



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

**YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ KULLANILARAK
VE KULLANILMADAN DOĞAN BEBEKLERDE
MİKRORNA PROFİLLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Başak GÖZÜM

Antalya, 2018



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ KULLANILARAK VE
KULLANILMADAN DOĞAN BEBEKLERDE MİKRORNA
PROFİLLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Başak GÖZÜM

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ercan MIHÇI

“Kaynak gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

Antalya, 2018

Bu araştırma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TTU-2016-1709)

TEŞEKKÜR

Tezimin tüm aşamalarında ve araştırma görevlisi eğitimim esnasında her türlü desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ercan MIHÇI'ya,

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında asistanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocalarıma ve tüm uzman doktor arkadaşlarıma,

Tezimin laboratuvar aşamasında destek sağlayan saygıdeğer Dr. Öğr. Üyesi Aslı TOYLU şahsında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına,

Hasta verilerinin toplanmasında desteklerini sağlayan Doç.Dr. Banu NUR, Doç.Dr. Mehmet SAKINCI, Doç.Dr. Murat ÖZEKİNCİ, Opr.Dr. Kemal ÖZGÜR'e,

Hastaların toplanması konusunda değerli katkılarından ötürü Hemşire Fatma ÇALIŞKAN ÖZDÖL'e,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma,

Her zaman desteğini hissettiğim çok kıymetli annem, babam ve kardeşime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	iv
Tablolar Dizini	v
Şekiller Dizini	vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. MikroRNA'nın Genomik Organizasyonu	3
2.2. MikroRNA Klinik Önemi ve Kullanım Alanları	6
2.3. İnfertilite ve Yardımcı Üreme Teknikleri	9
2.4. YÜT İle Doğan Bebeklerde Görülen Konjenital Anomaliler ve Meydana Geliş Mekanizmaları	10
2.5. İnfertilite İlişkili MikroRNA'lar (Hedef miRNA'lar)	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Plazma miRNA İzolasyonu	21
3.2. cDNA Hazırlanması	22
3.3. Kantitatif PCR	22
3.4. miRNA İfadesi Değerlerinin Analizi	23
3.5. İstatistiksel Analiz	23
4. BULGULAR	24
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	32
6. ÖZET	38
7. ABSTRACT	40
8. KAYNAKLAR	42
9. EKLER	55
Ek 1. Aydınlatılmış Onam Formu	55
Ek 2. Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onayı	59

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

3'-UTR	3p-Translate Edilmemiş Bölgesi
AS	Angelman Sendromu
BWS	Beckwith Wiedemann Sendromu
C. elegans	Caenorhabditis Elegans
CFTR	Kistik Fibrozis Transmembran Regülatör
DGCR8	DiGeorge Critical Region 8
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
GDP	Guanozin Difosfat
GIFT	Gametın Fallopien Tüpe Transferi
GTP	Guanozin Trifosfat
ICSI	İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IGFR2	İmmunglobulin G Fc reseptör 2
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
KF	Kistik Fibrozis
lncRNA	Uzun Kodlanmayan RNA
MiRNA	MikroRNA
mRNA	Mesajcı RNA
MWU	Mann Whitney U
ncRNA	Kodlanmayan RNA
ORF	Açık Okuma Çerçevesi
PCOS	Polikistik Over Sendromu
PGD	Preimplantasyon Genetik Tanısı
piRNA	Piwi Etkileşimli RNA
POST	Peritoneal Oosit ve Sperm Transferi
Pre-miRNA	Prekürsör miRNA

pri-miRNA	Primer miRNA
RISC	RNA ile Tetiklenen Sessizleştirici Kompleks
RNA	Ribonükleik Asit
siRNA	Küçük Karışan RNA
snoRNA	Küçük Nükleolar RNA
TET	Tubal Embriyo Transferi
TRBP	Transaktivasyon-Cevaplı RNA Bağlayıcı Protein
UTR	Çevirime Uğramayan Bölge
XPO5	Exportin-5
YÜT	Yardımcı Üreme Tekniği
ZIFT	Zigotun Fallopian Tüpe Transferi

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. YÜT kullanılan ailelerin infertilite nedenlerinin dağılımı	24
4.2. Kadın faktör nedeniyle infertil olan hastaların alt başlık dağılımı	24
4.3. YÜT'te kullanılan embriyo sayısı ve özelliği	25
4.4. YÜT kullanılarak doğanlar ile kontrol grubunun term doğum oranlarının karşılaştırılması	25
4.5. YÜT kullanılarak doğanlar ile kontrol grubunun anne yaşlarının 30 yaşa göre karşılaştırılması	26
4.6. YÜT kullanılarak doğanlar ile kontrol grubunun cinsiyet dağılımı	26
4.7. YÜT kullanılarak doğanlar ile kontrol grubunun çoklu doğum oranlarının karşılaştırılması	27
4.8. YÜT kullanılarak doğanlar ile kontrol grubunun ağırlıklarının 2750 grama göre karşılaştırılması	27
4.9. YÜT kullanılarak doğanlar ile kontrol grubunun anomali varlığı açısından karşılaştırılması	28
4.10. YÜT tiplerine göre anomali dağılımı	28
4.11. YÜT alt tiplerine göre anomali tiplerinin dağılımı	29
4.12. YÜT kullanılarak ve kullanılmadan doğan bebeklerin hedef miRNA profilinin kıyaslaması	29
4.13. YÜT kullanılarak ve kullanılmadan doğan bebeklerin hedef miRNA profili ile anomali varlığının kıyaslanması	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
4.1.	YÜT kullanılarak ve kullanılmadan doğan bebeklerin miR-145 değerlerinin dağılımı	30
4.2.	IVF ve ICSI kullanılarak doğan bebeklerle kontrol grubunun miR-145 dağılımı	30
4.3.	IVF ve ICSI kullanılarak doğan bebeklerle kontrol grubunun miR-483 dağılımı	31

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT) insan infertilitesinde rutin bir tedavi haline gelmiş olmasına rağmen YÜT ile doğan yenidoğanlardaki perinatal, natal ve postnatal sorunların nedeni tam olarak açığa çıkarılamamıştır. YÜT ile doğan bebeklerde kardiyak, nörolojik, kas iskelet sistemi ürogenital sistem ile ilgili anomaliler, YÜT kullanılmadan doğan bebeklere göre daha yüksektir. İnfertilitede sıkça kullanılan yöntemler: İn vitro fertilizasyon (IVF), intrastoplazmik sperm enjeksiyonudur (ICSI). Yardımcı üreme tekniğinde, doğal gebeliğe göre oosit ve embriyo gelişimi dramatik olarak değişmektedir. Epigenetik bazı faktörler, oluşan germ hücreleri ve embriyonun gen ekspresyon düzenini kalıcı olarak değiştirmektedir. Epigenetik faktörler DNA dizisinde değişiklik olmaksızın, mayoz ve mitozla kalıtılan, gen ekspresyonundaki değişiklikleri ifade etmektedir. Örneğin epigenetik değişiklikler genin sessizleşmesine neden olabilir ki bu durum mutasyon eşdeğeri bir sonuca neden olabilir. Epigenetik faktörler genlerin fonksiyonel çalışmasını asetilasyon, metilasyonla ya da histon modifikasyonu ile düzenler. Epigenetik önemli bir faktör de MikroRNA (miRNA)'dır. MiRNA'lar küçük kodlanmayan ve gen ekspresyonunu düzenleyen RNA'lardır. Literatürde çok sayıda hastalıkla ilişkili miRNA değişiklikleri bildirilmiştir. İnfertilite ile ilişkili miRNA'lar da mevcuttur ve infertil çiftlerde, özellikle infertiliteyle ilişkili olduğu bildirilen farklı miRNA değerlerindeki değişiklik dikkati çekmiştir.

Çalışmamızın amacı:

- 1) YÜT kullanılan çiftlerde miRNA değerlerinin YÜT kullanılmayan çiftlerden farklı olduğunu gösteren çalışmalar olmaması nedeniyle, konjenital anomaliler ile YÜT ilişkisinde miRNA'nın önemli bir değişken olabileceği düşünülmüştür. Literatürde epigenetik bir faktör olan miRNA'ların spontan gebelikle doğan yenidoğanlar ve YÜT ile doğan yenidoğanlarda farklı olup olmadığını gösteren bir çalışma yapılmamıştır. Çalışma ile bu farklılığın olup olmadığını gösterilecektir.
- 2) Bu çalışmada karşılaştırma yapılan bebeklerde miRNA profillerinde farklılık belirlenmesi halinde bunun prospektif çalışmalarda

miRNA'ların konjenital anomali gelişimindeki rolün araştırılması açısından katkı sağlayacaktır.

- 3) Hastalarda bakılacak olan infertilite ile ilgili miRNA'ların YÜT ile doğanlarda farklı ve anomali ile ilişkili bulunması halinde infertil çiftlerin YÜT ile gebe kalmadan önce miRNA profilleri bakılarak gebeliğin gerçekleşmesi halinde anomali riski konusunda tanımlanan miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanılabilmesi sağlanabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MikroRNA'nın Genomik Organizasyonu

Küçük kodlamayan RNA'ların bir sınıfı olan miRNA'lar gelişim, homeostaz ve bağışıklık fonksiyonlarında önemli rol oynar (1). MiRNA'ların kanserden inflamasyona kadar çoğu hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir. mRNA yıkılması veya translasyon baskılanması ile gen ekspresyonunu düzenleyen miRNA'ların çeşitli hastalıklardaki rollerinin öğrenilmesi onların yeni bir biyobelirteç olarak değerlendirilmesine yol açmaktadır. MiRNA'ların ekspresyonlarının hücre kaderinin belirlenmesindeki önemli rolü dışında, özel immün cevabı ve inflamatuvar uyarıyı da düzenledikleri belirlenmiştir. Eklem kıkırdağında miRNA ekspresyonlarının araştırılması osteoartrit gibi hastalıklarda hedeflerin tanımlanmasına imkan sağlayabilir (2).

1990'ların başında, mikroRNA'lar (miRNA'lar) ilk olarak *Caenorhabditis elegans*'ta (*C.elegans*) bu organizmaların gelişimini düzenleyen küçük RNA molekülleri olarak keşfedildi (3). Lin-4 denilen genin nematodların gelişimsel yapısından sorumlu olduğu görüldü. İlginç olarak bu genin protein kodlamada rol oynamadığı ancak 22 nükleotid uzunluğunda RNA sentezlediği görüldü. Küçük RNA'nın, lin-14 mRNA'nın 3p-translate edilmemiş bölgesi (3'-UTR) ile etkileştiği gösterilmiştir ki bunun sonucunda lin14'ün sentezinin önlenildiği görüldü (4). Bir süre sonra let-7 adı verilen miRNA'nın da nematodların gelişmesini kontrol ettiği keşfedildi (5). Takip eden yıllarda, birçok miRNA keşfedildi. Sadece gelişim aşamalarında değil apoptoz, proliferasyon ve diğer hücre fonksiyonlarında da rolleri olduğu anlaşıldı (1). Bugüne kadar insanlarda 700'den fazla miRNA keşfedildi. MiRNA'lar insan genomunun sadece %1-3'ünü oluşturmasına rağmen bunların tüm insan genlerinin %30'undan fazlasını düzenlediği tahmin edilmektedir (6, 7). Fonksiyonel olarak aktif miRNA'lar, miRNA-indükleyen susturucu kompleks olarak adlandırılan bir ribonükleotid-protein kompleksi olarak işlev görür (8). MiRNA biyogenezinde yer alan proteinlerdeki herhangi bir düzensizlik, bunların ekspresyonu ve hedef mRNA'ya bağlanmalarını etkileyerek hücre fizyolojisi üzerinde zararlı etkilere neden olmaktadır (1).

İnsan genomunda 30.073 gen olduğu bilinmektedir. Bu genlerden 21.598 tanesi protein kodlamada görev alırken, 8.475 tanesi RNA genleri olarak görev yapar. Hücrede proteine çevrilmeyen RNA molekülleri, kodlamayan RNA'lar (non-coding RNAs, ncRNA'lar) olarak adlandırılır. ncRNA'lar, uzun kodlamayan RNA'lar (long non-coding RNA, lncRNA), küçük kodlamayan RNA'lar (snoRNA'lar, piRNA'lar, siRNA'lar ve miRNA'lar) olarak ikiye ayrılır. Kodlamayan RNA'lar biyolojik sürecin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. MiRNA yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda tek iplikçikli RNA molekülü türüdür ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynar (9). miRNA'nın etkileri ilk 1993'te Lee ve çalışma arkadaşları tarafından Victor Ambros laboratuvarında *C. elegans* solucanında keşfedilmiş ve varlıkları çeşitli bitki ve hayvanlarda gösterilmiştir (1, 9). Her geçen gün sayısı artan miRNA'lara ait bilgiler miRBase isimli merkezi bir veri tabanında toplanmaktadır. Haziran 2014 tarihi itibarıyla bu veri tabanına giriş yapılan miRNA sayısı 28.645'e ulaşmıştır (10).

mRNA parçalanması veya translasyon inhibisyonu ile gen ekspresyonunu düzenleyen, küçük kodlamayan RNA'ların bir sınıfı olan miRNA'ların keşfiyle normal gelişim süreci ve hastalıklardaki rollerinin araştırılması onları yeni bir biyobelirteç sınıfı yapmaktadır (11, 12). MiRNA'ların gelişim, homeostaz ve bağışıklık fonksiyonlarında önemli bir rol oynadığı, hücre çoğalmasını ve apoptozu düzenlediği gösterilmiştir (1, 9, 11-13). MiRNA'ların kanserden inflamasyona kadar çoğu hastalıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte birçok miRNA'nın dizileri, temel ekspresyon bilgileri ve fonksiyonları hakkında yapılan araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır (12, 14).

MiRNA'lar diğer genler gibi DNA üzerinden transkribe edilir ve proteine dönüştürülmeden küçük RNA molekülleri halinde gen regülasyonunda görev alır. MiRNA'lar post-transkripsiyonel olarak gen ekspresyonunu kontrol eden moleküllerdir. mRNA'ların çevirime uğramayan bölgeleriyle (UTR- untranslated region) baz eşleşmesi yaparak onların yıkımını sağlar veya translasyona uğramalarını engellerler (1, 11, 13).

MiRNA'lar miRNA genlerinden RNA Polimeraz II tarafından transkribe edilir. Oluşturulan transkript 'cap' ve 'poli (A)' kuyruğuna sahiptir. Bu oluşan ilk transkript primer-miRNA (pri-miRNA) olarak isimlendirilir. pri-miRNA'lar saç

tokası şeklindedir. Bu yapıda olgun miRNA dizisi loop yakınındaki sap kısmında bulunur. Pri-miRNA iki adımlı bir süreçten geçerek olgun ve işlevsel miRNA haline gelir. İlk adım çekirdekte gerçekleşir ve pri-miRNA 'mikroişlemci kompleks' adlı bir protein kompleksi tarafından kesilir. Mikroişlemci komplekste Drosha adlı bir nükleaz ve DGCR8 (DiGeorge critical region 8) adlı çift iplikçikli RNA bağlayıcı protein bulunur. Drosha enzimi pri-miRNA'nın sap-ilmek yapısını tanıyarak sap kısmında belli bir noktadan kesim yapar. 160 kD'luk bir nükleaz ribonükleaz III endonükleaz olan Drosha, yaklaşık 200 nükleotit büyüklüğündeki pri-miRNA'yı keserek 70-80 nükleotitlik sap-ilmek şekilli, prekürsör-miRNA'yı (pre-miRNA) ortaya çıkarır. Drosha'nın tanımadaki bu özgülüğü, yardımcı proteinlerle sağladığı düşünülmektedir (1, 9, 11, 13). Pre-miRNA'lar nükleustan sitoplazmaya Exportin-5 (XPO5) isimli taşıyıcı protein ile taşınır. XPO5, Ran-GTP ve pre-miRNA ile heterotrimerik yapı oluşturur. Bu yapı pre-miRNA'nın yapısını stabilize ederek hücre zarında bulunan porlardan sitoplazmaya taşınmasını sağlar. Sitoplazmada Ran-GTP'nin Ran-GDP'ye hidrolize olmasıyla pre-miRNA serbest kalır (13). İkinci adım sitoplazmada gerçekleşir ve pre-miRNA 200 kD'luk sitoplazmik ribonükleaz III enzimi Dicer ve çift zincirli RNA bağlanma proteini olan TRBP (Transactivation-responsive RNA-binding protein) tarafından ilmek kısmından kesilerek çift dal RNA dubleks oluşturulur. Bu dubleks yapıda hem olgun miRNA dalı hem de onun tamamlayıcı dalı birlikte bulunur. Tamamlayıcı dal uzaklaştırılarak yaklaşık 22 nükleotitlik uzunluğunda tek zincirli olgun miRNA oluşur (1, 9, 11, 13). Olgun miRNA'lar işlevlerini gerçekleştirmek için başka proteinlere de ihtiyaç duyar. Bu proteinlerle birlikte RNA ile tetiklenen sessizleştirici kompleks (RNA-induced silencing complex; RISC)'i oluştururlar. Bu yapıda en iyi tanımlanmış proteinler Argonat ailesi proteinleridir (12, 13). Olgun miRNA bu yapıya katılırken tek zincir hale geçer. Argonat protein ailesinin üyeleri Dicer'a benzeyen PAZ bölgesiyle tek zincir RNA'nın 3' ucuna bağlanır. Yapılan çalışmalar Argonat proteinlerinin hedef mRNA'yı kesen endonükleazlar olduğunu göstermektedir (1, 9, 12, 13).

