

Sağlıklı Gebeliklerde Fetal Cinsiyet ile Mikro RNA'ların İfade Düzeyleri Arasındaki İlişki

Relationship Between Fetal Sex and The Expression Levels of MicroRNA's in Healthy Pregnancies

Selin DEMİRER ¹, Meryem HOCAOĞLU ², Bilge Özsait SELÇUK ¹, Abdulkadir TURGUT ²⁻³
Evrım Kömürcü BAYRAK ¹

1. Genetik Anabilim Dalı, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

2. İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Göztepe Eğt. ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, İstanbul, Türkiye

3. İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Amaç: Sağlıklı gebelikte maternal kan ve plasentaya özgü miRNA'ların araştırılması, maternal/fetal biyolojik ve fizyolojik süreçlerin anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Fetüste dişi ve erkek cinsiyet arasındaki hormonal ve genetik farklılıkların sonucu olarak miRNA ifade düzeyleri değişmektedir. Bu çalışmada amacımız, aday olarak belirlediğimiz miRNA-21-3p, miRNA-155-5p, miRNA-518b ve miR-16-5p ifade düzeylerinin sağlıklı gebelerde fetal cinsiyet ile ilişkisinin araştırılmasıdır.

Gereçler ve Yöntem: Çalışma grubu, Kasım 2017 – Mart 2018 tarihlerinde İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde gebeliği takip edilen, maternal ve/veya fetal hastalık saptanmayan sağlıklı 21 gebeden oluşmaktadır. Maternal kan örnekleri aynı gebelerin 29. (Grup 1) ve 37. gebelik (Grup 2) haftalarındaki takiplerinde alınmıştır. Maternal kan lökositlerinden RNA izolasyonunun ardından miR-21-3p, miR-155-5p, miR-518b ve miR-16-5p anlatım düzeyleri, SYBR-Green gerçek zamanlı kantitatif PCR ile belirlenmiştir. Gruplar ve fetal cinsiyetler arasındaki miRNA ifade düzeyleri istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Grup 1 ve Grup 2'de fetal cinsiyet ile klinik ve biyokimyasal parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmasa da ($p > 0,05$) miRNA ifade düzeyleri ilişkili bulunmuştur. Buna göre, kız fetüs taşıyan gebelerde erkek fetüs taşıyanlara oranla 29. haftada miR-16-5p ($p=0,01$) ifade düzeyinin artmış olduğu belirlenmiştir. Erkek fetüs taşıyan gebelerde ise kız fetüs taşıyanlara oranla 37. haftada miR-21-3p ($p=0,02$), miR-155-5p ($p=0,08$) ve miR-518b ($p=0,02$) ifade düzeylerinin artmış olduğu saptanmıştır.

Sonuç: İlk defa bu çalışmada, sağlıklı gebelikte maternal kandaki lökositlerde üçüncü trimesterin başında ve sonunda fetal cinsiyet ile değişen miRNA ifade düzeylerinin olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: gebelik, fetüs, miRNA, lökositler, cinsiyet

ABSTRACT

Objective: Differences in microRNA (miRNA) expression in maternal blood and placenta can help us further understand maternal and fetal biology and physiology. Fetal sex differences in miRNA expression are a result of both hormonal and genetic differences between the sexes. The aim of this study was to evaluate the relationship between the expression levels of miRNA-21-3p, miRNA-155-5p, miRNA-518b and miR-16-5p and fetal sex.

İletişim

Sorumlu Yazar: Dr. Meryem HOCAOĞLU

Adres: İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, İstanbul, Türkiye

Tel: +90 (532) 518 1595

E-Posta: dr.meryemtaskiran@gmail.com

Makale Geliş: 20.02.2019

Makale Kabul: 11.09.2019

DOI: <http://dx.doi.org/10.16948/zktpb.529486>

Material and Methods: This study was carried out at the Department of Obstetrics and Gynecology of Istanbul Medeniyet University, Goztepe Research and Training Hospital. Twenty-one healthy pregnant women, who were having their pregnancy care through outpatient setting between November 2017 and March 2018, were included in the study. Maternal peripheral blood samples were obtained from the same healthy pregnant females at 29 weeks of gestation (Group 1) and at 37 weeks of gestation (Group 2). The maternal blood leucocyte levels of miRNAs (miRNA-21-3p, miRNA-155-5p, miRNA-518b and miR-16-5p) were analyzed using SYBR-Green real-time quantitative polymerase chain reaction. The expression levels of miRNAs between groups and fetal sexes were analyzed statistically.

Results: There were no significant differences in clinical and laboratory characteristics between fetal sex in Group 1 and Group 2 ($p > 0,05$). There was a significant increase in the expression levels of miR-16-5p ($p=0,01$) in pregnant women with female offspring, compared to the pregnant with male offspring at 29 weeks of gestation. There were significant increases in the expression levels of miR-21-3p ($p=0,02$), miR-155-5p ($p=0,08$), miR-518b ($p=0,02$) in pregnant women with male offspring, compared to the pregnant with female offspring at 37 weeks of gestation.

