

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**



**YARDIMCI ÜREME UYGULAMALARINDA LET7-B VE
MİR29-A DÜZEYLERİNİN TEDAVİ BAŞARISINA
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Mehdi GHADIMZADEH

Danışman

Doç. Dr. Şengül TURAL

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.TIP.1904.21.002 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Mehdi GHADIMZADEH tarafından, **Doç. Dr. Şengül TURAL** danışmanlığında hazırlanan “**YARDIMCI ÜREME UYGULAMALARINDA LET7-B VE MİR29-A DÜZEYLERİNİN TEDAVİ BAŞARISINA ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 21.8.2023 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Davut GÜVEN Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi / Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü.	☐ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Şengül TURAL Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı	☐ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Serbülent YİĞİT Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı	☐ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Ayşe Feyda NURSAL Hitit Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı	☐ Kabul ☐ Ret
Üye	Dr. Öğr. Üyesi. Zülfinaz Betül ÇELİK Samsun Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı	☐ Kabul ☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☒ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☐

07 /07 / 2023

Mehdi GHADIMZADEH

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : YARDIMCI ÜREME UYGULAMALARINDA LET7-B VE MİR29-A DÜZEYLERİNİN TEDAVİ BAŞARISINA ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 04/07/2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 18

Tek kaynak oranı : % 3 çıkmıştır.

04 /07/ 2023

Doç. Dr. Şengül TURAL

ÖZET

YARDIMCI ÜREME UYGULAMALARINDA LET7-B VE MİR29-A DÜZEYLERİNİN TEDAVİ BAŞARISINA ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mehdi GHADIMZADEH
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
Doktora, Temmuz/2023
Danışman: Doç. Dr. Şengül TURAL

Amaç: İnfertilite çağımızın en önemli sorunlarından biri haline gelmiştir, üreme bozuklukları ve bazen tedavi süreçlerinin zorluğu çiftler üzerinde çok ağır maddi manevi yük getirmektedir. Bu çalışmamızda iki mikro RNA ekspresyon ve ifade düzeylerinin tedavi sonrası oluşturduğumuz iki grup arasındaki farklılıkları gözlemlemek ve onların yanında seçtiğimiz bu iki mikro RNA ile ilişkili DNMT3A ve ER α serum düzeylerinin etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmamız, OMÜ tıp fakültesi Hastanesi tüp bebek tedavi merkezine başvurmuş toplamda 60 gönüllü infertil hastanın katılımıyla gerçekleşmiştir. Alınan periferik kan örneklerinden standart yöntemler kullanılarak RNA'lar saflaştırıldı. mir-Let7b ve miR-29a ekspresyon düzeylerinin ölçümü ve kıyaslanması için kantitatif eş zamanlı PCR tekniği kullanıldı. DNMT3A ve ER α düzeyleri, ELİSA tekniği ile ölçüldü. Veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bulgular: Merkezde yapılan tedavi uygulaması sonrası başarılı olan grupla başarısız olan iki grup arasındaki miR-Let7b, miR-29a gen ekspresyon ve ifade düzeylerindeki farklılıklar sırasıyla ($p=0.03$; $p=0.02$) olacak şekilde anlamlı bir oranda farklılık olduğu tespit edilmiştir, ayrıca daha sonra seçtiğimiz bu iki mikro RNA ile bağlantılı iki serum DNMT3A ve ER α konsantrasyon ve ifade düzeylerindeki farklılıklar iki grup arasında da tespit edildi. Bu farklılıklar sırasıyla ($p=0.04$; $p=0.03$) olarak iki grup arasında anlamlı bir oranda farklılık olduğu tespit edildi, bunlara ilave olarak DNMT3A ve ER α ifade ve serum konsantrasyon miktarı, aralarında belirlediğimiz iki kriter olan yaş ve vücut kitle endeksi parametrelerine bakıldığında ise ER α için sırasıyla ($r=0.541$) ve ($r=0.508$), DNMT3A için ise yaş kriterinden negatif korelasyon ($r = -0.654$) ve vücut kitle endeksinden pozitif korelasyon ($r = 0.542$) olduğu gösterilmiştir ($p<0.05$).

Sonuç: Araştırmamızda, infertil hastaların, miRNA ekspresyon düzeylerinin farklılığı tedavi sonrası süreçte hasta bireylerin üzerinde rolü olduğu gösterilmiştir. Çalışmamız, infertilite hastalarında miR-Let7b ve miR-29a ifade düzeylerinin tedavi sonrası başarıya ulaşma sürecindeki etkilerinin araştırıldığı ülkemizdeki ilk çalışmadır.

Anahtar Sözcükler: İnfertilite, IVF, Epigenetik, MiRNA

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF LET7-B AND miR29-a LEVELS ON TREATMENT SUCCESS IN ASSISTED REPRODUCTION APPLICATIONS

Mehdi GHADIMZADEH

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Medical Biology

Ph.D., July/2023

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Şengül TURAL

Aim: Infertility has become the plague of our time, reproductive disorders and sometimes the difficulty of treatment processes bring a very heavy financial and moral burden on couples. In this study, it was aimed to observe the differences in the expression and expression levels of the two microRNAs between the two groups we created after treatment, and to investigate the effects of serum levels of Dnmt3a and ER α associated with these two microRNAs we selected.

