $p=,003$ ). (Tablo 4) P92710. Pozisyondaki primer bölgesi, sağlıklı bireylerin sıra ortalaması (11,94) ile Gestasyonel Diyabet olan gebelerin sıra ortalaması (20,33) arasında anlamlı bir fark görülmüştür ( $U=-2,569$ ,  $p=,010$ ). P92863. Pozisyondaki primer bölgesi, sağlıklı bireylerin sıra ortalaması (12,19) ile Gestasyonel Diyabet olan gebelerin sıra ortalaması (20,07) arasında anlamlı bir fark görülmüştür ( $U=-2,411$ ,  $p=,016$ ). Diğer bir ifade ile Gestasyonel Diyabet olan gebelerin P92668. , P92710. , P92863. Pozisyondaki primer bölgesi metilasyon düzeyi sağlıklı bireylerden daha yüksek çıkmıştır.

Tablo 4: Gestasyonel Diyabet olan gebeler ile sağlıklı bireylerin VEGF geninin lokuslarının metilasyon düzeylerinin karşılaştırılması.

VEGF	Gruplar	N	Sıra Ortalaması	Sıra Toplam	U	p
P92668	Sağlıklı Birey	16	11,31	181,00	-2,965	,003
	Diyabetli Birey	15	21,00	315,00		
P92710	Sağlıklı Birey	16	11,94	191,00	-2,569	,010
	Diyabetli Birey	15	20,33	305,00		
P92863	Sağlıklı Birey	16	12,19	195,00	-2,411	,016
	Diyabetli Birey	15	20,07	301,00		

Gestasyonel Diyabet olan gebeler ile sağlıklı bireylerin sFLT-1 ve VEGF genlerinde bulunan ve aralarında anlamlı farklılık çıkan lokusların (P92186, P92344, P92456, P92668, P92710, P92863) metilasyon düzeyleri ile demografik değişkenler (Yaş, Gebelik Günü, Plasenta Ağırlığı, Bebek Kilosu) arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığını ortaya çıkarmak için yapılan Spearman Korelasyon analizi sonucunda, sağlıklı bireylere ait P92186. Pozisyondaki primer bölgesi metilasyon düzeyi ile Plasenta ağırlığı arasında negatif yönde ve orta düzeyde ilişki görülmüştür ( $r=-,533$ ,  $p=,034$ ). Diğer lokusların metilasyon düzeyleri ile demografik değişkenler arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir ( $p>0,05$ ). Diğer bir ifade ile Plasenta ağırlığı artarken sFLT-1 genine ait P92186. Pozisyondaki primer bölgesi metilasyon düzeyi azalmaktadır.

## TARTIŞMA

Bizim çalışmamız gestasyonel diyabetli hastaların plasental DNA metilasyonunu inceleyen ülkemizdeki ilk çalışmadır. Ayrıca bilgilerimize göre anjiogenezde rol alan VEGF, PIGF ve sFLT-1 genlerinin metilasyon profillerinin birlikte değerlendirildiği literatürdeki ilk çalışma niteliğindedir.

DNA metilasyonu, GDM li gebeliklerin uzun dönem morbiditeleri için mekanizmal öneme sahiptir. Son zamanlarda DNA metilasyon defeklerinin ovaryan fonksiyonlardan başlayarak, fertilizasyon, implantasyon ve embriyogenezde de içine alarak tüm gebelik sürecini etkilediği çalışmalarda gösterilmiştir (23). Fetomaternal serumlar ve kord kanı ile yapılan çalışmalarda GDM'ye bağlı DNA metilasyon profillerinde farklılıklar saptanmıştır (16, 24, 25). Ancak plasental örnekler ile yapılan az sayıda insan çalışması bulunmaktadır.