Conclusion: For the first time, in this study were shown to have differential expression levels of maternal blood leukocyte miRNAs between the fetal sexes at the beginning and end of the third trimester.

Keywords: pregnancy, fetus, miRNA, leukocyte, sex

GİRİŞ

MikroRNA'lar (miRNA), 19-25 nükleotid uzunluğunda, kodlamayan, hedefleri olan mRNA'lara bağlanarak yıkımda rol oynayan ve transkriptomu baskılayarak gen ifadesinin düzenlenmesinde görev alan küçük fonksiyonel RNA molekülleridir (1, 2). Günümüzde, maternal kandaki miRNA düzeyleri ile gebeliğe özgü preeklampsi, gestasyonel diyabet (GDM) gibi çeşitli patolojiler arasındaki ilişkileri araştırılan çok sayıda çalışma mevcuttur (3-8). Maternal dolaşıma sinsityotrofoblastlardan ekzozomlar yoluyla plasental kökenli miRNA'ların salındığı belirlenmiş ve bunların tanıda önem taşıdığına dikkat çekilmiştir (7, 8). Aynı zamanda maternal dolaşımda, non-invaziv prenatal tanıda da kullanılabilir fetal hücrelerde mevcuttur (9). Fetüsten maternal dolaşıma geçen hücre, ekzozom ve serbest miRNA'lar gibi kodlamayan RNA molekülleri, gebelik homeostazında rol oynayabileceği gibi ileri yaşlarda gözlenen metabolik hastalıklara yatkınlık yaratacak epigenetik faktörlerde olabilir. Bu yıl yayınlanan bir derlemede, bireyin fetal ve yeni doğan döneminde

yaşadığı erken yaşam ortamının, ileri yaş metabolik hastalıklara yakalanma riskinde cinsiyet farklılığının etken olabileceği belirtilmektedir (10). Nitekim çevresel etkenler ve bireyin sahip olduğu genetik altyapı arasındaki etkileşimde, epigenetik faktörlerden kodlamayan RNA'larda rol üstlenmektedir ve epigenetik modifikasyonların etkileri son dönemin dikkate değer araştırma konularından biridir (11). Sonuçta, dişi ve erkek cinsiyet arasındaki hormonal ve genetik farklılıkların sonucu olarak miRNA ifadesinde farklılıklar meydana gelmektedir (12). Dolayısıyla, cinsiyete bağlı olarak miRNA ifadesinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi, cinsiyetler arasında farklı biyolojik ve fizyolojik süreçleri daha iyi anlamamıza yardımcı olabilir.

Bu çalışmada, sağlıklı gebelerin farklı iki döneminde, fetal cinsiyetin miRNA-21-3p, miRNA-155-5p, miRNA-518b ve miR-16-5p ifade düzeyleri üzerine etkisini göstermek amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hasta seçimi: Çalışma grubu, Kasım 2017 – Mart 2018 tarihleri arasında İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde gebeliği takip edilen, maternal ve/veya fetal hastalık saptanmayan 21 sağlıklı gebeden oluşmaktadır. Aynı gebelerden 29. (Grup 1) ve 37. (Grup 2) gebelik haftaları olmak üzere iki ayrı dönemde kan alınmıştır. Fetüslerin intrauterin olarak tayin edilen cinsiyetleri doğum sonrasında doğrulanmıştır. Bu çalışma için İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul'un onayı alınmış (No: 2017/503) ve çalışmaya katılan gebeler "Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu"nu okuyarak imzalamışlardır.

Materyal Eldesi: Gönüllülerden gündüz yapılan rutin gebe takibi esnasında EDTA'lı tüplere 10 ml periferik kan örneği alınarak ve en fazla 4 saat içerisinde uygun şartlarda İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik laboratuvarına ulaştırılmıştır.

Periferik kandan lökosit ayırıştırma ve total RNA izolasyonu: Örnekler 1:2 (v:v) oranda eritrosit parçalayıcı çözelti (Gey's buffer) eklenerek 20 dakika +40C de bekletilmiş ve ardından iki kere santrifüj yapılmıştır. Elde edilen pellet 1 ml fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS) içerisinde çözüldükten sonra santrifüj yapılmıştır. Ardından, 800 µl trizol eklenerek hücre pelletleri buz üzerinde pipetaj yaparak homojenize edilmiş ve, 160 µl kloroform eklenerek santrifüj yapılmıştır. Üst sıvı faz alınarak, üzerine 500 µl %100'lük soğuk izopropanol eklenmiş ve santrifüj edilmiştir. Üst sıvı faz pipet ile çekilerek atılmış ve 1 ml %75 lik soğuk etanol eklenerek santrifüj yapılmıştır. Elde edilen pellet kurutulduktan sonra üzerine 40 µl RNaz-DNaz içermeyen su eklenerek çözülmüştür. Total RNA kalitesi ve miktarı Nano-Drop (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak değerlendirilmiştir.

cdNA Sentezi: Elde edilen total RNA örneklerinden, miScript II-RT Kiti (Qiagen, Kat No:218193)

ile miScript Primer Assayleri ve 10 ng/ul total RNA kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