RISC kompleksi miRNA'ların sahip oldukları 6-8 nükleotitlik tohum dizisiyle hedef mRNA'nın 3' UTR bölgesine yönelir ve etkilerini hedefledikleri mRNA'nın 3' UTR bölgesindeki baz eşleşmesine göre gösterir. 3' UTR

bölgesinde yüksek oranda baz eşleşmesi varsa mRNA yıkılır. Memelilerde olduğu gibi baz eşleşmesi azsa mRNA'nın translasyonu baskılanır. MiRNA'lar hedef mRNA üzerinde genellikle 3' UTR bölgesine bağlanarak gen ifadesini baskılar. Bununla birlikte 5' UTR bölgesini veya açık okuma çerçevesini (ORF-open reading frame) hedef aldıkları durumlarda da gen ifadesi baskılanır (1, 9, 11-13).

2.2. MikroRNA Klinik Önemi ve Kullanım Alanları

MiRNA'lar, transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası seviyelerde gen ekspresyonu düzenleyicileri olarak işlev gören yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda küçük kodlayıcı olmayan RNA'lardır. MiRNA'ların ilk doksanlı yıllarda ilk keşfedildiği gerçeğinin altını çizmekle birlikte, sinir sistemindeki rolleri yakın zamanda anlaşılmaya başlanmıştır. Geçtiğimiz on yıl boyunca, artan kanıtlar, nöronal gelişim ve nöronal fonksiyonda miRNA'ların temel rolünü gösterdiler (15-18). Örneğin, mikroRNA ekspresyon modelleri nöronlar, oligodentositler, astrositler dahil olmak üzere spesifik hücre popülasyonlarında beyin gelişimi sırasında incelendi. Kemirgenlerde ve hücre kültürlerinde yapılan bu çalışmalara ilaveten, gelişmekte olan insan beynindeki miRNA ekspresyonunu ölçen çalışmalar da yapıldı. Ekspresyon profillerinde, doğum sonrası ve yetişkin zaman noktalarının yanı sıra, 12-24 hafta gestasyonel yaşları temsil eden post-mortem beyin dokularında miRNA'ların farklı zamansal ekspresyon modellerini ortaya koyuldu (15, 19). Nöronal miRNA ekspresyonuna son zamanlardaki ilgiye rağmen, sağlıklı ve yaralı sinir sisteminde tam olarak miRNA fonksiyonlarının anlaşılması tam olmaktan uzaktır. Tek bir mikroRNA'nın çoklu genlerin ekspresyonunu modüle edebilmesi gerçeği, beyindeki spesifik bir miRNA'nın rolünün kesin tanımlanmasına ek bir karmaşa getirir. Literatürdeki mevcut görüş miRNA'nın gen ifadesinin işlevini dinamik şekilde etkilediği yönündedir. Transkripsiyonel baskılayıcılara kıyasla, miRNA'lar transkripsiyon sonrasında hedef protein seviyelerini daha hızlı etkileyebilir (15, 20). İlginç bir şekilde, miRNA'ların, transkripsiyon baskılayıcılarının regülasyonu yoluyla fare embriyonik kök hücrelerinde de novo DNA metilasyonunu kontrol ettiği gösterilmiştir (15, 21). Öte yandan, post-mitotik nöral gelişim ve dendritik morfojezin, kromatin-remodeling komplekslerinin değiştirilmesi yoluyla

miRNA'lar tarafından düzenlendiği de gösterilmiştir (15, 22, 23). Dolayısıyla, miRNA'lar farklı seviyelerde epigenetik regülasyona dahil olabilirler.

Plasenta, gelişmekte olan fetüsü maternal rahim duvarına bağlayan önemli bir geçici organdır. Embriyonik ve maternal ortamlar arasında gazlar, besinler, hormonlar ve atıkların değiş tokuşuna katılır ve önemli endokrin ve koruyucu fonksiyonlara hizmet eder. Plasentadaki patolojik süreçler sıklıkla hamilelik sırasında preterm doğum, preeklampsi ve fetal büyüme kısıtlaması gibi komplikasyonlarla ilişkilidir (15, 24, 25). Normal ve patolojik koşullarda plasenta spesifik gen ekspresyonunu düzenlemede miRNA'ların rolü açık değildir. Artan kanıtlar miRNA'ların plasental gelişim için önemli düzenleyiciler olduğunu göstermektedir, ancak plasental stres cevabındaki rolleri yeterince araştırılmamıştır. Riskli gebeliklerde plasentada anormal miRNA ekspresyonu bildirilmiştir (15, 26, 27). Önceki çalışmalar özellikle preeklampitik plasentalarda miR-34a'nın aşırı ekspresyonu gibi spesifik miRNA'lara odaklanmıştır (28). Bunlar gibi çalışmalar, plasental miRNA'ların gebelik sonuçları ve döl gelişiminin biyobelirteçleri olarak potansiyelini vurgulamaktadır.

Genel olarak stres tepkilerinde miRNA'ların rolü, özellikle stresli koşullar altında beyindeki rolleri de dahil olmak üzere, kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır (15, 29, 30). Yapılan araştırmalar, çok hafif psikolojik stresin bile sıçan beynindeki miRNA ekspresyonunda uzun süreli değişikliklere neden olabileceğini göstermiştir (15, 31). Doğum öncesi stresin insanlarda nörolojik ve psikiyatrik bozukluklarla ilişkili miRNA imzaları oluşturduğunu ortaya koymuştur. Bu durum, erken olumsuz deneyimlerin beyinde potansiyel olarak uzun vadeli epigenetik biyobelirteçlerle ilişkili olduğunu göstermektedir (15, 32, 33). Bu miRNA stres imzalarının bazılarının, sonraki nesillere davranışsal ve uyumsal olarak davranışsal ve uyumsuz sonuçlara yol açabileceğini beklemek mantıklı görünmektedir. Olumsuz bir prenatal çevreye ve nesiller boyunca sahip oldukları etkilere cevaben yaşam boyu sağlık programlamasında miRNA'ların kritik rolü henüz sistematik bir şekilde araştırılmamıştır (15). MiRNA'lar inme, alzheimer hastalığı, parkinson hastalıkları, huntington hastalığı, multipl skleroz, şizofreni, otizm, anksiyete, depresyon ve bipolar bozukluk gibi sinir sistemi hastalıklarının çoğunda yer almıştır (15, 34). Önceki çalışmaların en ilgi çekici sonucu,

dolaşımdaki miRNA'ların SSS hastalıklarının teşhis ve prognozu için potansiyel biyobelirteçler olarak ortaya çıkmasıdır (15, 35). Epigenetik kalıtım son yıllarda giderek artan oranda dikkat çekmesine rağmen, memelilerde miRNA'ların jenerasyonlar arasında kalıtımı henüz gösterilmemiştir (15).

MiRNA'lar metilasyon mekanizmasını ve histon modifikasyonlarında yer alan proteinlerin ekspresyonunu etkileyebilir. Bu mekanizmalar daha sonra gen ekspresyonunu ve sonuçta ortaya çıkan fenotipi belirleyebilir. Örnek olarak miRNA'ların ve miRNA'ların hedeflemesinin epigenetik susturulması histon deasetilazların kanserde rol oynadığı açıklanmıştır. Diyetle indüklenen paternal obezite sperm miRNA içeriğini module eder, soyun sağlığını programlar ve obezitenin gelecek nesillere geçişini başlatan potansiyelize eder (14). Son tanımlamalar, miRNA moleküllerinin serumda var olduklarını ve klinik tanıda biyobelirteç olarak kullanılabileceği göstermiştir. Dolaşımdaki miRNA moleküller serumda proteinlere bağlı olarak veya veziküller içinde buluna bilmektedir. MiRNA'ların serumda sinyal molekülleri ve hormonlar gibi biyolojik fonksiyonlara sahip olabileceği düşünülmektedir. Over spesifik miRNA'ların belirlenmesi ovaryan rezerv, ovaryan endokrin fonksiyon, ovulasyonu indükleyici ilaçların etkisi, embriyo implantasyonu süreci açısından büyük bir bilgi potansiyeli taşımaktadır (36).

MiRNA'ların öneminin yakın zamanda anlaşılması biyomedikal araştırma topluluğunun ilgisini çekmiştir. Araştırmacılar miRNA'ların siRNA'dan sonra, önemli terapötik moleküler sınıfında olduğuna inanmaktadır. Bunlar, birçok terapötik uygulamaya bağlı olarak siRNA'lara göre önemli avantajlara sahip olacaktır. Birkaç miRNA'nın yanlış düzenlenmesi, insanlarda ve diğer organizmalarda bazı hastalıkların gelişimiyle bağlantılıdır (12, 37). Hayvan modellerinde düzensiz miRNA'ların normal seviyelerine restorasyonu tümörler dahil olmak üzere hastalıkları azalttığı hatta ortadan kaldırdığı gösterildi (37). MiRNA'lar doğal olarak meydana gelen moleküller olduğundan, terapötik madde olarak uygulamalarında belli avantajları vardır. Dünya çapında araştırmacılar bu teoriyi doğrulamıştır. Şöyle ki; sentetik olarak sunulan "miRNA yerine koyma tedavisi" ile bir veya daha fazla miRNA'nın yanlış düzenlenmesinden etkilenen işlevler geri kazanılabilmektedir. MiRNA'lar veya miRNA-mimetikleri hastalıklı

dokulara yerleştirerek normal proliferasyon, apoptoz, hücre döngüsü ve diğer hücrel geri yükleme sağlanabilmektedir (12, 38). Belirli bir hastalığa bağlı belirli bir miRNA'nın inhibisyonu, bir terapötik proteinin ekspresyon bloğunu kaldırabilir. Öte yandan, bir miRNA mimetiğin uygulanması endojen miRNA popülasyonunu artırarak zararlı bir geni bastırabilir. Bu durumda, miRNA'nın aktivasyon veya inhibisyonu önemli bir terapötik etki demektir (39). Öncü ilaç firmaları çeşitli miRNA inhibitörleri ve miRNA mimetikleri kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik bozukluklar ve viral enfeksiyonlarda tedavi edici kullanmak üzere çalışmaları başlatmıştır.

2.3. İnfertilite ve Yardımcı Üreme Teknikleri

İnfertilite, çiftlerin bir yıl süre ile korunmaksızın düzenli cinsel ilişkide bulunmalarına kadının rağmen gebe kalamamasıdır. Üreme çağındaki çiftlerin %10-15'inde infertiliteye rastlanır. İnfertilitenin sıklığı ve nedenleri bir toplumdan diğerine farklılık gösterir. Çiftlerin %30-40'ında erkek, %40-50'sinde ise kadın infertilitesi mevcuttur. %10-15 çift ise günümüzdeki mevcut standart tanınan testler ile açıklanamayan infertiliteye sahiptir. İnfertilitenin en sık sebepleri: Ovuluar bozukluklar, tubal&peritoneal patolojiler ve erkek faktörleridir. Günümüzde infertil çiftlerde çok çeşitli tedavi seçenekleri mevcuttur.

Yardımcı üreme teknikleri, yumurtalıktan oositlerin doğrudan alınmasını içeren tüm tekniklere karşılık gelir. IVF işlemi dışardan gonadotropin verilmesi ile yapılan kontrollü over uyarılmasını, transvajinal ultrasonografi altında oosit toplama işlemini, laboratuvarda fertilizasyonu ve embriyoların uterusu transservikal olarak transferini içeren YÜT'lerden birisidir. İlk ve hala en yaygın prosedür "in vitro fertilizasyon (IVF)" olmakla beraber artan bir YÜT listesi mevcuttur:

- IVF-in vitro fertilizasyon: oosit ekstraksiyonu, laboratuvarda fertilizasyon, embriyoların rahim içine transservikal transferi
- GIFT-gametinin fallopian tüpe transferi: oosit ve spermin fallop tüpüne yerleştirilmesi

- ZIFT-zigotun fallopian tüpe transferi: döllenmiş oositlerin fallop tüpüne yerleştirilmesi
- TET-tubal embriyo transferi: fallop tüpüne bölünmüş embriyoların yerleştirilmesi
- POST-peritoneal oosit ve sperm transferi: oosit ve spermin pelvik boşluğa yerleştirilmesi
- ICSI-intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu

IVF ile doğan ilk çocuğun doğumundan bu yana yirmi yıldan fazla olmuştur. Aradan geçen yıllarda IVF programlarının sayısı sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde 250'nin üzerine çıkmış, teknoloji gelişmiştir, başarı oranı önemli ölçüde artmıştır ve IVF için endikasyonlar genişlemiştir. YÜT klinik pratiğin bir parçası haline gelmiştir (40).

2.4. YÜT İle Doğan Bebeklerde Görülen Konjenital Anomaliler ve Meydana Geliş Mekanizmaları

YÜT, insan infertilitesinde rutin bir tedavi haline gelmiş olmasına rağmen YÜT ile doğan yenidoğanlardaki perinatal, natal ve postnatal sorunların nedeni tam olarak açığa çıkarılamamıştır. Yardımcı üreme tekniğinde, doğal gebeliğe göre oosit ve embriyo gelişimi dramatik olarak değişmektedir (41). IVF ve ICSI'da oositlerin in vivo olarak gonadotropinlerle ovaryan stimülasyondan sonra olgunlaşır. Çok sayıda fare çalışmasında süperovulasyonun: İndüklenmiş oosit kalitesiyle, gecikmiş embriyonal ve fetal gelişim ile, post zigotik genomun bozukluğuyla, oositte, embriyoda, fetusta, plasentada oluşan farklı DNA metilasyon ve ekspresyonu ile ilgili olduğu bulunmuştur. Aynı etki insan embriyolarında da oluşmaktadır. YÜT ile doğanlardaki genetik ve epigenetik sonuçlarını belirlemek adına yapılan çalışma oldukça azdır (42). Epigenetik etkilenmenin YÜT'ün hangi aşamasında meydana geldiği net değildir ancak indüklenme ve ekzojen gonadotropin kullanımının epimutasyon insidansını artırdığı bildirilmiştir (43). YÜT uygulamalarının neden olduğu hormonal dengesizlikler, fetal gelişme geriliği veya erken doğum gibi problemlerin de erişkinlikteki reproduktif patolojilerle bağlantılı olabilecekleri öne sürülmektedir (42). Dolayısıyla infertilite ilişkili genetik değişiklikler, hastaların YÜT

uygulamaları ile doğan çocuklarında da çeşitli patolojik değişikliklerin temelinde rol oynuyor olabilir. Buna bağlı olarak çalışmamızda hedef olarak belirlenen miRNA genlerinin seçiminde blastosist gelişiminde rol almak yanında infertilite etiyojisi ile de ilişkisi bildirilen miRNA molekülleri göz önünde bulundurulmuştur.

YÜT kullanılarak doğan çocuklarda konjenital malformasyon oranının artması olasılığı konusunda her zaman endişe vardı. IVF'te sperm ve yumurtalar normal ortamlarından uzaklaştırılır ve değişen hormonlara, işleme ve kültür ortamlarına maruz kalır. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) gibi yeni teknikler ve preimplantasyon genetik tanısı (PGD) daha da invaziv olup, potansiyel olarak gelişmekte olan embriyoyu daha büyük bir malformasyon riski altında bırakmaktadır (44). Major anomaliler fonksiyonel bozukluğa, minör anomaliler de kozmetik sorunlara neden olan anomaliler şeklinde tanımlanır.