Genetik ve çevresel faktörler, plasental yapı ve fetal büyümede önem taşır. Bu süreçte oluşan epimutasyonlar hem intrauterin gelişimi hem de postnatal yaşamı etkilemektedir (26). Promotör dizilerdeki CpG adacıklarında meydana gelen hipermetilasyon bu genleri inaktive eder (27). Hem implantasyon hem de pre-implantasyon sürecinde yer alan, trofoblastik doku ve desiduada bol miktarda ekprese edilen, anjiogenetik özelliklere sahip VEGF, PIGF ve reseptörleri sFLT-1 DNA metilasyon profilleri hakkında gebelerde çok az çalışma mevcuttur. Anjiogenezin plasentanın gelişim ve büyüklüğüne etkisi aşikârdır. Bizim çalışmamızda da plasenta ağırlığı artarken sFLT-1 genine ait P92186. Pozisyonundaki primer bölgesi metilasyon düzeyi azaldığı tespit edilmiştir.

Januar ve ark insan plasental fonksiyonlara göre gebelik sonuçlarının epigenetik düzenlenmelerle nedensel ilişkisini değerlendirmişlerdir (28). DNA metilasyonun klinik anlamının çoklu gen fonksiyonuna bağlı olduğunu göstermişlerdir. Chen ve ark çalışması da bu sonucu desteklemiştir (29). GDM hem anjiogenez hem de plasental remodellingi etkilemektedir. Bu nedenle biz çalışmamız için plasental anjiogenezde birlikte rol alan VEGF, PIGF ve sFLT-1 genlerini seçtik.

Yang ve ark embriyonal dönemde anjiogenezde önemli rolü olan VEGF'nin eksikliğinde konjenital anomalilerin arttığını göstermişlerdir. Diyabetli ve obez gebelerde insülin rezistansı, hiperinsülinemi, hiperglisemi endotelial disfonksiyonu ve apoptozisi tetikler. Endotelial apoptozis ise konjenital anomalilerin oluşma mekanizmasındaki ana nedenlerdendir. VEGF ekspresyonu üzerindeki etkinin metilasyon aracılı olabileceği düşünülmektedir. Böyle gebeler için VEGF takviyesinin tedavide kullanılabileceği düşünülmektedir (21). Ancak tüm bu tedavilerin de epigenetik etkilerinin ileri yaşamı ve hatta kalıtımı etkileyebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Çalışmamız bu mekanizmanın

aydınlatılmasına katkı sağlamıştır. Liu ve ark PE ve GDM hastalarının plasental metilasyon profillerini değerlendirmişler ve her iki grupta çalıştıkları genlerde her iki hastalık için de bazı lokuslarda hipometilasyon bazı lokuslarda da hipermetilasyon tespit etmişlerdir (30). Benzer şekilde bizim çalışmamızda sflt-1 genine ait P92186., P92344., P92456. pozisyonundaki primer noktaları metilasyon değerlerinin GDM'li hastalarda hipometile; VEGF genine ait P92668., P92710., P92863. pozisyonundaki primer noktası metilasyon değerlerinin de hipermetile olduğu saptanmıştır.

Metilasyon profilleri için farklı dokularda benzer hasta gruplarıyla yapılan çalışmalarda çelişkili değerler bulunmuştur. Bunun temel sebebinin metilasyonu göstermek için kullanılan tekniğe bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Bir çok metilasyon araştırmasında teknik olarak metilasyon-spesifik PCR metodu kullanılmıştır. Bu teknik, metilasyon tespiti için hızlı bir yöntem olmasına karşın bazı dezavantajlara sahiptir. Metilasyon spesifik PCR metodu, sadece primer bölgeleri üzerine gelen az sayıda CpG noktası hakkında bilgi verebilmektedir ve bu bilgi kantitatif değildir. Bizim çalışmamızda promoter bölgelerde kullandığımız yeni nesil sekanslama işlemi kadar hassas bir yöntem değildir (31). Ayrıca çalışmamızda bu yöntemle primer tasarımı içinde olan tüm primer noktalarını içeren, VEGF geninden 24, sFLT-1 geninden 30, PIGF geninden 29 nokta incelenmiştir. Saptanan metilasyon sonuçları background hesaplaması ardından tekrar değerlendirilmiştir. Background çıkarımı için seçilen noktalarda metilasyon olmaması gerekmekte iken hem bisülfid hem de sekans aşamasındaki hatalardan dolayı az miktarda (<%1) metilasyon durumu tespit edilmiştir. Bu durum background çıkarımının önemini ortaya koymuştur.