Kantitatif gerçek zamanlı PCR yöntemi: Araştırılan miRNA'ların seçimi, literatürdeki gebelikte sık görülen hastalıklarla ilgili çalışılmış miRNA'lara (4-8) göre yapılmıştır. Her örnekten çift olarak çalışılan miR-21-3p, miR-155-5p, miR-518b ve miR-16-5p'nin Ct değerleri miScript SYBR Green PCR Kiti (Qiagen, Kat No: 218073) kullanılarak kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) yöntemi ile LightCycler 480 (Roche Applied Science) cihazında elde edilmiştir. Rölatif kantitasyon hesabı, her bir miRNA'nın Ct değeri endojen kontrol miRNA (RNU-6) Ct değerinden çıkarıldı. Böylece 'Delta Ct' değeri belirlendikten sonra her bir delta Ct değerinden, kalibratörün delta Ct değeri çıkartılmıştır. Kalibratör olarak, sağlıklı 21 gebenin örnekleri arasından, iki dönem arasında RNU-6 Ct değerleri farkı en az olan örnek seçilmiştir. Sonuçta, elde edilen delta delta Ct değerinin 2½ 'den çıkartılmıştır. Sonuçta rölatif kantitasyon değeri (RQ) elde edilmiştir. Her bir örneğin RQ değeri, istatistiksel analizlerde incelenmiştir.

İstatistiksel Analiz: İstatistiksel analizler, SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Araştırılan miRNA'ların rölatif kantitasyon değeri (RQ) normal dağılıma uymadığı için gruplar arası karşılaştırmalarda, Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Veriler ortalaması±standart sapma (S.D.) olarak ifade edilmiştir. Grupların karşılaştırılmasında elde edilen p değerinin <0,05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. miRNA düzeylerinin sürekli değişkenler ile bağlantısının araştırılmasında Spearman'ın korelasyon testi kullanılmıştır. Korelasyon ilişkisi, korelasyon katsayısı (r), 0.00-0.25 (çok zayıf), 0.26-0.49 (zayıf), 0.50-0.69 (orta), 0.70-0.89 (yüksek), 0.90-1.00 (çok yüksek) değerlerine göre değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Hasta Özellikleri: Gebelere ait klinik ve biyokimyasal parametreler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1: 29. gebelik haftası (Grup 1) ve 37. gebelik haftasındaki (Grup 2) sağlıklı gebelerin klinik ve laboratuvar özellikleri.

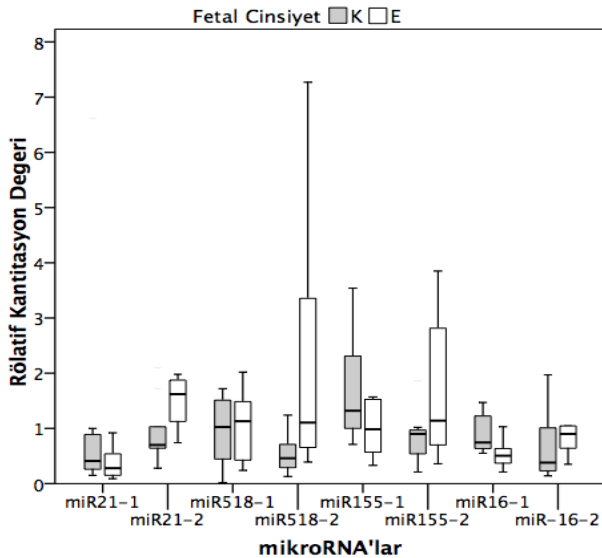
Özellikler	Grup 1		Grup 2	
	Kız Cinsiyet (Ort±SD)	Erkek Cinsiyet (Ort±SD)	Kız Cinsiyet (Ort±SD)	Erkek Cinsiyet (Ort±SD)
Kilo, kg	67,44 ± 9,36	70,42 ± 8,44	70,33 ± 11,34	73,17 ± 9,50
BKİ	25,82 ± 2,40	27,47 ± 2,93	26,87 ± 2,83	28,53 ± 3,33
DKB	61,11 ± 3,33	59,17 ± 5,15	61,11 ± 3,33	60,83 ± 5,15
SKB	101,11 ± 3,33	101,67 ± 5,77	102,22 ± 4,41	104,17 ± 6,69
Hb	11,91 ± 2,89	11,68 ± 1,11	12,19 ± 2,92	11,63 ± 1,22
Hct	31,93 ± 3,73	35,87 ± 4,65	32,89 ± 4,78	34,83 ± 3,16
WBC	10,37 ± 3,19	9,95 ± 1,71	10,28 ± 2,09	10,23 ± 2,11
PLT	208,44 ± 51,46	211,42 ± 42,37	200,89 ± 67,17	206,00 ± 39,36
AST	16,11 ± 6,45	14,50 ± 3,23	16,56 ± 5,48	14,42 ± 4,17
ALT	13,44 ± 7,67	11,50 ± 5,47	12,22 ± 7,24	11,08 ± 6,40
LDH	172,89 ± 18,64	172,92 ± 17,01	184,78 ± 31,63	172,42 ± 38,93
Total Protein	6,84 ± 0,76	6,69 ± 0,41	6,72 ± 0,63	6,53 ± 0,40
Kreatin	0,48 ± 0,07	0,52 ± 0,04	0,48 ± 0,07	0,52 ± 0,06
Albumin	3,54 ± 0,14	3,53 ± 0,21	3,54 ± 0,22	3,52 ± 0,24