YÜT sonuçlarının incelenmesi zorluklar taşımaktadır. İlk çalışmalarda sayı azdı ve çoklu doğumlar fazlaydı. Metodolojik olarak bu grupları çalışmak zorluklar içeriyordu. İnfertilitenin altta yatan nedeni de gebelik kaybına ve konjenital anomalilere yol açabilmektedir. Bu tekniklerin sonucunda daha fazla bebek doğduğu için, sonuçlar her geçen gün artmaktadır. Spontan gebe kalanlara göre YÜT'le gebe kalanların daha yüksek doğumsal malformasyon riski olduğunu gösteren kanıtlar artmaktadır. İngiltere ve Avusturalya'da yapılan geniş çaplı çalışmalarda YÜT ile doğan bebeklerde düşük doğum ağırlıklı doğum ve prematürite riskinin artmış olduğu gösterilmiştir (45-48). En iyi kanıtlanmış YÜT riski çoklu doğumdur. Çoklu doğumlarda daha erken doğum, daha düşük doğum ağırlığı ve doğuştan malformasyona sahip olma ihtimali daha fazladır. Günümüzde tek embriyo transferi ile bu risk düşmüş olsa da spontan gebelikle doğan bebeklere göre YÜT ile doğan bebekler daha fazla mortalite ve morbiditeye sahiptir (46, 49). Sistematik bir derlemede YÜT ile olan tekiz doğumlarda preterm doğum (<32 hafta) açısından relatif risk 3.27 bulunmuştur (46).

YÜT ile olan gebeliklerde konjenital anomaliye neden olan mekanizmalar üç başlık altında incelenebilir.

1) Nokta Mutasyon

Çok nadir vakalarda ebeveynlerde infertiliteye neden olan mutasyon, bebeklerde konjenital anomali sebebi olarak bulunmuştur. İdiopatik hipogonadotropik hipogonadizmi bir anneden ovulasyon indüksiyonu ile doğan bir bebekte anoftalmi, bir bebekte de unilateral mikroftalmi saptanmış. Anne ve iki bebekte SOX2 mutasyonu saptanmış (50). Çalışmalarda oligospermik ve azospermik hastalarda kistik fibrozis transmembran regülatör (CFTR) mutasyonu saptanmış (51). Eğer annede de CFTR heterozigot mutasyonu mevcutsa bebekte KF olma ihtimali yüksektir (44).

2) Kromozomal Bozukluklar

Kromozomal bozukluklar YÜT sonucunda malformasyonu olan hastalarda nadir nedenler arasındadır. %4.6 infertil oligospermik ve %13.7 aspermik erkekte eş zamanlı Y kromozomunun uzun kolunda delesyon şeklinde kromozomal bozukluk bulunmuştur (52, 53). Başka bir çalışmada azospermik hastalarda karyotip anormalliği saptanmış, bunların da %80'inde kleinfelter sendromu bulunmuştur (54). ICSI ile doğan iki vakada ambigus genitale bildirilmiş olup karyotiplerinin ring Y ile uyumlu olduğu bunun da oligospermi nedeniyle infertil olan babalarından kalıtıldığı görülmüştür (55). IVF ile embriyo kriyoprezervasyonu yapılan kişilerde trizomi 21 ile birlikte olağan dışı bir karyotip bildirilmiştir. Aynı çalışmada, bir hücre hattının bir Robertsonian translokasyonunun bir parçası olarak bir kromozom 21 kopyası içerdiği ve diğer hücre soyunun bir halka kromozomu içerdiği bir mozaik tarif edilmiştir (56). Bettio ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise YÜT ile oluşan gebelikler sonucu ve subfertil çiftlerde oluşan spontan gebelikler sonucunda oluşan düşük materyallerinde anormal karyotip oranı sırasıyla: %63.2 ve %71 olarak bulunmuştur (57).

3) Epigenetik Anormallikler

DNA dizisinde değişiklik olmaksızın, çevresel veya farmakolojik etki ile genetik ekspresyonun etkilenmesi halidir. Diğer bir deyişle, genomik

mekanizmalar dışında gen ekspresyonunda sabit değişiklikler olması ve bunların kalıcı fenotipik etki oluşturmasıdır (58). Epigenetik DNA sekanslarının etkilenmediği, DNA'nın fonksiyonel modifikasyonudur. Epigenetik faktörler, bu modifikasyon etkisini, gen ekspresyonunu doğrudan etkileyip hücre fonksiyonunu değiştirerek yapar (59). Önemli bir epigenetik faktör de miRNA'dır.

İnsan genlerinin yaklaşık %1'inin imprinted olduğu düşünülmektedir, tipik olarak paternal olarak eksprese edilen genler büyümeyi desteklerken maternal olarak ifade edilen genler büyümeyi baskılamaktadır. Bu kökene özgü ifadenin sinyali, diziden ziyade DNA'nın yapısını değiştirerek metilasyon ve histon modifikasyonu biçimindeki bir epigenetik değişimdir. Her jenerasyonda, imprinted sinyal silinir ve gametogenez sırasında yeniden kurulur. Bazı mekanizmalar imprinting hatalarına yol açabilir, bunlardan bazıları tanınmış sendromlara neden olur. İmprinted bir genin bir allelinde, bir genin veya onun imprinting kontrol merkezini kapsayan ekspresyonunu veya daha büyük bir silmeyi önleyen bir mutasyon olabilir. Bir çocuk, tek ebeveyninden bir kromozomun iki kopyasını alabilir. Alternatif bir mekanizma metilasyonu etkileyen bir epigenetik anormalliktir (44). YÜT sonrası doğan çocuklarda beklenmedik şekilde artmış imprinting bozukluk oranları bildirilmiştir. Analiz, bu bireylerde imprinting defektlerinin büyük ölçüde epigenetik defektlerden, özellikle anormal DNA metilasyonundan kaynaklandığını göstermektedir (60, 61). İmprinting sinyalinin silinmesinin ve yeniden kurulmasının bazı YÜT formları tarafından bozulabileceği varsayılmaktadır. Embriyoya YÜT tarafından getirilen talepler, sonuçta bu gibi imprinting bozukluklara yol açan fetal epigenetik uyarıları indükleyebilir. Değiştirilmiş epigenetik paternler YÜT ile oluşturulan embriyolar, kordon kanı ve plasentada bulunmuştur (62). Epigenetik sinyalin kaybı veya kazanımı maternal veya paternal allelde ortaya çıkabilir, ancak YÜT çocuklarını etkileyen çoğu vakada sorun maternal allelde hipometilasyondur (63). YÜT nedeniyle, daha yüksek insidanda imprinted genlerin dengesizliğini veren büyük delesyonlar veya duplikasyonlar gibi başka mekanizmaların kanıtı yoktur. YÜT anneleri tipik olarak daha yaşlıdır, dolayısıyla uniparenteral dizomi insidansının artması beklenebilir (44). Bu imprinting defektlere neden olan anormal metilasyonun YÜT tarafından kapsanan veya

subfertilite ile ilişkili birçok işlemde biri olup olmadığını bilmek zordur. İnfertil kadınların süperovüle oositlerin çalışmaları değişmiş metilasyonu göstermiştir (64). YÜT ile doğan yenidoğanlarda imprinting defektleri açısından artmış prevalansa sahip olduğu gösterilmiştir. İlk zamanlarda bu hastalıklar tekli olgu sunumu şeklinde bildirilirken Danimarka, İngiltere, Hollanda'da yapılan geniş epidemiyolojik çalışmalar YÜT ile doğan çocuklarda görülen imprinting defektlerinin nadir bir durum olmadığını göstermiştir. YÜT sonrası daha yüksek oranlarda görülen iki özel imprinting sendromu: Angelman sendromu (AS) ve Beckwith Wiedemann sendromudur (BWS). BWS neonatal hipoglisemi, makroglossi, makrozomi ve orta hat abdominal duvar defektleri (omfalosel, umbilikal herni, diastasis recti) ile seyreden aşırı büyüme sendromudur. Kromozom 11p15'i etkileyen uniparenteral bozukluk veya imprinting defekt sonucunda oluşur. Birçok çalışma YÜT sonrası doğan çocuklarda BWS sıklığının arttığını bildirmiştir (65, 66). Angelman sendromu şiddetli zihinsel gerilik, konuşma bozukluğu, mutlu bir tavır, ataksi, nöbetler ve mikrosefali ile karakterizedir. Kromozom 15q11-13 maternal kopyasını etkileyen anormalliklerden kaynaklanır. Olguların %5'i bir imprinting defektine ilişkilidir. Erken vaka raporları, ICSI kullanarak metilasyon kaybına sekonder gelişen AS olgularını açıkladı. YÜT kullanılarak doğan çocuklarda daha yüksek AS vakaları metilasyon defektlerinin bir sonucu olarak görülmektedir. İlginç bir şekilde Alman kohort, subfertil çiftler tarafından spontan gebelikle doğan olan çocuklarda metilasyon defektleri ile AS bildirmiştir (67). Bazı çalışmalar YÜT ile gerçekleşen gebeliklerden doğan yenidoğanlarda ve abort materyallerinde önemli bir epigenetik faktör olan metilasyon ve bununla ilişkili olduğu bilinen LIT1 (BWS ICR2), H19 (BWS ICR1) ve IGFR2 geni lokuslarında YÜT'lilerde spontan gebelikle doğanlara anlamlı bir farklılık göstermiştir. Bu durumu destekleyecek şekilde YÜT ile oluşturulan insan embriyolarında H19 metilasyonu gösterilmiştir. Daha ileri araştırmalarda YÜT ile doğanlarda spontan gebelikle doğanlara göre metilasyon dizilerinde minör fakat anlamlı farklılık bulunduğunu göstermiştir. Bu bulunan sonuçlara rağmen anormal metilasyonun germ hücrelerinde mi yoksa preimplantasyon aşamasında mı oluştuğu kesin belli değildir (42).

İki vaka raporu, ICSI ile doğan Russell-Silver sendromlu bebeklerde paternal olarak ortaya çıkmış H19 / IGF2 lokusunun hipometilasyonunu tarif etmiştir. Klasik olarak tanınan imprinting sendromlarının ötesinde, spontan gebelik sonrası nöral tüp defektleri oluşan bebeklerde hipometilasyon bulunmuştur (68, 69). Tüm bunlara rağmen tam tersi sonuç bulan çalışmalar da literatürde mevcuttur. Danimarka ulusal IVF kohort çalışması 1995-2001 yıllarında IVF ile doğan 6052 bebekte imprinting bozukluk saptamamıştır (67).

IVF ve artmış konjenital anomaliler arasında bağlantı son yıllarda sıkça tartışılmaktadır. Yakın zamanda yapılan çok sayıda çalışma IVF'li doğan bebeklerde genel ve özellikle kardiyak konjenital anomali riskinin artmış olduğunu göstermektedir. Spontan gebelikle kıyaslandığında IVF ile doğan yenidoğanlarda %6,2'sinde, ICSI ile doğan yenidoğanların %5'inde major doğumsal anomali saptanmaktadır. Ayrıca YÜT doğan yenidoğanlarda kardiyovasküler anomaliler ek olarak kas iskelet sistemi anomalileri ve Prader Willi sendromu, Angelman Sendromu vb bozukluklar daha sık görüldüğü bildirilmiştir (41).

2012 yılında Wen ve arkadaşlarının YÜT ile doğan çocuklarda konjenital anomali sıklığını inceledikleri meta analiz çalışmasında 56 çalışmanın 46'sında 124.468 YÜT ile doğan hastada konjenital anomali saptamıştır (70). 2016'da yapılan bir çalışmada YÜT ile doğan 2414 bebek alınmış ve 90'ında (%3.8) major konjenital anomaliler, 11'inde ise (%0,5) minör konjenital anomaliler saptanmış. Bunların arasında en sık görülen majör konjenital anomaliler ise kardiyovasküler (25, %1,1), genitoüriner (21, %0.9) ve gastrointestinal (9, %0.4) sistemleri tutan anomaliler şeklinde raporlanmış (71).

YÜT ile doğan çocuklarda malformasyonlara bakıldığında çok sayıda çalışma yapılmıştır. YÜT kullanan çiftler, genel popülasyondan birkaç yönden farklıdır ve sonuçlar, yeterli kontrol grupları bulmakta güçlükle özellikle karmaşık hale gelmiştir. Tipik olarak daha yaşlı, daha yüksek sosyoekonomik statüye sahip ve infertildir. İnfertilitenin altta yatan nedeni, kendi başına malformasyona yol açabilir. Çiftler, IVF tarafından olan gebelikleri sonlandırmaya daha az eğilimli olabilir, bu da konjenital malformasyonlu doğan çocukların oranını arttırır.

YÜT'ün sadece belirli tipte malformasyonlara eğilim yaratması olasıdır. İlk Avustralya çalışması kardiyak ve nöral tüp defektleri ile bir bağlantı olduğunu iddia etmiştir (72). İsveç'te IVF sonrası yapılan erken dönem çalışması nöral tüp defekti, omfalesele ve özefagus atrezisinin arttığını göstermiştir (73). ICSI sonrası hipospadias için artmış risk olduğu gösterilmiştir. YÜT'de artmış hipospadias için potansiyel bir açıklama, spermatogenezi olumsuz etkileyen, kalıtsal düşük testosterondur (74). Yine bu popülasyonda nöral tüp defekti, koanal atrezi ve sindirim sistemi atrezisi riskinde artış bulunmuş (44). Avustralya çalışmasında abdominal duvar defektleri, vertebral segmentasyon defektleri, trakeoözofageal fistül, diyafragmatik defektler, nöral tüp defektleri, anal atrezi ve renal agenezis gibi gebeliğin ilk 4 haftasında ortaya çıkan blastogenez doğum kusurları ile YÜT arasında spesifik bir ilişki bulunmuştur. Bu anomaliler 1/160 YÜT'lü doğan bebekte görülürken spontan gebelikte doğanlarda 1/400 şeklinde görülmüş (75). Genel olarak görüş birliği, hem geleneksel IVF'in hem de ICSI'nın -ICSI'de artan cinsiyet kromozom anormallikleri ve hipospadias haricinde- aynı artmış riski göstermesidir.

Lacamara ve arkadaşlarının yaptığı sistematik derlemede 21 çalışma ele alınmış. Konjenital malformasyon riski, ICSI'de %7.1 ve genel popülasyonda %4.0 bulunmuş (OR 1.99) (76).

Kardiyak anomalilerin değerlendirilmesinde zorluklar vardır. Bir patent duktus arteriyozus doğuştan normaldir, ancak kısa süre sonra term bebeklerde kapanır; prematüre bebeklerde kalıcılığı normaldir ve cerrahi ligasyon gerekebilir. Ventriküler septal defektler genellikle doğumda belirgin değildir ancak dolaşım postnatal yaşam için uyarıldığında doğumdan bir hafta sonra ortaya çıkar. Bu geçici değişimlerin hesaba katılması kolay değildir (74). Tararbit (77) YÜT'ün özellikle ventriküloarteriyel bağlantılar, kardiyak nöral krest defektleri ve çift çıkışlı sağ ventrikül malformasyonları ile bağlantılı olduğunu bulmuştur. Yine retrospektif bir kohort çalışması da, YÜT tarafından doğan bebeklerde kontrollere göre daha yüksek oranda kardiyovasküler malformasyon bulmuştur (78). Fetal ekokardiyografide genel popülasyonun üzerinde konjenital kalp defektlerinde artış saptanmazken, daha önce elde edilen bulgulara ek olarak tekil gebeliklere oranla ikiz gebeliklerde daha yüksek oranlar saptandığı söylenebilir (60).

Çeşitli çalışmalar IVF sonrası doğan çocuklarda serebral palsi oranının arttığını bulmuştur (67, 79, 80). Hvidtjørn'a göre bu durumlar çoklu doğum ve erken doğum oranının yüksek olmasından kaynaklanmaktadır (79).