## SONUÇ

Plasental çalışmaların zorluğu gözlenen epigenetik değişiklik için direkt nedensel ilişkinin kurulamamasıdır. Çünkü gözlemlenen epigenetik değişikliğin bozulmuş plasental fonksiyonun sebebi veya sonucu olma ihtimali neredeyse eşittir (28).

Anjiogenezde etkili genlerin metilasyon değişiklikleri bir çok patolojide etkili olabileceğinden GDM li hastalarda sekonder gelişebilecek komplikasyonları öngermeye epigenetik adaptasyonlarının rolünü belirlemek önemlidir. Bir marker olarak DNA metilasyonunun temel obstetrik sorunlarda yerini belirlemek için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır. Son dönemde anne kanında bulunan fetal DNA ların kullanımının artması prepartum metilasyon düzeyi bakılmasına da imkan sağlayabilir. Bu durum erken tanı ve tedavi yöntemleri için ümit vadetmektedir. Perinatal, neonatal ve maternal morbidite ve mortaliteyi artıran yaygın gebelik komplikasyonlarının erken saptanması, uygun koruyucu önlemlerin alınması ve önlenmesi, perinatal ve maternal sonuçları iyileştirebilir.

**KAYNAKLAR**

1. Galjaard, S., Devlieger, R., & Van Assche, F. A. (2013). Fetal growth and developmental programming. *Journal of perinatal medicine*, 41 (1), 101-105.
2. Drake, P. M., Red-Horse, K., & Fisher, S. J. (2004). Reciprocal chemokine receptor and ligand expression in the human placenta: implications for cytotrophoblast differentiation. *Developmental dynamics*, 229 (4), 877-885.
3. Claycombe, K. J., Zeng, H., & Combs Jr, G. F. (2014). 12 Dietary Effects on Adipocyte Metabolism and Epigenetics. *Nutrition and Epigenetics*, 323.
4. Jensen, D. M., Sørensen, B., Feilberg-Jørgensen, N., Westergaard, J. G., & Beck-Nielsen, H. (2000). Maternal and perinatal outcomes in 143 Danish women with gestational diabetes mellitus and 143 controls with a similar risk profile. *Diabetic Medicine*, 17 (4), 281-286.
5. Franks PW, Looker HC, Kobes S, Touger L, Tataranni PA, Hanson RL, Knowler WC. Gestational glucose tolerance and risk of type 2 diabetes in young Pima Indian offspring. *Diabetes*. 2006;55:460-5.
6. Di Cianni G, Miccoli R, Volpe L, Lencioni C, Del Prato S. Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2003;19:259-70.
7. Dani, C., Bresci, C., Berti, E., Ottanelli, S., Mello, G., Mecacci, F., ... & Luchinat, C. (2014). Metabolomic profile of term infants of gestational diabetic mothers. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 27 (6), 537-542.
8. Plagemann A. Maternal diabetes and perinatal programming. *Early Hum Dev*. 2011;87:743-7.
9. West NA, Crume TL, Maligie MA, Dabelea D. Cardiovascular risk factors in children exposed to maternal diabetes in utero. *Diabetologia*. 2011;54:504-7.
10. Nahum Sacks K, Friger M, Shoham-Vardi I, Abokaf H, Spiegel E, Sergienko R, Landau D, Sheiner E. Prenatal exposure to gestational diabetes mellitus as an independent risk factor for long-term neuropsychiatric morbidity of the offspring. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;215:380.e1-7.
11. Van Assche, F. A., Devlieger, R., Harder, T., & Plagemann, A. (2010). Mitogenic effect of insulin and developmental programming. *Diabetologia*, 53 (6), 1243-1243.
12. Nelissen, E. C., van Montfoort, A. P., Dumoulin, J. C., & Evers, J. L. (2011). Epigenetics and the placenta. *Human reproduction update*, 17 (3), 397-417.
13. Jansson, T., & Powell, T. L. (2007). Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clinical science*, 113 (1), 1-13.