BKİ: beden kütle indeksi, **DKB:** diyastolik kan basıncı, **SKB:** sistolik kan basıncı, **Hb:** hemoglobin, **Hvt:** hematocrit, **WBC:** beyaz kan hücreleri, **PLT:** platelet, **AST:** asparat amino transferaz, **ALT:** alanin amino transferaz, **LDH:** laktat dehidrogenaz

Grup 1 ve Grup 2 arasında beden kitle indeksi (BKİ), diyastolik kan basıncı, sistolik kan basıncı ölçümleri ile serum aspartat aminotransferaz (AST), alanin amino transferaz (ALT), hemoglobin (Hb), laktat dehidrogenaz (LDH), trombosit, beyaz kan hücreleri (WBC), kreatin, total protein ve albumin sonuçları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$, Tablo 1). Kız fetüs taşıyan gebelerin yaş ortalaması $30,4\pm 5,56$ iken erkek fetüs taşıyan gebelerin $26,5\pm 5,59$ olarak belirlenmiştir, ancak aralarında anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,94$).

Sağlıklı gebelerde fetal cinsiyet ile değişen miRNA ifadelerinin analizi: Kız fetüs taşıyan gebelerin 29. gebelik haftasında miR-21-3p, miR-155-5p, miR-518b ve miR-16-5p'nin rölatif kantitasyon ortalama değerleri sırasıyla; $1,15(\pm 2,06)$, $2,34(\pm 2,74)$, $0,96(\pm 0,61)$ ve $0,90(\pm 0,37)$ olarak belirlenmiştir. Erkek fetüs taşıyan gebelerin 29. gebelik haftasında miR-21-3p, miR-155-5p, miR-518b ve miR-16-5p'nin rölatif kantitasyon ortalama değerleri sırasıyla $0,37(\pm 0,28)$, $1,45(\pm 1,33)$, $1,02(\pm 0,62)$ ve $0,58(\pm 0,33)$ olarak belirlenmiştir. Kız fetüs taşıyan gebelerde 29. haftada erkek fetüs taşıyanlara oranla miR-21-3p ($p=0,21$), miR-155-5p ($p=0,28$) ve miR-518b ($p=0,82$) ifade düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı değilken, miR-16-5p ($p=0,01$) ifade düzeyi erkek fetüs taşıyan gebelere oranla artmış olduğu gözlenmiştir (Şekil 1).

Kız fetüs taşıyan gebelerin 37. hafta gebeliklerinde, miR-21-3p, miR-155-5p, miR-518b ve miR-16-5p'nin rölatif kantitasyon ortalama değerleri sırasıyla, $0,94(\pm 0,58)$, $0,82(\pm 0,47)$, $0,58(\pm 0,38)$ ve $0,71(\pm 0,64)$ olarak belirlenmiştir. Erkek fetüs taşıyan gebelerin 37. haftada miR-21-3p, miR-155-5p, miR-518b ve miR-16-5p'nin rölatif kantitasyon ortalama değerleri sırasıyla $1,75(\pm 0,96)$, $1,92(\pm 1,88)$, $2,28(\pm 2,19)$ ve $1,16(\pm 0,95)$ olarak tespit edilmiştir. Erkek fetüs taşıyan gebelerde 37. haftada miR-16-5p ifade düzeyi kız fetüs taşıyanlara oranla istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken ($p=0,54$); miR-21-3p ($p=0,02$), miR-155-5p ($p=0,08$), miR-518b ($p=0,02$) ifade düzeyleri kız fetüs taşıyanlara daha yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 1).



Şekil 1: Sağlıklı gebelerin 29. gebelik haftası (Grup 1) ve 37. gebelik haftası (Grup 2) dönemlerindeki fetal cinsiyete göre miRNA'ların ifade düzeyleri, Mann-Whitney U testi anlamlılık düzeyleri; * $p=0,02$, ** $p=0,08$, *** $p=0,01$.

miRNA ifade düzeyi ile klinik ve biyokimyasal parametrelerin korelasyonu: Korelasyon analizinde, miR-21-3p, miR-155-5p, miR-518b ve miR-16-5p ifade düzeyleri kendi içinde ve gebelik haftası, yaş, BKİ, diyastolik kan basıncı (DKB), sistolik kan basıncı (SKB), ile serum AST, ALT, Hemoglobin, laktat dehidrogenaz, LDH, trombosit, WBC, kreatin, total protein ve albumin düzeyleri ile karıştırıldığında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır ($r=0.00-0.25$, $p>0,05$).