80 çalışmanın alındığı sistematik derlemede YÜT ile doğanlarla spontan gebelikle doğanların nörogelişimsel sonuçları incelenmiş İnfantlarda fark bulunamamış ancak çalışma sayısı oldukça az, süt çocuklarında YÜT grubunda normal bilişsel, davranışsal, emosyonel ve psikomotor gelişim bulunmuş. İlkokul çağında ve adölesanlarda her iki grup benzer ancak bu grupta da çalışma sayısı az (81). Pinborg ve arkadaşları IVF/ICSI ile doğan tekiz ve ikizlerle spontan gebelikle doğan akranlarını kıyaslamış. Tekizlerde 13 yaşa kadar, ikizlerde de 7 yaşa kadar mental retardasyon, serebral palsi, imprinting bozukluklar, otizm, asperger sendromu, psikomotor retardasyon açısından artmış risk bulmamıştır (82).

YÜT gebeliklerinde yapılan erken dönem çalışmalarında spontan gebeliklere kıyasla konjenital anomali sıklığında artış saptanmazken, ilerleyen yıllarda yapılan çalışmalarda anlamlı derecede artış olduğu saptanmıştır. Spontan olan ikizlerde ve YÜT ikizlerinde anormallikler, tekil kontrollere göre artmış olmakla birlikte, şimdiye kadar YÜT'de ilave risk şaşırtıcı bir şekilde kanıtlanmamıştır (74).

2.5. İnfertilite İlişkili MikroRNA'lar (Hedef miRNA'lar)

Birçok çalışma miRNA'ların fertilite ve gelişim ile ilgisini göstermiştir. MiRNA'lar steroid sentezinde gonadal somatik hücrelerinin, granuloza hücrelerinin kontrolünü sağlar. Folikül seçimi, atrezisi, ovulasyonu ve luteolizis endokrin ve parakrin faktörler tarafından yönetilir. Bu faktörler de overlerdeki birçok genin sıkı regülasyonu tarafından düzenlenir. Bu miRNA'lar overlerde gen regülasyonunda anahtar rol oynar. Overlerde en yoğun bulunan miRNA profili: miR-21, miR-99a, miR-125b, miR-126, miR-143, miR-145, miR-199b.

Over tutulumu da olan ve en sık görülen endokrin metabolik hastalıklardan birisi polikistik over sendromudur (PCOS). PCOS steroidogenezdeki bozukluk ve overlerden androjen salınımıyla karakterize bir hastalıktır. Granuloza hücrelerindeki miRNA ekspresyonunun follikülogenez ve ovaryan steroidogenezini

kontrol eden genlere direkt ilişkili olduğu gösterilmiştir. MiRNA ekspresyonundaki değişiklikler foliküler gelişimdeki farklılığı açıklayabilir. Son tanımlamalar, miRNA moleküllerinin serumda var olduklarını ve klinik tanıda biyobelirteç olarak kullanılabileceği göstermiştir. Dolaşımdaki miRNA moleküller serumda proteinlere bağlı olarak veya veziküller içinde buluna bilmektedir. MiRNA'ların serumda sinyal molekülleri ve hormonlar gibi biyolojik fonksiyonlara sahip olabileceği düşünülmektedir. Over spesifik miRNA'ların belirlenmesi ovaryan rezerv, ovaryan endokrin fonksiyon, ovulasyonu indükleyici ilaçların etkisi, embriyo implantasyonu süreci açısından büyük bir bilgi potansiyeli taşımaktadır (36).

YÜT uygulaması sonrasında blastosist, embriyo, fetal dokular ve anomalili çocuklarda epigenetik değişiklikler saptanmıştır. Elde edilen bilgiler özellikle 11. kromozomda yer alan genomik imprintlenme bölgesinin sıklıkla etkilendiğini göstermektedir. Bu bölgede yer alan H19/IGF2 genleri maternal allelin metilasyonu ve imprintlenmesi ile karakterizedir. Buna karşılık paternal H19/IGF2 genleri imprintlenmez ve gen ifadesi gerçekleşir. YÜT uygulanan bireylerde IGF2 gen ifadesinde değişikliklere yol açan metilasyon farklılıkları bildirilmektedir (42). Bunlara ek olarak, IGF2 geni ikinci intronu içinde yerleşik olan miR-483 geninin, IGF2 gen ifadesini düzenleyici fonksiyonları olduğu saptanmıştır (83). Farelerde yapılan bir çalışmada, YÜT uygulamasının karaciğerdeki IGF2 gen ifadesini artırdığı, buna karşılık miR-483 ifadesini baskıladığı gösterilmiştir (84). Tümör dokularında yapılan çalışmalar ise miR-483 ifadesi artışının IGF2 ifadesini de uyardığını ortaya koymuştur (85). YÜT ile doğan yenidoğanlarda miR-483 ifadesi seviyelerini inceleyen bir çalışma henüz literatürde bulunmamaktadır. Bununla birlikte miR-483 ifadesinin preterm doğum yaşanan gebeliklerdeki plasenta dokusunda değiştiği bildirilmiştir (86). Ayrıca PCOS hastalarında ovaryan follikül kümülüs hücrelerinde hem IGF2 hem de miR-483 ifadesinde azalma olduğu rapor edilmiştir (87). MiR-483 geni ilişkili bu veriler, YÜT uygulamalarının ve ilişkili olası epigenetik düzenlenmelerin, miR-483 geni ifade değişikliklerine yol açarak YÜT uygulaması sonrası ortaya çıkan gebelik problemleri ve yenidoğan bulguları ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Embriyonik gelişim süreçlerinde ifade değişikliği gösteren

miRNA genlerinin araştırılması sonucunda çeşitli miRNA moleküllerinin blastosist hücrelerinde ifade edildiği gösterilmiştir. Kromozomal anomali taşıyan blastosistlerde miR-141 dahil çeşitli miRNA genlerinde ifade kayıpları saptanmıştır (88). Anne yaşına ve anöploidi varlığına bağlı olarak da blastosistlerdeki miR-17 ifadesinin etkilendiği rapor edilmiştir (89). Fare embriyolarında yapılan çalışmalarda ise miR-21, miR-23a ve miR-145 genleri ifadesinin DNA metilasyon değişikliklerinden etkilendiği belirlenmiştir (90). Bu veriler YÜT aracılı blastosist gelişimi sırasında, miRNA gen ifadesinin YÜT kullanımından etkilenebildiğini desteklemektedir. YÜT kullanılmasına neden olan erişkin jinekolojik ve androlojik hastalıkların fetal gelişim dönemlerindeki problemlerden kaynaklanabileceğini işaret eden veriler ortaya çıkmaktadır (91, 92). Özellikle fetal stres yaratan durumların erişkin bireylerde bozulmuş ovaryan fonksiyonlar, seks matürasyon problemleri, sperm anomalileri ve endometriyal fonksiyon değişiklikleri ile ilgili olabileceği bildirilmektedir (93). YÜT uygulamalarının neden olduğu hormonal dengesizlikler, fetal gelişme geriliği veya erken doğum gibi problemlerin de erişkinlikteki reproduktif patolojilerle bağlantılı olabilir. Dolayısıyla infertilite ilişkili genetik değişiklikler, hastaların YÜT uygulamaları ile doğan çocuklarında da çeşitli patolojik değişikliklerin temelinde rol oynuyor olabilir. Buna bağlı olarak çalışmamızda hedef olarak belirlenen miRNA genlerinin seçiminde blastosist gelişiminde rol almak yanında infertilite etiyojisi ile de ilişkisi bildirilen miRNA molekülleri göz önünde bulundurulmuştur. Normal blastosistlerde ifade gösterdiği belirlenmiş miRNA genlerinin, infertil bireylerden elde edilen blastosistlerdeki ifade durumlarını inceleyen az sayıda çalışma mevcuttur. PCOS ve erkek faktörü nedenli infertil bireyler için gerçekleştirilen blastosistlerde çeşitli miRNA genlerinde ifade değişiklikleri saptanmıştır: bu miRNA'lar arasında miR-21 gen ifadesinin değişmediği ancak miR-92 ifadesinin azaldığı belirlenmiştir (94). YÜT uygulamasına yeterli yanıt vermeyen olguların over follikül hücrelerinde miR-21 ifadesinin değiştiğini ve miR-21'in aynı zamanda sperm matürasyonunda da etkili olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (95-97). MiR-17 ve miR-92a genlerinin ise germ hücrelerinin gelişimi yanında embriyogenez ve plasenta fonksiyonlarıyla ilişkili oldukları bildirilmiştir (98, 99). Benzer şekilde miR-141

geninin plasenta fonksiyonları ve sperm gelişimi üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir (100, 101). Ayrıca, erken over yetmezliği gelişen bireylerde serumda miR-23a ifadesinin azaldığı saptanmıştır (102).

miRNA genlerinin organizmanın gelişiminde çeşitli aşamalarda düzenleyici olarak rol aldıkları bilinmektedir. Bazı miRNA genlerinin ise birden fazla gelişim aşamasında çeşitli fonksiyonlara sahip oldukları ortaya çıkmıştır. Çalışmamızda hedef olarak seçilen miRNA molekülleri; infertilite, blastosist gelişimi veya embriyogenez aşamalarında rol aldığı bildirilmiş ve YÜT kullanımına bağlı gen ifadesi değişimlerinden de etkilenebilecek genler arasından belirlenmeye çalışılmıştır. Böylece YÜT kullanılarak gelişen gebeliklerden doğan çocuklarda miRNA ifadesi açısından bir farklılık olup olmadığının araştırılması planlanmıştır. Çalışma sonucunda ifade farklılığı saptanan miRNA moleküllerinin, rol aldıkları çeşitli gelişim aşamaları ve patolojiler ile ilişkilerine bağlı olarak infertilite etiyojisi, YÜT uygulamasından etkilenme veya fenotipik bulgular üzerine olası etkileri analiz edilecektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya, 1 Mart 2016 - 1 Nisan 2018 tarihleri arasında YÜT kullanılarak doğan term veya terme yakın preterm 21 yenidoğan ile kontrol grubu olarak YÜT kullanılmadan doğan sağlıklı term veya terme yakın preterm 18 yenidoğan alındı. Çalışmaya dahil edilen tüm bebekler pediatrik genetik uzmanı ile birlikte muayene edilip fizik muayene bulguları kaydedildi. Tüm bebeklerden miRNA eldesi için 2 cc venöz kan örneği EDTA'lı tüpe alındı.

Çalışmaya dahil edilen tüm bebeklerin ailelerinden yazılı aydınlatılmış onam formu alındı (Ek-1). Çalışma Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı (Karar Tarihi: 26.02.2016, Karar Sayısı: 70904504/123) (Ek-2).

Kan örneklerinden en geç iki saat içinde santrifügasyon ile plazma elde edildi. Plazma örnekleri -20°C'de miRNA izolasyonu basamağına kadar saklandı.

3.1. Plazma miRNA İzolasyonu

Olgulara ait plazma örneklerinden miRNA izolasyonu için miRCURY RNA Isolation Kit-Biofluids (Exicon, 300112) kullanıldı ve çalışma basamakları önerildiği şekilde uygulandı:

- 1- 200 µl plazma örneği üzerine 60 µl Lysis solution BF eklendi, karıştırıldı ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi.
- 2- Karışım üzerine 20 µl Protein Precipitation Solution BF eklendi, hızla karıştırıldı, oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi ve 11.000 g'de 3 dk santrifüj edildi.
- 3- Süpernatant yeni bir tüpe alınıp üzerine eşit hacimde isopropanol eklendi, karıştırıldı ve RNA izolasyon kolonuna yüklenip 11.000 g'de 30 sn santrifüj edildi.
- 4- Wash Solution 1 BF ve 2 BF ile iki defa kolon yıkaması yapıldı.
- 5- Kolonlardan 50 µl RNase free H₂O ile RNA elüsyonu yapıldı ve elde edilen RNA -80°C'de saklandı.

3.2. cDNA Hazırlanması

Plazma miRNA örneklerinden cDNA sentezi için miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR- Universal cDNA Synthesis Kit II (Exicon, 203301) kullanıldı.

Reaksiyon karışımı kit manuelinde belirtildiği üzere aşağıdaki gibi hazırlandı:

5x Reaction Buffer	2 µl
Reverse Transcriptase	1 µl
RNA	7 µl
TOPLAM	10 µl

cDNA sentezi için aşağıdaki sıcaklık programı kullanıldı:

42°C	60 dk
95°C	5 dk
4°C	∞

Hazırlanan cDNA örnekleri -20°C'de saklandı.

3.3. Kantitatif PCR

Plazma miRNA örneklerinden hazırlanan cDNA kalıbı kullanılarak hedef miRNA moleküllerinin kantitasyonu için gerçek zamanlı kantitatif PCR çalışması yapıldı. Hedef miRNA moleküllerine özgü primer ve problemler için Primer Assay (Exicon) kullanıldı.

miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR- ExiLENT SYBR Green master mix (Exicon, 203403) kullanılarak her bir hedef miRNA molekülü için ayrı PCR karışımı kit manuelinde belirtildiği üzere aşağıdaki gibi hazırlandı:

2x SYBR Green Taq Polimeraz mix	5 µl	Hedef
miRNA Primer Mix	1 µl	cDNA kalıp (1/30 dil)
µl TOPLAM	10 µl	

Hazırlanan PCR karışımı aşağıdaki sıcaklık profili kullanmak üzere kantitatif gerçek zamanlı PCR cihazına (Light Cycler 480, Roche) yüklendi.

95°C	15 dk
45 döngü;	
94°C	10 sn
60°C	60 sn + floresans ölçüm

PCR işlemi sonrası örnekler için döngü eşik değerlerinin (Cycle Treshold, CT) analizi için Light Cycler 480 II programında Second Derivative Maximum metodu kullanıldı.

3.4. miRNA İfadesi Değerlerinin Analizi

miRNA ifadesi analizinde referans miRNA olarak mir-16-5p kullanıldı. Hedef miR 17-5p, miR 21-5p, miR 23a-3p, miR 92a-3p, miR 141-3p, miR 145-5p, miR 191-5p, miR 483-3p moleküllerinin kantitatif PCR ile belirlenen CT değerleri REST[®] (Pfaffl MW ve ark. Nuc Acid Res, 2002; 30(9): E36) programı kullanılarak normalize edildi ve her bir miRNA'nın ifade değeri hesaplandı.

3.5. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için T-testi, Ki-kare testi ve Mann-Whitney U Testi kullanılmıştır.

Dağılım grafikleri için GraphPad Prism programı kullanılmıştır. Analizler SPSS (version 23.0) (SPSS Inc. Chicago USA) programı ile yapılmıştır P<0,05 olması istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

YÜT ile doğum yapan annelerin verileri istatistiğe alındı. Ailelerin infertilite nedenleri 4 ana başlık altında incelendi:

- 1) Kadın Faktör
- 2) Erkek Faktör
- 3) Açıklanamayan Nedenler
- 4) Kadın ve Erkek Faktör

İnfertilite nedenlerine göre dağılım incelendiğinde kadın faktör 11 hastada (%55), erkek faktör 1 hastada (%5), her iki faktöre bağlı infertilite 2 hastada (%10), açıklanamayan nedenlere bağlı infertilite ise 6 hastada (%30) şeklinde bulundu (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. YÜT kullanılan ailelerin infertilite nedenlerinin dağılımı.

İnfertilite Nedeni	Hasta Sayısı (n)	Yüzde (%)
Kadın Faktör	11	55
Erkek Faktör	2	10
Açıklanamayan	5	25
Kadın+Erkek Faktör	2	10

İnfertilite nedenlerinden kadın faktör alt başlıklarla incelendi: Düşük rezerv, anovulasyon, tubal faktör.

Kadın faktöre bağlı nedenler incelendiğinde 5 hastada düşük rezerv (%38,5), 4 hastada anovulasyon (30,8), 3 hastada tubal faktör (23,1), 1 hastada ise düşük rezerv + tubal faktör (%7,7) olduğu görüldü (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Kadın faktör nedeniyle infertil olan hastaların alt başlık dağılımı.

Kadın Faktör	Hasta Sayısı (n)	Yüzde (%)
Düşük Rezerv	5	38,5
Anovulasyon	4	30,8
Tubal Faktör	3	23,1
Düşük Rezerv+ Tubal Faktör	1	7,7

Çalışmamızda 2 ana YÜT tipi ile doğan bebekleri inceledik. Bunlar IVF ve ICSI'dir.

20 annenin 14'ünde ICSI (%70), 6'sında IVF (%30) kullanılmıştır.