14. Finer, S., Mathews, C., Lowe, R., Smart, M., Hillman, S., Foo, L., ... & Hitman, G. A. (2015). Maternal gestational diabetes is associated with genome-wide DNA methylation variation in placenta and cord blood of exposed offspring. *Human molecular genetics*, 24 (11), 3021-3029.
15. Plagemann, A., & Harder, T. (2009). Hormonal programming in perinatal life: leptin and beyond. *British Journal of Nutrition*, 101 (02), 151-152.
16. Bouchard L, Hivert MF, Guay SP, St-Pierre J, Perron P, Brisson D. Placental adiponectin gene DNA methylation levels are associated with mothers' blood glucose concentration. *Diabetes*. 2012;61:1272-80.
17. Ruchat SM, Houde AA, Voisin G, St-Pierre J, Perron P, Baillargeon JP, Gaudet D, Hivert MF, Brisson D, Bouchard L. Gestational diabetes mellitus epigenetically affects genes predominantly involved in metabolic diseases. *Epigenetics*. 2013; 8:935-43.
18. Del Rosario MC, Ossowski V, Knowler WC, Bogardus C, Baier LJ, Hanson RL. Potential epigenetic dysregulation of genes associated with MODY and type 2 diabetes in humans exposed to a diabetic intrauterine environment: an analysis of genome-wide DNA methylation. *Metabolism*. 2014;6:654-60
19. Buchanan TA, Xiang AH. Gestational diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 2005; 115:485-91.
20. Janbakhshov, T. (2011) Gestasyonel Diyabetes Mellitus, Obezite Ve Travayın Fetal Vasküler Yapıya Etkisinin Araştırılması 13 (43)
21. Yang, Z., Mo, X., Gong, Q., Pan, Q., Yang, X., Cai, W., ... & Gao, G. (2008). Critical effect of VEGF in the process of endothelial cell apoptosis induced by high glucose. *Apoptosis*, 13 (11), 1331-1343.
22. Su, R., Wang, C., Feng, H., Lin, L., Liu, X., Wei, Y., & Yang, H. (2016). Alteration in Expression and Methylation of IGF2/H19 in Placenta and Umbilical Cord Blood Are Associated with Macrosomia Exposed to Intrauterine Hyperglycemia. *PLoS one*, 11 (2), e0148399.
23. Lehnen H, Zechner U, Haaf T. Epigenetics of gestational diabetes mellitus and offspring health: the time for action is in early stages of life. *Mol Hum Reprod*. 2013;19:415-22.
24. Ruchat SM, Houde AA, Voisin G, St-Pierre J, Perron P, Baillargeon JP, Gaudet D, Hivert MF, Brisson D, Bouchard L. Gestational diabetes mellitus epigenetically affects genes predominantly involved in metabolic diseases. *Epigenetics*. 2013; 8:935-43.
25. Houde AA, Guay SP, Desgagné V, Hivert MF, Baillargeon JP, St-Pierre J, Perron P, Gaudet D, Brisson D, Bouchard L. Adaptations of placental and cord blood ABCA1 DNA methylation profile to maternal metabolic status. *Epigenetics*. 2013;8:1289-302.
26. Sferruzzi-Perri AN, Camm EJ. The programming power of the placenta. *Front Physiol*. 2016;7 (MAR). doi:10.3389/fphys.2016.00033.
27. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. 2001;293 (5532):1089-1093. doi:10.1126/science.1063443.
28. Januar V, Desoye G, Novakovic B, Cvitic S, Saffery R. Epigenetic regulation of human placental function and pregnancy outcome: considerations for causal inference. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;213 (4 Suppl):S182-96. doi:10.1016/j.ajog.2015.07.011.
29. Chen C-Y, Tsay W, Tang J-L, et al. SOCS1 methylation in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003;37 (3):300-305. doi:10.1002/gcc.10222.
30. Liu L, Zhang X, Rong C, et al. Distinct DNA methylomes of human placentas between pre-eclampsia and gestational diabetes mellitus. *Cell Physiol Biochem*. 2014;34 (6):1877-1889. doi:10.1159/000366386.
31. Üstek, D. (2011). Yeni Nesil DNA Dizileme (New Generation DNA Sequencing). *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 1 (1), 11-18.