TARTIŞMA

Bu çalışmada 21 gebenin 3. trimesterinde 2 farklı dönemdeki kan lökositlerinde, aday 4 miRNA'nın ifade profillemesi yapılmıştır. Fetüste eksternal genital organların gelişimi ve hormonal değişimlerin devam ettiği bu dönemde, fetal cinsiyetin maternal kandaki hücrelerde meydana gelen miRNA ifade değişiklikleri ilk defa bu çalışmada araştırılmıştır. Çalışmamızın sonucunda, gebeliğin 29. haftasında, miR-16-5p ifade düzeyinin kız fetüs taşıyan gebelerde erkek fetüs taşıyanlara göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu bulunmuştur. Ek olarak, 37. gebelik haftasında miRNA-21-3p, miRNA-155-5p, miRNA-518b ifade düzeylerinin erkek fetüs taşıyan gebelerde kız fetüs taşıyanlar ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir. Östrojen, progesteron ve testosteron gibi steroid yapıdaki seks hormonlarının düzenlenmesinde miRNA'ların rolü olduğu, diğer taraftan östrojen hormonunun da miRNA'ların düzenlenmesinde rol oynadığı tespit edilmiştir. Hayvan modeli çalışmalarında fare beyininde cinsiyete özgü bir miRNA ifade paterninin olduğu, erkek cinsiyette testosteronun östrojene dönüşümü gerçekleşmediğinde miRNA ifadesindeki bu farklı paternin neredeyse gözlenmediği belirlenmiştir. Bu durumu araştırmacılar, miRNA'ların östrojenler tarafından düzenlenmesi ile açıklamışlardır (12). Bununla birlikte bazı hastalıkların patogenezini ve akıbetinin cinsiyet ile değiştiği bilinmektedir. Örneğin, otoimmün hastalıklar kadınlarda sık gözlenirken bazı kanserler erkeklerde daha sık olarak gelişmektedir. Benzer şekilde, kardiyovasküler hastalıklara erkeklerde premenopozal dönem kadınlara göre daha sık rastlanmaktadır. miRNA'ların cinsiyet ile değişen ifadesinin, cinsiyet ile ilişkili hastalıkların altında yatan önemli mekanizmalardan olabileceği düşünülmektedir (10, 13).

Memelilerde genetik cinsiyet fertilizasyon sırasında tanımlanmaktadır. Genom çalışmaları, testiküler ve ovaryan gelişim yollarında binlerce genin dinamik ifade paterninin yer aldığı ortaya koymaktadır (13). Gonad gelişiminin başlamasında yer alan en önemli genler sırasıyla Sry (Y kromozomunda cinsiyet tanımlayan bölge), Rspo1 (R-spondin homolog), Wnt4 (wingless- MMTV integration site 4) ve β -katenindir. miRNA'lar, fetal gonad gelişiminde gen ifadesinin ve işlevinin önemli düzenleyicileri arasında yer almaktadır. miRNA'ların üreme sistemi üzerindeki önemli rolü transgenik fare modelinde gösterilmiştir Diğer yandan, Dicer'in primordiyal germ hücre ve spermatogonyal çoğalma, Sertoli hücre fonksiyonu ve yumurta kanalı (oviduct) ile uterus gelişimi üzerinde önemli rolü

olduğu bilinmektedir (13). Gelişimde gen düzenlenmesinde önemli rol oynayan miRNA'ların gerek fetal dokulardaki profilleri gerek gebelikte gelişen maternal hastalıklardaki profilleri sıklıkla araştırılma da birbirleri olan etkileşimleri halen net olarak anlaşılamamıştır.

Bu çalışmada ifade düzeyi araştırılan miR-21, 17p23.2 bölgesinde FRA17B kırılma alanında yer alan bir gen tarafından kodlanmaktadır ve transmembran protein 49'u (TMEM49) kodlayan gen ile üst üste pozisyondadır (14, 15). miR-21'in, kanser, obezite, tip 2 diyabet gibi fizyolojik ve patolojik birçok süreçte önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (14). Gebelikte maternal plazma ve plasentada yapılan çalışmaların sonucunda miR-21'in ifade düzeyinin kontrol grubuna kıyasla preeklampsi, fetal makrozomi ve gestasyonel diyabette (GDM) değiştiği belirlenmiştir (14, 16-21). Luo ve arkadaşları miR-21'in β -katenin sinyal yolağını aktive ettiğini ve β -kateninin protein ifadesi düzeyini artırdığını önermiştir (22). Bununla birlikte, β -kateninin fetüste Mülleriyan kanal mezenkiminde antimülleriyan hormon (AMH) etkisine aracılık ettiği ve erkek fetüste Mülleriyan kanal gelişiminin baskılanması için gerekli olduğu bilinmektedir. Erkek fetüste, Mülleriyan kanal mezenkiminde β -kateninin inaktivasyonu ektopik dişi üreme organlarının varlığını sürdürmesine neden olmaktadır (23). Çalışmamızda, erkek fetüs taşıyan gebelerin lökositlerinde 37. haftada kız taşıyanlara kıyasla miR-21-3p ifade düzeyinin anlamlı derecede artmış olduğu tespit edilmiştir. miR-21'in β -katenin sinyal yolağı üzerinden fetüste erkek cinsiyet yönünde farklılaşma ile ilişkili olması maternal kan hücrelerindeki artan miR-21-3p ifadesinin erkek cinsiyet gelişimi ile etkileşim halinde olabileceğini düşündürmüştür. Diğer yandan, Miura ve arkadaşlarının, 37-38 gebelik haftasında dişi ve erkek fetüs taşıyan sağlıklı gebeler ile yaptığı bir çalışmada maternal plazmadaki miR-21 ifade düzeyi ile fetal cinsiyet arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır (24). Bu çelişkili sonucun sebebi, maternal lökositlerden elde edilen mikroRNA'ların analiz edildiği çalışmamızdan farklı olarak bu çalışmada dolaşımdaki hüresiz miR-21 düzeylerinin araştırılmasından kaynaklanıyor olabilir.