YÜT yapılırken kullanılan embriyoların taze veya donmuş olmasına göre ve transfer edilen embriyo sayısına göre dağılım Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. YÜT'te kullanılan embriyo sayısı ve özelliği.

Embriyo Çeşidi	Hasta Sayısı (n)	Yüzde (%)	Embriyo Sayısı	Hasta Sayısı (n)	Yüzde (%)
Taze	14	70	1	17	85
Donmuş	6	30	2	3	15

Çalışmamıza 39 tane bebek alındı. Bunların 21 tanesi YÜT ile doğan bebek 18 tanesi kontrol grubu olarak alınan sağlıklı bebeklerdir.

YÜT ile doğanların ortalama doğum haftası 37,14 ($\pm 1,31$) hafta, kontrol grubunda ise 36,50 ($\pm 2,81$) hafta bulundu. YÜT kullanılarak doğan bebekler ile kontrol grubunun <38 hafta doğum oranları kıyaslandığında anlamlı fark bulunmadı ($p=0,882$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. YÜT kullanılarak doğanlar ile kontrol grubunun term doğum oranlarının karşılaştırılması.

		Hasta Sayısı (n)		Toplam	
		YÜT	Kontrol		
Doğum Haftası	< 38 hafta	Sayı (n)	10	9	19
		Yüzde (%)	47,6%	50%	48,7%
	≥ 38 hafta	Sayı (n)	11	9	20
		Yüzde (%)	52,4%	50%	51,3 %
Toplam Hasta Sayısı	Sayı (n)	21	18	39	
	Yüzde (%)	100%	100%	100%	

Anne yaşları kıyaslandığında YÜT ile doğan grupta ortalama anne yaşı 32,5 ($\pm 5,15$) iken, kontrol grubunda 27,55 ($\pm 5,19$) olarak bulundu. YÜT kullanılarak doğan bebekler ile kontrol grubunun anne yaşı 30 yaşa göre kıyaslandığında aralarında anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,007$) (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. YÜT kullanılarak doğanlar ile kontrol grubunun anne yaşlarının 30 yaşa göre karşılaştırılması.

		Hasta Sayısı (n)		Toplam	
		YÜT	Kontrol		
Anne Yaşı	< 30 yaş	Sayı (n)	5	12	17
		Yüzde (%)	23,8%	66,7%	43,6%
	\geq 30 yaş	Sayı (n)	16	6	22
		Yüzde (%)	76,2%	33,3%	56,4%
Toplam Hasta Sayısı	Sayı (n)		21	18	39
	Yüzde (%)		100%	100%	100%

Cinsiyet dağılımına bakıldığında YÜT ile doğan grupta kız cinsiyet 10 (%47,6), erkek cinsiyet 11 (%52,4) tanedir. Kontrol grubunda ise kız cinsiyet 8 (%44,4), erkek cinsiyet 10 (%55,6) tanedir. Cinsiyet dağılımı açısından kıyaslandığında her iki grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,843$) (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. YÜT kullanılarak doğanlar ile kontrol grubunun cinsiyet dağılımı.

		Hasta Sayısı (n)		Toplam	
		YÜT	Kontrol		
Cinsiyet	Kız	Sayı (n)	10	8	18
		Yüzde (%)	47,6%	44,4%	46,2%
	Erkek	Sayı (n)	11	10	21
		Yüzde (%)	52,4%	55,6%	53,8%
Toplam Hasta Sayısı	Sayı (n)		21	18	39
	Yüzde (%)		100%	100%	100%

YÜT ile doğan grupta 3 bebek (%15) ikiz eşi olarak, 17 bebek (%85) tekli doğum sonucu dünyaya gelmiştir. Kontrol grubunda ise hiç çoklu doğum yoktur, her iki grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,231$) (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. YÜT kullanılarak doğanlar ile kontrol grubunun çoklu doğum oranlarının karşılaştırılması.

			Hasta Sayısı (n)		Toplam
			YÜT	Kontrol	
Tek / İkiz Doğum	Tek	Sayı (n)	18	18	36
		Yüzde (%)	85,7%	100%	32,3%
	İkiz	Sayı (n)	3	0	3
		Yüzde (%)	14,3%	0%	7,7%
Toplam Hasta Sayısı	Sayı (n)		21	18	39
	Yüzde (%)		100%	100%	100%

YÜT ile doğanların ortalama doğum kilosu 2975,71 ($\pm 398,88$) gram, kontrol grubunda ise 3216,0 ($\pm 507,11$) gram olarak bulundu. Her iki grubun doğum ağırlıkları 2750 grama göre kıyaslandığında aralarında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,907$) (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. YÜT kullanılarak doğanlar ile kontrol grubunun ağırlıklarının 2750 grama göre karşılaştırılması.

			Hasta Sayısı (n)		Toplam
			YÜT	Kontrol	
Doğum Ağırlığı	<2750	Sayı (n)	5	4	9
		Yüzde (%)	23,8%	22,2%	23,1%
	≥ 2750	Sayı (n)	16	14	30
		Yüzde (%)	76,2%	77,8%	76,9%
Toplam Hasta Sayısı	Sayı (n)		21	18	39
	Yüzde (%)		100%	100%	100%

YÜT kullanılarak doğan bebekler ile kontrol grubu anomali varlığı açısından kıyaslandığında YÜT grubunda bu oran yüksek ve anlamlı bulunmuştur ($p=0,004$) (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. YÜT kullanılarak doğanlar ile kontrol grubunun anomali varlığı açısından karşılaştırılması.

			Hasta Sayısı (n)		Toplam
			YÜT	Kontrol	
Anomali Varlığı	Var	Sayı (n)	8	0	8
		Yüzde (%)	38,1%	0%	20,5%
	Yok	Sayı (n)	13	18	31
		Yüzde (%)	61,9%	100%	79,5%
Toplam Hasta Sayısı	Sayı (n)		21	18	39
	Yüzde (%)		100%	100%	100%

Anomali saptanan 8 hastanın 2 tanesinde (%25) majör anomali, 6 tanesinde (%75) minör anomali saptanmıştır. Bu 2 major anomali multikistik displastik böbrek ve skafosefali şeklindeydi. YÜT alt tiplerine göre bakınca bu 2 major anomali de IVF grubundan çıkmıştır (Tablo 4.11).

YÜT alt tiplerine göre anomali kıyaslandığında ICSI'da oran %66,7 iken IVF'te %33,3 şeklinde bulundu, aralarında anlamlı fark bulunamamıştır ($p=1,00$) (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. YÜT tiplerine göre anomali dağılımı.

			Anomali		Toplam
			Yok	Var	
YÜT Tipi	IVF	Sayı (n)	4	3	7
		Yüzde (%)	30,8%	37,5%	33,3%
	ICSI	Sayı (n)	9	5	14
		Yüzde (%)	69,2%	62,5%	66,7%
Toplam Hasta Sayısı	Sayı (n)		13	8	21
	Yüzde (%)		100%	100%	100%

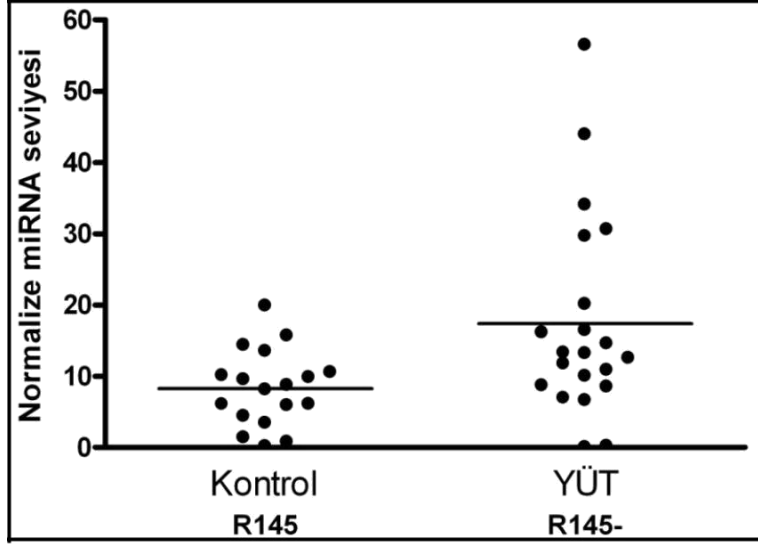
Tablo 4.11. YÜT alt tiplerine göre anomali tiplerinin dağılımı.

			Anomali Tipi		Toplam
			Major	Minör	
YÜT Tipi	IVF	Sayı (n)	2	1	3
		Yüzde (%)	100%	16,7%	37,5%
	ICSI	Sayı (n)	0	5	5
		Yüzde (%)	0%	83,3%	62,5%
Toplam Hasta Sayısı	Sayı (n)	2	6	8	
	Yüzde (%)	100%	100%	100%	

YÜT kullanılarak ve kullanılmadan doğan bebeklerin hedef miRNA değerleri kıyaslandığında Mir145-5p'de anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0,015) (Tablo 4.12).

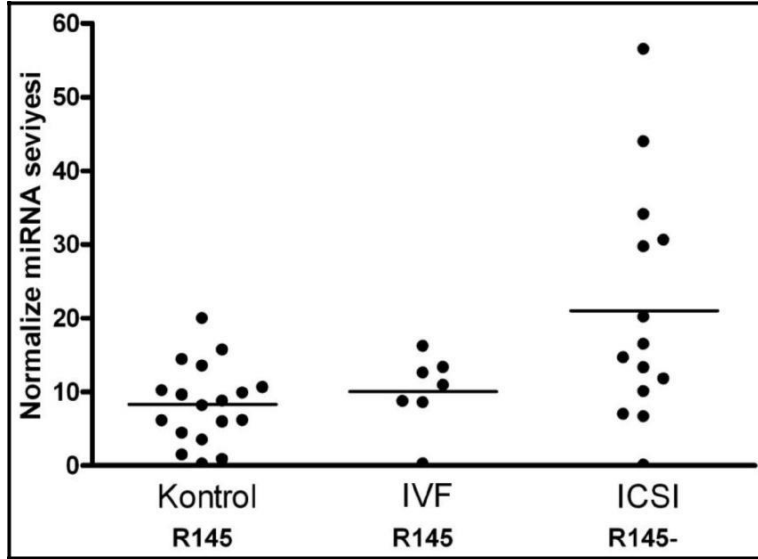
Tablo 4.12. YÜT kullanılarak ve kullanılmadan doğan bebeklerin hedef miRNA profilinin kıyaslaması.

		YÜT/Kontrol				
		Hasta Sayısı	Ortalama	SD	MWU	P
miR 16-5p	YÜT	21	0,87	0,48	180,00	0,800
	Kontrol	18	0,80	0,40		
miR 17-5p	YÜT	21	0,66	0,58	151,00	0,284
	Kontrol	18	0,46	0,32		
miR 21-5p	YÜT	21	1,45	0,89	188,00	0,978
	Kontrol	18	2,49	4,62		
miR 23a-3p	YÜT	21	2,61	1,85	179,00	0,778
	Kontrol	18	2,25	0,91		
miR 92a-3p	YÜT	21	0,49	0,46	185,00	0,910
	Kontrol	18	0,42	0,25		
miR 141-3p	YÜT	21	4,72	6,55	180,00	0,800
	Kontrol	18	3,58	3,56		
miR 145-5p	YÜT	21	17,38	14,17	103,00	0,015
	Kontrol	18	8,27	5,36		
miR 191-5p	YÜT	21	0,80	0,76	181,00	0,833
	Kontrol	18	0,67	0,47		
miR 483-3p	YÜT	21	1,17	2,41	120,00	0,059
	Kontrol	18	0,52	0,96		



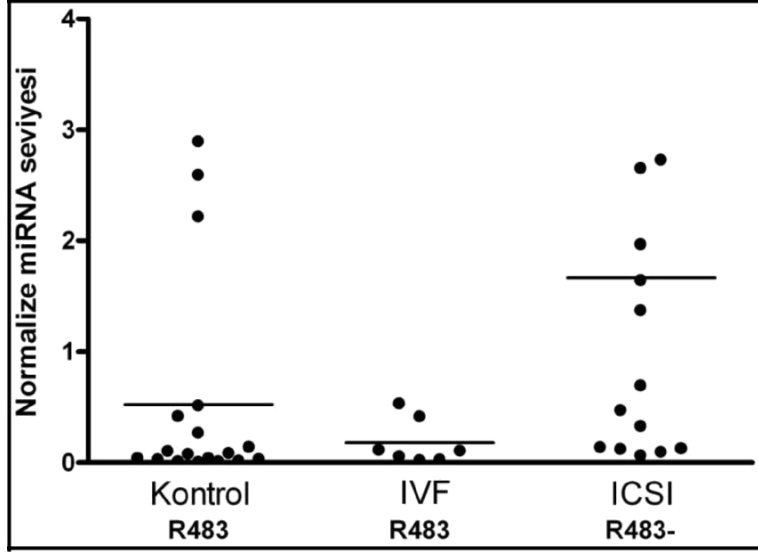
Şekil 4.1. YÜT kullanılarak ve kullanılmadan doğan bebeklerin miR-145 değerlerinin dağılımı.

YÜT kullanılarak doğan bebeklerin miR-145 dağılımı YÜT alt tiplerine göre incelendiğinde ICSI kullanılan bebeklerde miR-145 artışının IVF kullanılan bebeklere göre daha fazla olduğu görülmüştür ($p < 0,05$) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. IVF ve ICSI kullanılarak doğan bebeklerle kontrol grubunun miR-145 dağılımı.

YÜT kullanılarak doğan bebeklerin diğer hedef miRNA dağılımı YÜT alt tiplerine göre incelendiğinde ICSI kullanılan bebeklerde miR-483 artışının da IVF kullanılan bebeklere göre daha fazla olduğu görülmüştür ($p < 0,05$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. IVF ve ICSI kullanılarak doğan bebeklerle kontrol grubunun miR-483 dağılımı.

YÜT kullanılarak ve kullanılmadan doğan bebeklerin hedef miRNA değerleri anomali varlığı açısından kıyaslanınca hedef miRNA değerlerinde anlamlı farklılık saptanmamıştır (Tablo 4.13.).

Tablo 4.13. YÜT kullanılarak ve kullanılmadan doğan bebeklerin hedef miRNA profili ile anomali varlığının kıyaslanması.

		Anomali Varlığı				
		Hasta sayısı	Ortalama	SD	MWU	P
miR 16-5p	Yok	31	0,85	0,43	105,00	0,509
	Var	8	0,78	0,53		
miR 17-5p	Yok	31	0,54	0,43	111,00	0,651
	Var	8	0,69	0,69		
miR 21-5p	Yok	31	2,01	3,56	103,00	0,465
	Var	8	1,61	0,98		
miR 23a-3p	Yok	31	2,26	0,98	114,00	0,728
	Var	8	3,15	2,76		
miR 92a-3p	Yok	31	0,49	0,40	100,00	0,404
	Var	8	0,36	0,29		
miR 141-3p	Yok	31	4,45	5,67	119,00	0,862
	Var	8	3,21	4,00		
miR 145-5p	Yok	31	11,53	9,94	79,00	0,118
	Var	8	19,54	16,62		
miR 191-5p	Yok	31	0,70	0,51	122,50	0,958
	Var	8	0,91	1,04		
miR 483-3p	Yok	31	0,55	0,89	85,00	0,175
	Var	8	2,12	3,71		

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

YÜT kullanılarak doğan çocuklarda konjenital malformasyon oranının artması olasılığı konusunda her zaman endişe vardır. IVF'te sperm ve yumurtalar normal ortamlarından uzaklaştırılır ve değişen hormonlara, işleme ve kültür ortamlarına maruz kalmaktadır. Intrazitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) gibi yeni teknikler daha da invaziv olup potansiyel olarak gelişmekte olan embriyoyu daha büyük bir malformasyon riski altında bırakmaktadır (44). Biz de çalışmamızda YÜT olarak en sık kullanılan 2 tekniği aldık: IVF ve ICSI. Bu iki teknik arasında konjenital anomali geliştirme sıklığı açısından anlamlı farklılık bulamadık. Literatürdeki genel olarak görüş birliği, hem geleneksel IVF'in hem de ICSI'nin konjenital anomali açısından -ICSI'de artan cinsiyet kromozom anormallikleri ve hipospadias haricinde- aynı artmış riski göstermesidir.

2016'da yapılan bir çalışmada YÜT ile doğan 2414 bebek alınmış ve 90'ında (%3.8) major konjenital anomaliler, 11'inde ise (%0,5) minör konjenital anomaliler saptanmış. Bunların arasında en sık görülen majör konjenital anomaliler ise kardiyovasküler (25, %1,1), genitoüriner (21, %0.9) ve gastrointestinal (9, %0.4) sistemleri tutan anomaliler şeklinde raporlanmış (71). Bizim çalışmamızda ise 21 YÜT ile doğan bebeğin 8 tanesinde konjenital anomali saptadık (%38,1). Kontrol grubu ile anomali varlığı açısından kıyaslayınca aralarında anlamlı fark olduğunu gördük ($p<0,05$). Konjenital anomalilerin 2 tanesi (%25) major anomali, 6 tanesi (%75) minör anomaliydi. Major anomalilerin biri santral sinir sistemi anomalisi (skafosefali) diğeri ise üriner sistem anomalisi (multikistik displastik böbrek) şeklindeydi. Literatürde YÜT ile sıkça ilişkilendirilen imprinted bozukluklara çalışmamızda hiç rastlanmamıştır ki bunun hasta sayımızın az olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

En iyi kanıtlanmış YÜT risklerinden biri çoklu doğumdur. Günümüzde tek embriyo transferi ile bu risk düşmüştür. Çalışmamızda da YÜT'lü grupta %14,3 oranında ikiz doğum raporladık. Spontan olan ikizlerde ve YÜT ikizlerinde anormallikler, tekil kontrollere göre artmış olmakla birlikte, şimdiye kadar YÜT'de ilave risk şaşırtıcı bir şekilde kanıtlanmamıştır (74). Çalışmamızda ise 3

tane ikiz eşi olan bebeğin 1 tanesinde minör konjenital anomali raporladık ki literatürle uyumlu olarak tekil kontrollere göre anlamlı fark saptamadık.

Sistemantik bir derlemede YÜT ile olan tekiz doğumlarda preterm doğum (<32 hafta) açısından relatif risk 3.27 bulunmuştur (46). İngiltere ve Avusturalya’da yapılan geniş çaplı çalışmalarda YÜT ile doğan bebeklerde düşük doğum ağırlıklı doğum ve prematürite riskinin artmış olduğu gösterilmiştir (45-48). Çalışmamızda YÜT kullanılarak ve kullanılmadan doğan bebeklerin doğum haftalarını 38 haftaya göre, doğum kilolarını da 2750 grama göre kıyasladığımızda aralarında anlamlı farklılık saptamadık. Burada fark saptamamızın temel nedeninin çalışmaya terme yakın preterm veya term bebekleri dahil etmemizden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Prematüritenin de miRNA profili değiştirecek bir faktör olduğunu ön görmemizden kaynaklı çalışmamıza prematür bebekler dahil edilmemiştir.

YÜT kullanılarak ve spontan gebe kalan annelerin yaşlarını kıyasladığımızda öngördüğümüz şekilde YÜT’lü grubun anne yaşını daha ileri bulduk ($p<0,05$). YÜT kullanılarak gebe kalan kadınların yaşlarının daha fazla olması beklenen bir sonuçtur. Bunun nedenlerinden birisi de 35 yaş üzerinde olup infertilite konusunda yardım arayışı içinde olan kadınların sayısındaki artıştır. ABD’de her beş kadından biri ilk çocuğuna 35 yaşından sonra sahip olmaktadır ki bu daha öncesine göre önemli bir değişikliktir. Bilindiği üzere ileri anne yaşı konjenital anomali görülme sıklığını arttırmaktadır.

Çalışmamızda YÜT kullanılarak ve kullanılmadan doğan bebeklerin miRNA profilini incelediğimizde hedef miRNA’lardan miR-145’in YÜT grubunda anlamlı derecede artmış olduğunu saptadık ($p<0,05$).

YÜT grubunun miRNA profilini IVF ve ICSI diye ayırarak kıyasladığımızda ICSI grubunda miR-145 ve miR-483’ün anlamlı derecede artmış olduğunu saptadık ($p<0,05$). Bu sonuçlar ICSI’da IVF’e göre epigenetik etkilenmenin daha fazla olduğunu, YÜT’de kullanılan tekniğin sonuçlar üzerinde etkili olduğunu düşündürmektedir. Epigenetik etkilenmenin YÜT’ün hangi aşamasında meydana geldiği net bilinmemektedir, bu konuda ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

Birçok çalışma miRNA'ların fertilitte ve gelişim ile ilgisini göstermiştir. MiRNA'lar overlerde gen regülasyonunda anahtar rol oynar. Overlerde en yoğun bulunan miRNA profili: miR-21, miR-99a, miR-125b, miR-126, miR-143, miR-145, miR-199b şeklindedir. Fare embriyolarında yapılan çalışmalarda miR-21, miR-23a ve miR-145 genleri ifadesinin DNA metilasyon değişikliklerinden etkilendiği belirlenmiştir (90). PCOS infertilitenin en sık nedenlerinden biridir. PCOS'lu hastaların serumlarında miR-145'in nispeten yüksek olduğu bulunmuş olup hastalığın patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir (103). PCOS dışında MiR-145'in endometrial dokulardaki artışının endometriyozis ve infertilite ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (104). İnsan adipöz türevli kök hücrenin düz kaslara farklılaşmasının altında yatan moleküler mekanizmaları anlamak, mesane duvarı ve üretral defektler gibi ilgili kas defektleri için etkili tedavilerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir. Bununla ilgili yapılan bir çalışmada adipöz kök hücrelerin düz kaslara farklılaşması sırasında miR-145'in önemli ölçüde arttığı görülmüştür (105).

Çin'de yapılan bir çalışmada TGF- β depresyonu ile indüklenen ve disorganize damarlarla yakından ilişkili olan venöz malformasyonlardaki miR-145'in azaldığını ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda miR-145 venöz malformasyonların skleroterapisinde rol oynayabileceği ve hedef potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir (106).

Bilier atrezi fibro-obliterasyon ve ekstrahepatik biliyer sistemin obstrüksiyonu ile karakterize edilen ve uzun süre tedavi edilmezse, siroz ve hatta ölüme yol açan pediatrik bir karaciğer hastalığıdır. Çin'de yapılan bir çalışmada miR-145'in downregülasyonu, adducin-3'ü hedefleyerek biliyer atrezide karaciğer fibrozuna katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (107).

Değişmiş kondrogenez osteoartrit gelişiminde rol oynayan en yaygın patofizyolojik süreçtir. miR-145'in, osteoartritte kondrosit proliferasyonu ve fibrozisin düzenlenmesi üzerinde önemli etkileri olabilecek "tümör nekroz faktörü reseptör süper ailesi, üye 11b'nin ekspresyonunu düzenlemede kritik fonksiyonu olduğu Wang ve ark. tarafından gösterilmiştir (108).

Literatürde miR-145'in kolorektal kanser dahil olmak üzere çeşitli kanser tiplerinde düşük olduğu gösterilmiştir. MiR-145'in ektopik ekspresyonu, kolorektal kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve invazyon yeteneğini bastıracağı böylece kolorektal kanser malign transformasyonu sırasında bir tümör süpresörü olarak hareket edebileceğini gösterilmiştir (109).

Yine farklı bir çalışma gastrik karsinomda miR-145'in anti-onkojenik rolünü ortaya koyarak hastalığın tedavisinde miR-145'in kullanılabileceğini göstermiştir (110).

MiRNA'ların, vücut sıvılarında dolaşması meme kanseri hastalarının kişiselleştirilmiş yönetimi için yeni, kolay erişilebilir, uygun fiyatlı, invaziv olmayan araçlar olarak kullanılmasını öngörmektedir. Bertoli ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre miR-145'in de bu yeni tedavi yöntemleri arasında yer alacağı düşünülmektedir (111).

YÜT ile doğan yenidoğanlarda miR-483 ifadesi seviyelerini inceleyen bir çalışma henüz literatürde bulunmamaktadır. Bununla birlikte miR-483 ifadesinin preterm doğum yaşanan gebeliklerdeki plasenta dokusunda değiştiği bildirilmiştir (86).

Gastrik karsinomda miR-483 ile yapılan çalışmada miR-483'ün mide kanseri hastalarında sıklıkla azaldığı gösterilmiş. MiR-483'ün ekspresyon seviyeleri, tümör evresi, lenf nodu metastazı ve stromal invazyon ile negatif korelasyon gösterdiği raporlanmıştır. MiR-483'ün düşük ekspresyonunun, mide kanseri olan hastalarda zayıf genel sağkalım ile kuvvetle ilişkili olduğunu gösterilmiş. Bunlar sonucunda miR-483'ün mide kanseri için prognostik veya terapötik hedef olarak kullanılabileceği ortaya koyulmuştur (112).

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) mutasyonu olan tüm akciğer kanserleri, kaçınılmaz olarak EGFR tirozin kinaz inhibitörlerine karşı direnç geliştirir. Vakaların %30'unda kazanılan direncin altında yatan mekanizması bilinmemektedir. Tümör modellerinde, miR-483-3p'nin forse edilmiş ekspresyonu, gefitinib-dirençli akciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonu inhibe ederek ve apoptozu teşvik ederek gefitinibe karşı duyarlılığını arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca miR-483-3p epitelyal mezenkimal geçişi tersine çevirdiği ve

gefitinib dirençli akciğer kanseri hücrelerinin göçünü, invazyonunu ve metastazını inhibe ettiği görülmüş. Gefitinib dirençli akciğer kanseri hücrelerinde miR-483-3p'nin susturulması, kendi promoterinin hipermetilasyonuna bağlı bulunmuş. Bunlar sonucunda EGFR mutant küçük hücreli akciğer kanserinde edinilmiş EGFR tirozin kinaz inhibitörü direncinin üstesinden gelmek için kombinasyon terapisi için ümit verici bir hedef olarak miR-483-3p'in kullanılacağı düşünülmüştür (113).

İtalya'dan bir çalışma hepatoselüler karsinomda karaciğer rezeksiyonundan sonra rekürrens tahmini için doku miRNA'larının belirlenmesini amaçlamıştır. Çalışma sonucunda dokudaki miR-483-3p analizinin, rekürrens riskini tanımlamaya yardımcı olabileceği, tedavi algoritmasını belirleyebileceği görülmüştür (114).

Anti-onkogenik etkilerinin dışında ekzosomal miRNA'ların influenza virüsü enfeksiyonuna karşı antiviral ve inflamatuvar cevaba aracılık edebileceği de gösterilmiştir (114).

MiR-483-3p'nin, IGF-1 sinyal yolu yoluyla akut miyokard infarktüsünü düzenlediği, takiben fonksiyonel restorasyonu destekleyebileceğini ortaya koyulmuştur (115).

İsrail'de yapılan bir çalışmada 9,042 YÜT ile doğan bebek kanser gelişimi açısından takip edilmiş. Kontrol grubuyla kıyaslanınca retinoblastom ve böbrek tümörlerinde artmış risk görülmüş ancak bu risk istatistiksel anlamlı bulunmamış (116). Epigenetik mekanizmalar karsinogeneze katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bu nedenle YÜT prosedürlerinin neden olduğu gen ekspresyonunun modifikasyonu çocukluk çağı kanserlerinde rol oynayabilir. Dolayısıyla bu bebeklerin çocukluk çağı kanserleri açısından da takip edilmesinin gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda belirlediğimiz hedef miRNA'lar ile konjenital anomaliler arasında bağlantı bulamadık. Bunun için daha fazla hasta sayısı ve hedef miRNA ile yapılacak olan ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak; YÜT kullanılarak doğan çocuklar miR-145 ve miR-483 ile ilişkilendirilen hastalıklar açısından hayatları boyunca yakın takip edilmelidir. YÜT yeni bir teknolojidir. Bu yüzden YÜT ile doğan çocukların erişkin yaşamlarında ne gibi sağlık sorunlarıyla karşılaştığı henüz net olarak bilinmemektedir. Gelecekte miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanımı gerçekleşebilir. Günümüzde miRNA'ların hastalıklara özgü tanı ve tedavilerde kullanımı için ciddi çalışmalar birçok ilaç firması tarafından devam etmektedir. Literatürde birçok hastalık ile ilişkilendirilen ve klinik önemi gittikçe artan miRNA'lar daha önce yenidoğanlarda hiç incelenmemiştir. Çalışmamız bu özelliğiyle bir ilktir.

İnfertil çiftlerin YÜT ile gebe kalmadan önce miRNA profilleri bakılarak; gebeliğin gerçekleşmesi halinde bebekte olabilecek hastalıklar, konjenital anomaliler konusunda tanımlanan miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanılabilmesi gelecekte mümkün görünmektedir. Bunun için ebeveynlerin de miRNA profillerinin incelendiği ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. ÖZET

Yardımcı Üreme Teknikleri Kullanılarak Ve Kullanılmadan Doğan Bebeklerde MikroRNA Profillerinin Karşılaştırılması

Yardımcı Üreme Teknikleri insan infertilitesinde rutin bir tedavi haline gelmiş olmasına rağmen YÜT ile doğan yenidoğanlardaki perinatal, natal ve postnatal sorunların nedeni tam olarak açığa çıkarılamamıştır. YÜT ile doğan bebeklerde kardiyak, nörolojik, kas iskelet sistemi ürogenital sistem ile ilgili anomaliler YÜT kullanılmadan doğan bebeklere göre daha yüksektir. Yardımcı üreme tekniğinde, doğal gebeliğe göre oosit ve embriyo gelişimi dramatik olarak değişmektedir. Epigenetik bazı faktörler, oluşan germ hücreleri ve embriyonun gen ekspresyon düzenini kalıcı olarak değiştirmektedir. Epigenetik önemli bir faktör de miRNA'dır. MiRNA'lar küçük kodlanmayan ve gen ekspresyonunu düzenleyen RNA'lardır. Literatürde çok sayıda hastalıkla ilişkili miRNA değişiklikleri bildirilmiştir.

Çalışmanın amacı YÜT kullanılarak ve kullanılmadan doğan bebeklerin miRNA profilinin farklı olduğunu ve bu profilin konjenital anomali ile ilişkili olup olmadığını göstermektir.

Çalışmaya YÜT kullanılarak doğan 21 bebek ile YÜT kullanılmadan doğan 18 bebek alındı. Hastaların fizik muayene bulguları kaydedildi Hastalardan miRNA eldesi için venöz kan örneği alındı. Hedef miRNA'lar infertilite ilişkili miRNA'lar arasından belirlendi. Hedef miRNA'larımız: miR 17-5p, miR 21-5p, miR 23a-3p, miR 92a-3p, miR 141-3p, miR 145-5p, miR 191-5p, miR 483-3p. Referans olarak miR 16-5p kullanıldı.

YÜT kullanılarak doğan bebeklerde miR-145'i anlamlı derecede artmış saptadık ($p<0,05$). YÜT grubunu kendi içinde kıyasladığımızda ise ICSI kullanılarak doğanlarda miR-145 ve miR-483'ü anlamlı derecede artmış saptadık ($p<0,05$).

YÜT kullanılarak doğan bebekler ile kontrol grubu anomali varlığı açısından kıyaslandığında YÜT grubunda bu oran yüksek ve anlamlı bulduk

($p < 0,05$). Konjenital anomali varlığı ile hedef miRNA profili arasında bağlantı bulamadık.

Sonuç olarak, YÜT kullanılarak doğan çocuklar miR-145 ve miR-483 ile ilişkilendirilen hastalıklar açısından hayatları boyunca yakın takip edilmelidir. MiRNA'ların biyobelirteç olarak kullanılabilmesi gelecekte mümkün görünmektedir. Bunun için ebeveynlerin de miRNA profillerinin incelendiği ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Yardımcı üreme teknikleri, miRNA, yenidoğan, konjenital anomali, miR-145-5p, miR 483-3p

7. ABSTRACT

Comparison of MicroRNA Profiles in Infants Born with and without Assisted Reproductive Techniques

Although assisted reproductive techniques have become a routine treatment in human infertility, the cause of perinatal, natal and postnatal problems in newborns born with ART has not been fully explained. In infants born with ART, cardiac, neurological, musculoskeletal system anomalies related to the urogenital system are higher than infants born without ART. In assisted reproductive technology, oocyte and embryo development varies dramatically according to natural pregnancy. Some epigenetic factors permanently alter the germ cells and the embryo's gene expression regulatory system. An important factor in epigenetics is miRNA. MiRNAs are RNAs that are not small encoded and regulate gene expression. Numerous disease-related miRNA changes have been reported in the literature.