İnflamasyon ile ilişkili bir miRNA olan miR-155, inflamasyon sürecinde yer alan nükleer faktörleri düzenlemektedir (25). Preeklampsi ve GDM'de maternal serum, plazma ve plasentada miR-155 ifade düzeyinin sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı derecede değiştiği gösterilmiştir (26-28). Ek olarak, Wander ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yalnızca erkek fetüs taşıyan GDM'li kadınlarda miR-155-5p ile GDM arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (26). Ayrıca, miR-155'in Sertoli hücrelerinden kana salınabileceğini ve androjenler, östrojenler veya düşük düzey inflamasyon belirteçlerinden bağımsız olarak erkek fertilitésinin iyi bir biyobelirteci olduğu öne sürülmüştür (29). Çalışmamızda 37. gebelik haftasında erkek fetüs taşıyan gebelerde kız taşıyanlara göre artmış miRNA-155-5p ifade düzeylerinin bulunması, diğer çalışmaların sonuçlarını destekler nitelikte olup fetal cinsiyetin sağlıklı gebelerde de etkisi olduğunu göstermektedir.

miR-518b, adezyon, farklılaşma, migrasyon, polarite, hücre büyümesi ve anjiogenezis ile ilişkili Rap1b geninin düzenleyicilerinden ve tümör baskılayıcı işlevi olan bir miRNA olarak belirlenmiştir (30). Gebelikte maternal plazma ve plasentada yapılan çalışmalar, miR-518b anlatım düzeyinin preeklampsi ve gestasyonel hipertansiyonu olan gebelerde sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak değiştiğini göstermektedir (31-34). Ancak miR-518b ile fetal cinsiyet arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda ilk defa sağlıklı gebeliğin 37. haftasında miR-518b ifade düzeylerinin erkek fetüs taşıyan gebelerde kız taşıyanlara oranla anlamlı derecede artmış olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada araştırılmak üzere seçilen miR-16'nın hücre proliferasyonunun düzenlenmesi sürecinde rol oynadığı belirlenmiştir (35). miR-16 ifade düzeyinin artması, memelilerde hücre büyümesi ve düzenlenmesinin ana yollarından olan Wnt/ β -katenin sinyal yolağının (36) anormal aktivasyonuna sebep olmaktadır (37). Bununla birlikte, dişi fetüste ovaryan farklılaşma, somatik hücrelerde RSPO1 proteini tarafından WNT/ β -katenin sinyal yolağının aktivasyonu ile gerçekleşmektedir (38). Çalışmamızda 29. gebelik haftasında dişi fetüs taşıyan kadınların maternal kan lökositlerinde miR-16-5p ifade düzeylerinin erkek fetüs taşıyanlara göre yüksek olduğu bulunmuştur. Çok fonksiyonlu bir miRNA olan miR-16 artışının dişi fetüste gonadal farklılaşma ile ilişkili olabileceği düşündürmektedir.

Gebeliğin uzun ve dinamik seyri sırasında sürekli olarak gelişen fetüste birçok fizyolojik işlevin düzenlenmesinde görev alan miRNA'ların gebeliğin farklı dönemlerinde maternal lenfosit veya plasentadaki ifade düzeylerinde değişimler gözlenmektedir (39,40). Çalışmamızın bulguları, maternal kan lökositlerinde üçüncü trimesterin başı ve sonunda farklı olmak üzere terime doğru fetal cinsiyet ile değişen miRNA ifade düzeylerinin gebelik homeostazına etkisi olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızın kısıtlılıklarından birisi, araştırmaya dahil olan sağlıklı gebe sayısının 21 olması ve bir diğeri de araştırılan mikroRNA'ların fetal cinsiyet ile olan ilişkilerinin hem maternal hem de fetal açıdan fonksiyonel olarak gösterilememiş olmasıdır. Araştırmanın bu yönde geliştirilmesi planlanmaktadır.

Sonuç olarak bu çalışma, sağlıklı gebelikte maternal kan lökositlerinde üçüncü trimesterin başında ve sonunda fetal cinsiyet ile ifade düzeyleri değişen miRNA'ların varlığının gösterildiği ilk çalışmadır. Elde edilen bulgularının daha geniş serili çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

Teşekkür: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje No: TYL-2017-27357) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Zhang, C. *MicroRNomics: a newly emerging approach for disease biology. Physiol Genomics* 33, 139-147 (2008).
2. Huntzinger E, Izaurralde E. *Gene silencing by microRNAs: Contributions of translational repression and mRNA decay. Nat Rev Genet* 2011; 12: 99-110.