The aim of the study is to show that the miRNA profile of infants born with or without ART is different and whether this profile is related to the congenital anomaly.

21 babies born using ART and 18 babies born without ART were included in the study. The physical examination findings of the patients were recorded. Venous blood samples were taken from the patients for the miRNA end. Target miRNAs were identified among infertile-associated miRNAs. Our target miRNAs: miR 17-5p, miR 21-5p, miR 23a-3p, miR 92a-3p, miR 141-3p, miR 145-5p, miR 191-5p, miR 483-3p. As a reference miR 16-5p was used.

In infants born using ART, we found that miR-145 increased significantly ($p < 0.05$). When we compared the ART group in themselves, we found that miR-145 and miR-483 increased significantly at birth using ICSI ($p < 0.05$).

When compared with infants born using ART in terms of anomaly of the control group, we found that this rate was high and significant in the ART group ($p < 0,05$). We could not find a link between the presence of congenital anomaly and the target miRNA profile.

As a result, children born using ART should be closely monitored throughout their lives for the diseases associated with miR-145 and miR-483. It is possible in the future that miRNAs can be used as biomarkers. For this, there is a need for further work by parents to examine miRNA profiles.

Key words: Assisted reproductive techniques, miRNA, newborn, congenital anomaly, miR-145-5p, miR 483-3p

8. KAYNAKLAR

1. Hussain M. Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action. *Cell Tissue Res* 2012; 349(2): 405-13.
2. Nakasa T, Nagata Y, Yamasaki K, Ochi M. A mini-review: microRNA in arthritis. *Physiological Genomics* 2011; 43(10): 566-70.
3. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal* 2002; 21(17): 4663-70.
4. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993; 75(5): 855-62.
5. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403(6772): 901-6.
6. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136(2): 215-33.
7. Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics* 2009; 10(2): 94-108.
8. Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes & Development* 2002; 16(6): 720-8.
9. Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet* 2006; 22(3): 165-73.
10. He S, Zeng S, Zhou Z-W, He Z-X, Zhou S-F. Hsa-microRNA-181a is a regulator of a number of cancer genes and a biomarker for endometrial carcinoma in patients: a bioinformatic and clinical study and the therapeutic implication. *Drug Design, Development and Therapy* 2015; 9: 1103-75.

11. Shivdasani RA. MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood* 2006; 108(12): 3646-53.
12. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803(11): 1231-43.
13. Olena AF, Patton JG. Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol* 2010; 222(3): 540-5.
14. Vickers MH. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. *Nutrients* 2014; 6(6): 2165-78.
15. Babenko O, Kovalchuk I, Metz GA. Stress-induced perinatal and transgenerational epigenetic programming of brain development and mental health. *Neurosci Biobehav Rev* 2015; 48: 70-91.
16. Krichevsky AM, King KS, Donahue CP, Khrapko K, Kosik KS. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA (New York, NY)* 2003; 9(10): 1274-81.
17. Schrott GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, et al. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 2006; 439(7074): 283-9.
18. Sun AX, Crabtree GR, Yoo AS. MicroRNAs: regulators of neuronal fate. *Current Opinion in Cell Biology* 2013; 25(2): 215-21.
19. Moreau MP, Bruse SE, Jornsten R, Liu Y, Brzustowicz LM. Chronological changes in microRNA expression in the developing human brain. *PloS one* 2013; 8(4): e60480.
20. Tsang J, Zhu J, van Oudenaarden A. MicroRNA-mediated feedback and feedforward loops are recurrent network motifs in mammals. *Molecular Cell* 2007; 26(5): 753-67.
21. Sinkkonen L, Hugenschmidt T, Berninger P, Gaidatzis D, Mohn F, Artus-Revel CG, et al. MicroRNAs control de novo DNA methylation through

- regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. *Nature Structural & Molecular Biology* 2008; 15(3): 259-67.
22. Yoo AS, Crabtree GR. ATP-dependent chromatin remodeling in neural development. *Current Opinion in Neurobiology* 2009; 19(2): 120-6.
 23. Yoo AS, Staahl BT, Chen L, Crabtree GR. MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development. *Nature* 2009; 460(7255): 642-6.
 24. Faye-Petersen OM. The placenta in preterm birth. *Journal of Clinical Pathology* 2008; 61(12): 1261-75.
 25. Huppertz B. Placental pathology in pregnancy complications. *Thrombosis Research* 2011; 127 Suppl 3: 96-9.
 26. Mouillet JF, Chu T, Sadovsky Y. Expression patterns of placental microRNAs. *Birth defects research Part A, Clinical and Molecular Teratology* 2011; 91(8): 737-43.
 27. Whitehead CL, Teh WT, Walker SP, Leung C, Larmour L, Tong S. Circulating MicroRNAs in maternal blood as potential biomarkers for fetal hypoxia in-utero. *PloS one* 2013; 8(11): 78487.
 28. Doridot L, Houry D, Gaillard H, Chelbi ST, Barbaux S, Vaiman D. miR-34a expression, epigenetic regulation, and function in human placental diseases. *Epigenetics* 2014; 9(1): 142-51.
 29. Leung AK, Sharp PA. MicroRNA functions in stress responses. *Molecular Cell* 2010; 40(2): 205-15.
 30. Schouten M, Aschrafi A, Bielefeld P, Doxakis E, Fitzsimons CP. microRNAs and the regulation of neuronal plasticity under stress conditions. *Neuroscience* 2013; 241: 188-205.
 31. Babenko O, Kovalchuk I, Metz GA. Epigenetic programming of neurodegenerative diseases by an adverse environment. *Brain Research* 2012; 1444: 96-111.

32. Zucchi FC, Yao Y, Metz GA. The secret language of destiny: stress imprinting and transgenerational origins of disease. *Frontiers in Genetics* 2012; 3: 96.
33. Zucchi FC, Yao Y, Ward ID, Ilnytsky Y, Olson DM, Benzie K, et al. Maternal stress induces epigenetic signatures of psychiatric and neurological diseases in the offspring. *PloS one* 2013; 8(2): 56967.
34. Miller BH, Wahlestedt C. MicroRNA dysregulation in psychiatric disease. *Brain Research* 2010; 1338: 89-99.
35. Jin XF, Wu N, Wang L, Li J. Circulating microRNAs: a novel class of potential biomarkers for diagnosing and prognosing central nervous system diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2013; 33(5): 601-13.
36. Imbar T, Eisenberg I. Regulatory role of microRNAs in ovarian function. *Fertility and Sterility* 2014; 101(6): 1524-30.
37. Frizzi A, Huang S. Tapping RNA silencing pathways for plant biotechnology. *Plant Biotechnology Journal* 2010; 8(6): 655-77.
38. Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, Spector Y, Rosenfeld N, Moskovits N, et al. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Molecular Cell* 2007; 26(5): 731-43.
39. Ohlsson Teague EM, Van der Hoek KH, Van der Hoek MB, Perry N, Wagaarachchi P, Robertson SA, et al. MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md)*. 2009; 23(2): 265-75.
40. Speroff L GN, Kase RG. *Clinical Gynaecologic Endocrinology and Infertility* 7nd edition 2007; 478: 80, 81, 82, 83.
41. Olson CK, Keppler-Noreuil KM, Romitti PA, Budelier WT, Ryan G, Sparks AE, et al. In vitro fertilization is associated with an increase in major birth defects. *Fertility and Sterility* 2005; 84(5): 1308-15.

42. El Hajj N, Haaf T. Epigenetic disturbances in in vitro cultured gametes and embryos: implications for human assisted reproduction. *Fertility and Sterility* 2013; 99(3): 632-41.
43. Fauque P. Ovulation induction and epigenetic anomalies. *Fertility and Sterility* 2013; 99(3): 616-23.
44. Sutcliffe A (Ed). *Congenital Anomalies - Case Studies and Mechanisms*. 2012; 122-32.
45. Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C, Webb S. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *The New England Journal of Medicine* 2002; 346(10): 725-30.
46. Helmerhorst FM, Perquin DA, Donker D, Keirse MJ. Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies. *BMJ (Clinical Research ed)*. 2004; 328(7434): 261.
47. Jackson RA, Gibson KA, Wu YW, Croughan MS. Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: a meta-analysis. *Obstetrics and Gynecology* 2004; 103(3): 551-63.
48. Schieve LA, Meikle SF, Ferre C, Peterson HB, Jeng G, Wilcox LS. Low and Very Low Birth Weight in Infants Conceived with Use of Assisted Reproductive Technology. *New England Journal of Medicine* 2002; 346(10): 731-7.
49. Al-Fifi S, Al-Binali A, Al-Shahrani M, Shafiq H, Bahar M, Almushait M, et al. Congenital anomalies and other perinatal outcomes in ICSI vs. naturally conceived pregnancies: a comparative study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2009; 26(7): 377-81.
50. Stark Z, Storen R, Bennetts B, Savarirayan R, Jamieson RV. Isolated hypogonadotropic hypogonadism with SOX2 mutation and anophthalmia/microphthalmia in offspring. *European Journal of Human Genetics* 2011; 19(7): 753-6.
51. Gallati S, Hess S, Galié-Wunder D, Berger-Menz E, Böhlen D. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations in azoospermic

- and oligospermic men and their partners. *Reproductive BioMedicine Online* 2009; 19(5): 685-94.
52. Foresta C, Ferlin A. Offspring conceived by intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* (London, England) 2001; 358(9289): 1270.
 53. Vicdan A, Vicdan K, Gunalp S, Kence A, Akarsu C, Zeki Işik A, et al. Genetic aspects of human male infertility: The frequency of chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in severe male factor infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 117(1): 49-54.
 54. Al-Attar MS. Evaluation of X-chromosome aneuploidy of azoospermic and severe oligospermic patients in Erbil city/ Iraqi Kurdistan Region, *Research Gate* 2017; 94-55.
 55. Spinner Nancy B, Saitta Sulagna C, Delaney Daniel P, Colliton R, Zderic Stephen A, Ruchelli E, et al. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with transmission of a ring(Y) chromosome and ovotesticular disorder of sex development in offspring. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2008; 146A(14): 1828-31.
 56. Quiroga R, Rosello M, Martinez F, Ferrer-Bolufer I, Monfort S, Oltra S, et al. Rare chromosomal complement of trisomy 21 in a boy conceived by IVF and cryopreservation. *Reprod Biomed Online* 2009; 19(3): 415-7.
 57. Bettio D, Venci A, Levi Setti PE. Chromosomal abnormalities in miscarriages after different assisted reproduction procedures. *Placenta* 2008; 29 Suppl B: 126-8.
 58. Meaney MJ. Epigenetics and the biological definition of gene x environment interactions. *Child Development* 2010; 81(1): 41-79.
 59. Essex MJ, Boyce WT, Hertzman C, Lam LL, Armstrong JM, Neumann SM, et al. Epigenetic vestiges of early developmental adversity: childhood stress exposure and DNA methylation in adolescence. *Child Development* 2013; 84(1): 58-75.
 60. Bahtiyar MO, Campbell K, Dulay AT, Kontic-Vucinic O, Weeks BP, Friedman AH, et al. Is the rate of congenital heart defects detected by fetal

echocardiography among pregnancies conceived by in vitro fertilization really increased?: a case-historical control study. *Journal of Ultrasound in medicine: Official Journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine* 2010; 29(6): 917-22.

61. Odom LN, Segars J. Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity* 2010; 17(6): 517-22.
62. Turan N, Katari S, Gerson LF, Chalian R, Foster MW, Gaughan JP, et al. Inter- and intra-individual variation in allele-specific DNA methylation and gene expression in children conceived using assisted reproductive technology. *PLoS Genetics* 2010; 6(7): e1001033.
63. Amor DJ, Halliday J. A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies. *Human Reproduction (Oxford, England)* 2008; 23(12): 2826-34.
64. Sato A, Otsu E, Negishi H, Utsunomiya T, Arima T. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Human Reproduction (Oxford, England)* 2007; 22(1): 26-35.
65. Halliday J, Oke K, Breheny S, Algar E, D JA. Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study. *American Journal of Human Genetics* 2004; 75(3): 526-8.
66. Maher ER, Brueton LA, Bowdin SC, Luharia A, Cooper W, Cole TR, et al. Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *Journal of Medical Genetics* 2003; 40(1): 62-4.
67. Lidegaard Ø, Pinborg A, Andersen AN. Imprinting diseases and IVF: Danish National IVF cohort study. *Human Reproduction* 2005; 20(4): 950-4.
68. Chopra M, Amor DJ, Sutton L, Algar E, Mowat D. Russell-Silver syndrome due to paternal H19/IGF2 hypomethylation in a patient conceived using intracytoplasmic sperm injection. *Reproductive BioMedicine Online* 2010; 20(6): 843-7.

69. Douzgou S, Mingarelli R, Tarani L, De Crescenzo A, Riccio A. Silver-Russell syndrome following in vitro fertilization. *Pediatric and developmental pathology: the Official Journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society* 2008; 11(4): 329-31.
70. Wen J, Jiang J, Ding C, Dai J, Liu Y, Xia Y, et al. Birth defects in children conceived by in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis. *Fertility and Sterility* 2012; 97(6): 1331-7. e1-4.
71. Levi Setti PE, Moioli M, Smeraldi A, Cesaratto E, Menduni F, Livio S, et al. Obstetric outcome and incidence of congenital anomalies in 2351 IVF/ICSI babies. *J Assist Reprod Genet* 2016; 33(6): 711-7.
72. Lancaster PA. Congenital malformations after in-vitro fertilisation. *Lancet (London, England)* 1987; 2(8572): 1392-3.
73. Ericson A, Källén B. Congenital malformations in infants born after IVF: a population-based study. *Human Reproduction* 2001; 16(3): 504-9.
74. Simpson JL. Birth defects and assisted reproductive technologies. *Semin Fetal Neonatal Med* 2014; 19(3): 177-82.
75. Halliday JL, Ukoumunne OC, Baker HW, Breheny S, Jaques AM, Garrett C, et al. Increased risk of blastogenesis birth defects, arising in the first 4 weeks of pregnancy, after assisted reproductive technologies. *Human Reproduction (Oxford, England)* 2010; 25(1): 59-65.
76. Lacamara C, Ortega C, Villa S, Pommer R, Schwarze JE. Are children born from singleton pregnancies conceived by ICSI at increased risk for congenital malformations when compared to children conceived naturally? A systematic review and meta-analysis. *JBRA Assist Reprod* 2017; 21(3): 251-9.
77. Tararbit K, Houyel L, Bonnet D, De Vigan C, Lelong N, Goffinet F, et al. Risk of congenital heart defects associated with assisted reproductive technologies: a population-based evaluation. *European Heart Journal* 2011; 32(4): 500-8.

78. Wen SW, Leader A, Rennicks White R, Léveillé M-C, Wilkie V, Zhou J, et al. A comprehensive assessment of outcomes in pregnancies conceived by in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010; 150(2): 160-5.
79. Hvidtjorn D, Grove J, Schendel D, Svaerke C, Schieve LA, Uldall P, et al. Multiplicity and early gestational age contribute to an increased risk of cerebral palsy from assisted conception: a population-based cohort study. *Human Reproduction (Oxford, England)* 2010; 25(8): 2115-23.
80. Zhu JL, Hvidtjørn D, Basso O, Obel C, Thorsen P, Uldall P, et al. Parental infertility and cerebral palsy in children. *Human Reproduction (Oxford, England)* 2010; 25(12): 3142-5.
81. Bay B, Mortensen EL, Kesmodel US. Assisted reproduction and child neurodevelopmental outcomes: a systematic review. *Fertility and Sterility* 2013; 100(3): 844-53.
82. Pinborg A, Wennerholm UB, Romundstad LB, Loft A, Aittomaki K, Soderstrom-Anttila V, et al. Why do singletons conceived after assisted reproduction technology have adverse perinatal outcome? Systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update* 2013; 19(2): 87-104.
83. Ma N, Wang X, Qiao Y, Li F, Hui Y, Zou C, et al. Coexpression of an intronic microRNA and its host gene reveals a potential role for miR-483-5p as an IGF2 partner. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2011; 333(1): 96-101.
84. Le F, Wang LY, Wang N, Li L, Li le J, Zheng YM, et al. In vitro fertilization alters growth and expression of Igf2/H19 and their epigenetic mechanisms in the liver and skeletal muscle of newborn and elder mice. *Biology of Reproduction* 2013; 88(3): 75.
85. Liu M, Roth A, Yu M, Morris R, Bersani F, Rivera MN, et al. The IGF2 intronic miR-483 selectively enhances transcription from IGF2 fetal

- promoters and enhances tumorigenesis. *Genes & Development* 2013; 27(23): 2543-8.
86. Mayor-Lynn K, Toloubeydokhti T, Cruz AC, Chegini N. Expression profile of microRNAs and mRNAs in human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia and preterm labor. *Reprod Sci* 2011; 18(1): 46-56.
 87. Shi L, Liu S, Zhao W, Shi J. miR-483-5p and miR-486-5p are down-regulated in cumulus cells of metaphase II oocytes from women with polycystic ovary syndrome. *Reprod Biomed Online* 2015; 31(4): 565-72.
 88. Rosenbluth EM, Shelton DN, Sparks AET, Devor E, Christenson L, Van Voorhis BJ. MicroRNA expression in the human blastocyst. *Fertility and Sterility* 2013; 99(3): 855-61. e3.
 89. McCallie BR, Parks JC, Strieby AL, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Human blastocysts exhibit unique microrna profiles in relation to maternal age and chromosome constitution. *J Assist Reprod Genet* 2014; 31(7): 913-9.
 90. Lee YM, Chen HW, Maurya PK, Su CM, Tzeng CR. MicroRNA regulation via DNA methylation during the morula to blastocyst transition in mice. *Molecular Human Reproduction* 2012; 18(4): 184-93.
 91. Diaz-Garcia C, Estella C, Perales-Puchalt A, Simon C. Reproductive medicine and inheritance of infertility by offspring: the role of fetal programming. *Fertility and Sterility* 2011; 96(3): 536-45.
 92. Stouder C, Deutsch S, Paoloni-Giacobino A. Superovulation in mice alters the methylation pattern of imprinted genes in the sperm of the offspring. *Reproductive Toxicology (Elmsford, NY)* 2009; 28(4): 536-41.
 93. Steel AJ, Sutcliffe A. Long-term health implications for children conceived by IVF/ICSI. *Human Fertility (Cambridge, England)* 2009; 12(1): 21-7.
 94. McCallie B, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Aberration of blastocyst microRNA expression is associated with human infertility. *Fertility and Sterility* 2010; 93(7): 2374-82.

95. Donadeu FX, Schauer SN, Sontakke SD. Involvement of miRNAs in ovarian follicular and luteal development. *The Journal of Endocrinology* 2012; 215(3): 323-34.
96. Karakaya C, Guzeloglu-Kayisli O, Uyar A, Kallen AN, Babayev E, Bozkurt N, et al. Poor ovarian response in women undergoing in vitro fertilization is associated with altered microRNA expression in cumulus cells. *Fertility and Sterility* 2015; 103(6): 1469-76. e1-3.
97. Niu Z, Goodyear SM, Rao S, Wu X, Tobias JW, Avarbock MR, et al. MicroRNA-21 regulates the self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108(31): 12740-5.
98. Jevnaker AM, Khuu C, Kjole E, Bryne M, Osmundsen H. Expression of members of the miRNA17-92 cluster during development and in carcinogenesis. *J Cell Physiol* 2011; 226(9): 2257-66.
99. Xu P, Zhao Y, Liu M, Wang Y, Wang H, Li YX, et al. Variations of microRNAs in human placentas and plasma from preeclamptic pregnancy. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 2014; 63(6): 1276-84.
100. Liu X, Gao R, Chen X, Zhang H, Zheng A, Yang D, et al. Possible roles of mmu-miR-141 in the endometrium of mice in early pregnancy following embryo implantation. *PloS One* 2013; 8(6): e67382.
101. Wu W, Qin Y, Li Z, Dong J, Dai J, Lu C, et al. Genome-wide microRNA expression profiling in idiopathic non-obstructive azoospermia: significant up-regulation of miR-141, miR-429 and miR-7-1-3p. *Human Reproduction (Oxford, England)* 2013; 28(7): 1827-36.
102. Dang Y, Zhao S, Qin Y, Han T, Li W, Chen ZJ. MicroRNA-22-3p is down-regulated in the plasma of Han Chinese patients with premature ovarian failure. *Fertility and Sterility* 2015; 103(3): 802-7. e1.
103. Naji M, Nekoonam S, Aleyasin A, Arefian E, Mahdian R, Azizi E, et al. Expression of miR-15a, miR-145, and miR-182 in granulosa-lutein cells,

- follicular fluid, and serum of women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Archives of Gynecology and Obstetrics* 2018; 297(1): 221-31.
104. Ruan Y, Qian WP, Zhang CH, Zhou L, Hou ZH. [Study on microRNA expression in endometrium of luteal phase and its relationship with infertility of endometriosis]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2013; 48(12): 907-10.
 105. Aji K, Zhang Y, Aimaiti A, Wang Y, Rexiati M, Azhati B, et al. MicroRNA-145 regulates the differentiation of human adipose-derived stem cells to smooth muscle cells via targeting Kruppel-like factor 4. *Molecular Medicine Reports* 2017; 15(6): 3787-95.
 106. Xia HF, Ren JG, Zhu JY, Yu ZL, Zhang W, Sun YF, et al. Downregulation of miR-145 in venous malformations: Its association with disorganized vessels and sclerotherapy. *European journal of pharmaceutical sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 2017; 100: 126-31.
 107. Ye Y, Li Z, Feng Q, Chen Z, Wu Z, Wang J, et al. Downregulation of microRNA-145 may contribute to liver fibrosis in biliary atresia by targeting ADD3. *PloS One* 2017; 12(9): e0180896.
 108. Wang GD, Zhao XW, Zhang YG, Kong Y, Niu SS, Ma LF, et al. Effects of miR-145 on the inhibition of chondrocyte proliferation and fibrosis by targeting TNFRSF11B in human osteoarthritis. *Molecular Medicine Reports* 2017; 15(1): 75-80.
 109. Li S, Wu X, Xu Y, Wu S, Li Z, Chen R, et al. miR-145 suppresses colorectal cancer cell migration and invasion by targeting an ETS-related gene. *Oncology Reports* 2016; 36(4): 1917-26.
 110. Xue M, Zhao L, Yang F, Li Z, Li G. MicroRNA145 inhibits the malignant phenotypes of gastric carcinoma cells via downregulation of fascin 1 expression. *Molecular Medicine Reports* 2016; 13(1): 1033-9.

111. Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics* 2015; 5(10): 1122-43.
112. Yu FY, Zhou CY, Liu YB, Wang B, Mao L, Li Y. miR-483 is down-regulated in gastric cancer and suppresses cell proliferation, invasion and protein O-GlcNAcylation by targeting OGT. *Neoplasma* 2018; 65(3): 406-14.
113. Yue J, Lv D, Wang C, Li L, Zhao Q, Chen H, et al. Epigenetic silencing of miR-483-3p promotes acquired gefitinib resistance and EMT in EGFR-mutant NSCLC by targeting integrin β 3. *Oncogene* 2018.
114. Vasuri F, Fittipaldi S, De Pace V, Gramantieri L, Bertuzzo V, Cescon M, et al. Tissue miRNA 483-3p expression predicts tumor recurrence after surgical resection in histologically advanced hepatocellular carcinomas. *Oncotarget* 2018; 9(25): 17895-905.
115. Sun H, Cai J, Xu L, Liu J, Chen M, Zheng M, et al. miR-483-3p regulates acute myocardial infarction by transcriptionally repressing insulin growth factor 1 expression. *Molecular Medicine Reports* 2018; 17(3): 4785-90.
116. Catford SR, McLachlan RI, O'Bryan MK, Halliday JL. Long-term follow-up of intra-cytoplasmic sperm injection-conceived offspring compared with in vitro fertilization-conceived offspring: a systematic review of health outcomes beyond the neonatal period. *Andrology* 2017; 5(4): 610-21.

9. EKLER

Ek 1. Aydınlatılmış Onam Formu.



AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Katılımcı / Gönüllünün Protokol Numarası:

1. Araştırmayla İlgili Bilgiler:

Araştırmanın Adı: Yardımcı Üreme Teknikleri kullanılarak ve kullanılmadan doğan bebeklerde MikroRNA profillerinin karşılaştırılması

Araştırmanın İçeriği: Tüp bebek ile doğan çocuklarda normal gebelikle doğan çocuklara göre daha fazla sıklıkta (yaklaşık 1,36 kat) konjenital anomaliye (doğuştan yapısal problemler) rastlanmaktadır. Bu sıklığın nedeni tam olarak bilinmemektedir. Özellikle epigenetik faktörlerin bu sıklıkla üzerinde en önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Epigenetik faktörlerden en önemlileri miRNA'lardır. Literatürde erkek ve kadın infertilitesi (kısırlık) ile ilgili çok sayıda tanımlanmış miRNA mevcuttur. Tüp bebek ile doğanlarda yapısal problemlerin neden kaynaklandığı net olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda yeterli fertilizasyonu olmayan (kısır bireylerde) bireylerde daha önce tanımlanmış miRNA profilleri ile tüp bebek ile doğan bebeklerdeki miRNA arasında bağlantı olup olmadığını sorgulanacaktır. Bu çalışmadan çıkacak sonuca göre miRNA'lar tüp bebek öncesi bireylerde anomali riskinin belirlenmesi ve takip edilmesinde biyobelirteç olarak kullanılma potansiyeli taşımaktadır.

- a. Araştırmanın Amacı: Hastalarda bakılacak olan infertilite ile ilgili miRNA'ların YÜT ile doğanlarda farklı ve anomali ile ilişkili bulunması halinde: infertil çiftlerin YÜT ile gebe kalmadan önce miRNA profilleri bakılarak gebeliğin gerçekleşmesi halinde anomali riski konusunda tanımlanan miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanılabilmesi sağlanabilecektir.
- b. Araştırmanın Nedeni:
- () Bilimsel araştırma
(x) Tez çalışması
- c. Araştırmanın Öngörülen Süresi: 1 YIL
- d. Araştırmaya Katılması Beklenen Katılımcı/Gönüllü Sayısı: 100
- e. Araştırmada İzlenecek Deneysel İşlemler:



Hastalardan *hedef miRNA* analizi için günün herhangi bir saatinde, hasta ve kontrol gruplarına mensup bireylerin 2 cc periferik venöz kan örneği EDTA'lı tüpe alınacaktır. Bunun dışında bir müdahale yapılmayacaktır.

2. Gönüllünün/Katılımcının Uygulama Sırasında Karşılaşabileceği Riskler ve Rahatsızlıklar:

Periferik kan örneği alınırken yeterli kanı alırken zorluk yaşanması, iğnenin girdiği yerde yerinde geçici ağrı, kızarıklık olması dışında beklenen ciddi bir etki yoktur.

Yukarıda açıklanan araştırma sırasında uygulanacak olan işlemlerin bana aşağıda belirtilen riskleri ve rahatsızlıkları getirebileceğinin bilincindeyim:

.....
.....
.....

3. Gönüllüler/Katılımcılar İçin Araştırmadan Beklenen Yarar:

Çalışmamızda infertilite ilişkili miRNA profilinin, YÜT ile gelişen gebelikten doğan bebekler ve spontan gebelikten doğan bebekler arasında farklılık olup olmadığının gösterilmesi amaçlandı. YÜT ile gelişen gebelikten doğan çocuklarda miRNA farklılığının bulunması durumunda bu hastalardaki anomali ile ilişkisi değerlendirilecektir. Çalışmamız ile önemli bir epigenetik faktör olan miRNA'nın bu anomali gelişme riskini belirlemede yerinin saptanması adına önemli bir bilimsel bilgi sağlayacaktır. Eğer spesifik miRNA ilişkisi gösterilir ise infertil bireylerin YÜT ile gebe kalmadan önce miRNA profillerine göre gebelikteki olası anomali riskleri verilmesi sağlanmış olacaktır. Bu riskin saptanması prenatal tanı ve takipte kolaylık ve ekonomik kazanç sağlayacaktır. Tanımlanan miRNA'lar YÜT öncesi bireylerde anomali riskinin belirlenmesi ve takip edilmesinde biyobelirteç olarak kullanılma potansiyeli taşımaktadır.

4. Araştırma Konusundaki Soruların Cevaplandırılması:

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ile haklarım konusunda bilgi almak için aşağıda belirtilen kişiyle bağlantı kurmam yeterli olacaktır.

Adı- Soyadı: Dr. Başak Gözüm. Telefon: 0-242-2496520



5. Zararların Karşılanması:

Çalışmada ağır bir komplikasyon gelişmesi beklenmemekle birlikte, kan alım yerinde uygulanan işleme bağlı olarak gelişebilecek kızarıklık, morarma, ağrı gibi komplikasyonların Dr. Başak Gözüm tarafından yerinde ve zamanında tıbbi müdahale yapılarak giderileceği bana bildirildi.

6. Araştırma Giderleri:

Araştırma kapsamındaki bütün işlemler için benden ya da bağlı bulunduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.

7. Gönüllülük, Çalışmayı Reddetme ve Çalışmadan Çekilme Hakkı, Çalışmadan Çıkarılma:

- Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.
- Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.
- Sorumlu araştırmacıya haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.

8. Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmalim nedeniyle ya da araştırma prosedürüne bağlı olarak onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabilir.

9. Gizlilik:

Çalışma süresince tutulan bütün kayıtlar ve dosya bilgileri gerektiğinde, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, çalışma ile ilgili hekimlerinin bilgisi olacaktır. Çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılar ya da yayınlarda sunulabilir. Ancak, bu tür durumlarda çocuğumun kimliği kesin olarak gizli tutulacaktır.

10. Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye / katılımcıya verilmesi gereken bilgileri gösteren Aydınlatılmış Onam Formu adlı metni kendi anadilimde okudum ya da bana okunmasını sağladım. Bu bilgilerin içeriği ve anlamı, yazılı ve sözlü olarak açıklandı. Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım. Çalışmaya katılmadığım ya da katıldıktan sonra çekildiğim durumda, hiçbir yasal



hakkımdan vazgeçmiş olmayacağım. Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bu metnin imzalı bir kopyasını aldım.

Gönüllünün / katılımcının Adı- Soyadı:

Yaş ve Cinsiyeti:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....
.....

Tarih:

Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için;

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....
.....

Tarih:

Açıklamaları Yapan Araştırmacının Adı- Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Onam alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı- Soyadı:

İmzası:

Görevi:

Tarih:

Ek 2. Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onayı.

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

2016

KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Morfoloji Binası A Blok 1. Kat No: A1-05 Kampüs /ANTALYA
	TELEFON	0 (242) 249 69 54
	FAKS	0 (242) 249 69 03
	E-POSTA	etik@akdeniz.edu.tr
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Ercan MIHÇI	
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Yardımcı Üreme Teknikleri Kullanılarak ve Kullanılmadan Doğan Bebeklerde MikroRNA Profillerinin Karşılaştırılması	
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 141	Tarih: 24.02.2016
	Yukarıda bilgileri verilen çalışmanın bütçesinin Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından karşılanması koşulu ile yapılmasında <u>bilimsel ve etik açışından sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.</u> Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	


Prof.Dr. Arda TAŐATARGİL
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı


Prof.Dr. Arda TAŐATARGİL
Bařkan


Öğr. Gör. Dr. M. Levent ÖZGÖNÜL
Bařkan Yardımcısı


Prof. Dr. Can ÇEVİKOL
Üye


Prof. Dr. Murat CANPOLAT
Üye


Prof. Dr. Dilara İNAN
Üye (İzinli)


Prof. Dr. Necmiye HADİMİOĞLU
Üye (İzinli)


Prof. Dr. Gülay ÖZBİLİM
Üye (İzinli)


Doç. Dr. Gülşüm Özge BAYSAL
Üye


Doç. Dr. Mehtap TÜRKAY
Üye


Doç. Dr. Dođa TÜRKKAHRAMAN
Üye


Doç. Dr. Ali Bekir AYCI
Üye


Doç. Dr. Dijle KİPMEN KORGUN
Üye


Av. Mustafa AÇIKEL
Üye (İzinli)


Turgut ALTUN
Üye