3. Pineles BL, Romero R, Montenegro D, Tarca AL, Han YM, Kim YM, Draghici S, Espinoza J, Kusanovic JP, Mittal P, Hassan SS, Kim CJ. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196:261. e1–e261.e6.
4. Sheikh AM, Small HY, Currie G, Delles C. Systematic Review of Micro-RNA Expression in Pre-Eclampsia Identifies a Number of Common Pathways Associated with the Disease. *PLoS One.* 2016 Aug 16;11(8):e0160808.
5. Cao YL, Jia YJ, Xing BH, Shi DD, Dong XJ. Plasma microRNA-16-5p, -17-5p and -20a-5p: Novel diagnostic biomarkers for gestational diabetes mellitus. *J Obstet Gynaecol Res.* 2017 Jun;43(6):974-981.
6. Poirier C, Desgagné V, Guérin R, Bouchard L. MicroRNAs in Pregnancy and Gestational Diabetes Mellitus: Emerging Role in Maternal Metabolic Regulation. *Curr Diab Rep.* 2017 May;17(5):35.
7. Enquobahrie, D.A., Abetew, D.F., Sorensen, T.K., Willoughby, D., Chidambaram, K., D.S. Jairajpuri et al. *Gene* 627 (2017) 543–548 Williams, M.A., 2011. Placental microRNA expression in pregnancies complicated by preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 204, 12–21.
8. Laganà, A.S., Vitale, S.G., Sapia, F., Valenti, G., Corrado, F., Padula, F., Rapisarda, A.M., D'Anna, R., 2017b. miRNA expression for early diagnosis of preeclampsia onset: hope or hype? *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 1–5.
9. Chen F, Liu P, Gu Y, Zhu Z, Nanisetti A, Lan Z, Huang Z, Liu JS, Kang X, Deng Y, Luo L, Jiang D, Qiu Y, Pan J, Xia J, Xiong K, Liu C, Xie L, Shi Q, Li J, Zhang X, Wang W, Drmanac S, Bolund L, Jiang H, Drmanac R, Xu X. Isolation and whole genome sequencing of fetal cells from maternal blood towards the ultimate non-invasive prenatal testing. *Prenat Diagn.* 2017 Dec;37(13):1311-1321.
10. Dearden L, Bouret SG, Ozanne SE. Sex and gender differences in developmental programming of metabolism. *Mol Metab.* 2018 Apr 30. pii: S2212-8778(18)30309-0.
11. Angrish MM, Allard P, McCullough SD, Druwe IL, Helbling Chadwick L, Hines E, Chorley BN. Epigenetic Applications in Adverse Outcome Pathways and Environmental Risk Evaluation. *Environ Health Perspect.* 2018 Apr 12;126(4):045001.
12. Sharma S, Eghbali M, Influence of sex differences on microRNA gene regulation in disease. *Biology of Sex Differences* 2014,5:3 lineage. *J Neurosci* 2011, 31:11748–11755.
13. Torley KJ, da Silveira JC, Smith P, Anthony RV, Veeramachaneni DN, Winger QA, Bouma GJ. Expression of miRNAs in ovine fetal gonads: potential role in gonadal differentiation. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011 Jan 11;9:2
14. Jiang H, Wen Y, Hu L, Miao T, Zhang M, Dong J. Serum MicroRNAs as Diagnostic Biomarkers for Macrosomia. *Reprod Sci.* 2015;22:664-71
15. Krichevsky AM, Gabrieli G. miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med.* 2009;13(1):39-53.
16. Lasabova, Z., Vazan, M., Zibolenova, J., Svecova, I., Overexpression of miR-21 and miR-122 in preeclamptic placentas. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 2015;36(7), 695-699.
17. Choi SY, Yun J, Lee OJ, Han HS, Yeo MK, Lee MA, Suh KS. MicroRNA expression profiles in placenta with severe preeclampsia using a pna-based microarray. *Placenta.* 2013;34:799-804
18. Li, H., Ge, Q., Guo, L., Lu, Z., Maternal Plasma miRs expression in Preeclamptic Pregnancies. *Biomed. Res. Int.*, 2013; 970265.
19. Jairajpuri DS, Malalla ZH, Mahmood N, Almawi WY. Circulating microRNA expression as predictor of preeclampsia and its severity. *Gene.* 2017;5:627:543-548.
20. Jiang H, Wu W, Zhang M, Li J, Peng Y, Miao TT, Zhu H, Xu G. Aberrant upregulation of miR-21 in placental tissues of macrosomia. *J Perinatol.* 2014 ;34(9):658-63
21. Zhang JT, Cai QY, Ji SS, Zhang HX, Wang YH, Yan HT, Yang XJ. Decreased miR-143 and increased miR-21 placental expression levels are associated with macrosomia. *Mol Med Rep.* 2016;13(4):3273-80
22. Luo G, Luo W, Sun X, Lin J, Wang M, Zhang Y, Luo W, Zhang Y. MicroRNA-21 promotes migration and invasion of glioma cells via activation of Sox2 and β -catenin signaling. *Mol Med Rep.* 2017;15(1):187-193
23. Kobayashi A, Stewart CA, Wang Y, Fujioka K, Thomas NC, Jamin SP, Behringer RR. β -Catenin is essential for Müllerian duct regression during male sexual differentiation. *Development.* 2011;138(10):1967-75.
24. Miura K, Higashijima A, Hasegawa Y, Abe S, Miura S, Kaneuchi M, Yoshiura K, Masuzaki H. Circulating levels of maternal plasma cell-free miR-21 are associated with maternal body mass index and neonatal birth weight. *Prenat Diagn.* 2015;35(5):509-11.
25. Zhang Y, Diao Z, Su L, Sun H, Li R, Cui H, Hu Y. MicroRNA-155 contributes to preeclampsia by down-regulating CYR61. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;202(5):466.e1-7.
26. Wander PL, Boyko EJ, Hevner K, Parikh VJ, Tadesse MG, Sorensen TK, Williams MA, Enquobahrie D. Circulating early- and mid-pregnancy microRNAs and risk of gestational diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;132:1-9
27. Kim J, Lee KS, Kim JH, et al. Aspirin prevents TNF- α -induced endothelial cell dysfunction by regulating the NF- κ B-dependent miR-155/eNOS pathway: role of a miR-155/eNOS axis in preeclampsia. *Free Radic Biol Med* 2017;104:185–98.
28. Gan L, Liu Z, Wei M, Chen Y, Yang X, Chen L, Xiao X. MiR-210 and miR-155 as potential diagnostic markers for pre-eclampsia pregnancies. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(28):e7515
29. Tsatsanis C, Bobjer J, Rastkhani H, Dermizaki E, Katrinaki M, Margioris AN, Giwercman YL, Giwercman A. Serum miR-155 as a potential biomarker of male fertility. *Hum Reprod.* 2015;30(4):853-60.
30. Zhang M, Zhou S, Zhang L, Zhang J, Cai H, Zhu J, et al. miR-518b is down-regulated, and involved in cell proliferation and invasion by targeting Rap1b in esophageal squamous cell carcinoma. *FEBS Lett.* 2012; 586: 3508+3521..
31. Miura K, Higashijima A, Murakami Y, Tsukamoto O, Hasegawa Y, Abe S, Fuchi N, Miura S, Kaneuchi M, Masuzaki H. Circulating chromosome 19 miRNA cluster microRNAs in pregnant women with severe pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol Res.* 2015;41(10):1526-32
32. Xu P, Zhao Y, Liu M, Wang Y, Wang H, Li YX, Zhu X, Yao Y, Wang H, Qiao J, Ji L, Wang YL. Variations of microRNAs in human placentas and plasma from preeclamptic pregnancy. *Hypertension.* 2014;63(6):1276-84.
33. Hromadnikova I, Kotlabova K, Ivankova K, Krofta L. First trimester screening of circulating C19MC microRNAs and the evaluation of their potential to predict the onset of preeclampsia and IUGR. *PLoS One.* 2017;9:12(2):e0171756
34. Hromadnikova I, Kotlabova K, Hympanova L, Doucha J, Krofta L. First trimester screening of circulating C19MC microRNAs can predict subsequent onset of gestational hypertension. *PLoS One.* 2014; 9:e113735
35. Balakrishnan A, Stearns AT, Park PJ, Dreyfuss JM, Ashley SW, Rhoads DB & Tavakkolizadeh A. MicroRNA mir-16 is anti-proliferative in enterocytes and exhibits diurnal rhythmicity in intestinal crypts. *Exp Cell Res.* 2010;316, 3512–3521.
36. Fang Z, Liu X, Yang X, Song X, Chen X. Effects of Wnt/ β -catenin signaling on bisphenol A exposure in male mouse reproductive cells. *Mol Med Rep.* 2015;12(4):5561-7.
37. Zhu Y, Tian F, Li H, Zhou Y, Lu J, Ge Q. Profiling maternal plasma microRNA expression in early pregnancy to predict gestational diabetes mellitus. *Int J Gynaecol Obstet.* 2015 Jul;130(1):49-53.
38. Chassot AA, Gregoire EP, Lavery R, Taketo MM, de Rooij DG, Adams IR, Chaboissier MC. RSP01/ β -catenin signaling pathway regulates oogenesis differentiation and entry into meiosis in the mouse fetal ovary. *PLoS One.* 2011;6(10):e25641
39. Gu Y, Sun J, Groome LJ, Wang Y. Differential miRNA expression profiles between the first and third trimester human placentas. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013 Apr 15;304(8):E836-43
40. Ishida Y, Zhao D, Ohkuchi A, Kuwata T, Yoshitake H, Yuge K, Takizawa T, Matsubara S, Suzuki M, Saito S, Takizawa T. Maternal peripheral blood natural killer cells incorporate placenta-associated microRNAs during pregnancy. *Int J Mol Med.* 2015;35(6):1511-24.