Materials and Methods: A total of 60 infertile patients who applied to Ondokuz Mayıs University Hospital IVF treatment center participated in our study. RNAs were purified from peripheral blood samples using standard methods. Quantitative simultaneous PCR technique was used to measure and compare the expression and expression levels of mir-Let7b and mir-29a. Dnmt3a and ER α levels were measured by ELISA technique. The data were evaluated statistically.

Results: The differences in miR-Let7b, miR-29a gene expression and expression levels of 60 infertile patients who applied to the OMU hospital in vitro fertilization treatment center were significantly different between the group that became pregnant after the treatment and succeeded and the two groups that failed to conceive ($p=0.04$; $p=0.03$), respectively. In addition, differences in the concentration and expression levels of the two serum Dnmt3a and ER α associated with these two microRNAs we selected later were also detected between the two groups. It was determined that there were significant differences between the two groups, respectively ($p=0.04$; $p=0.03$). , for ER α ($r=0.541$) and ($r=0.508$), respectively, for Dnmt3a there was a negative correlation from age ($r = -0.654$) and a positive correlation from body mass index ($r = 0.542$) ($p<0.05$).

Conclusion: In our study, it has been shown that the difference in microRNA expression and expression levels between the two groups of infertile patients has an effect and role on the patients in the post-treatment period. Our study is the first study in our country in which the effects of miR-Let7b and miR-29a expression levels on the process of achieving success after treatment in infertility patients were investigated.

Keywords: Infertility, IVF, Epigenetics, MiRNA

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca bilgisini, yardımını, desteğini, ilgi ve anlayışını hiç eksik etmeyen, birlikte çalışmaktan onur, gurur ve mutluluk duyduğum tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Şengül TURAL'a öncelikle çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimime katkılarından dolayı Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı başkanı değerli öğretim üyesi Prof. Dr. Sezgin ÖZGÜR GÜNEŞ ve diğer öğretim üyesi hocalarıma katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca desteğini ve yardımını hiç eksik etmeyen sayın Prof. Dr. Davut GÜVEN'e

Tez çalışmalarım ve laboratuvar çalışmalarım sürecinde desteğini, anlayış ve ilgisini esirgemeyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (KİTAM) Öğr. Gör. Dr. Eda UĞURTAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Beni bu süreçte hiç yalnız bırakmayan, hayatımın her alanında desteklerini ve sevgi ve anlayışlarını hissettiğim ve her kararında yanımda olan, bana maddi manevi destek sağlayan ve eğitim sürecimde en büyük pay sahibi olan canım aileme yürekten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, PYO.TIP.1904.21.002 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

Mehdi GHADIMZADEH

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İnfertilite.....	4
2.2. Türkiye’de Infertilite.....	6
2.2.1. Tüp Bebekte Başarı Oranını Etkileyen Etkenler	6
2.3. İn Vitro Fertilizasyon (İVF)	7
2.3.1. Yumurtalık Uyarımı (Stimülasyon)	7
2.3.2. Riskler	8
2.4. İVF ve Embriyo Kültürü	8
2.4.1. Riskler	9
2.5. Epigenetik	10
2.5.1. Gen Ekspresyonunu Modüle Eden Epigenetik Mekanizmalar	10
2.5.2. DNA Metilasyonu	10
2.5.3. Histon Modifikasyonu	11
2.5.4. Kodlamayan RNA’lar (ncRNA’lar)	12
2.6. Germ Hücreleri Gelişiminin Epigenetik Düzenlemesi.....	14
2.7. İVF Ve Epigenetik.....	14
2.8. Kromatin Ve Epigenetik Mekanizmalar	15
2.9. Genomik İmprinting	16
2.10. Mikro RNA’ların İVF Üzerindeki Etkisi	18
2.11. Kadın İnfertilitesinde Mikro RNA’ların Etkisi Ve Rolu	21
3. MATERYAL VE METOT.....	24
3.1. Hasta ve Kontrol Grubu Seçimi	24
3.2. Power Analizi.....	24
3.3. Periferik Kan Numunelerinin Toplanması	24
3.4. Çalışmamızda Kullanılan Cihazlar	24
3.5. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Materyaller	25
3.6. Çalışmamızda Kullanılan Kitler	25
3.7. Periferik Kandan RNA İzolasyonu	25
3.8. Revers Transkripsiyon ile cDNA Sentezi	27
3.9. Real time PCR (qRT-PCR) Yöntemi İle Kantitatif Ölçüm.....	28
3.9.1. Primerlerin Seçilme İşlemi	29
3.9.2. Çalışmada Kullanılan İki Mikro RNA Hsa-miR-let7b-5p Ve Hsa-miR-29a-5p Ekspresyon Düzeylerinin Ölçülmesi	30
3.10. ELİSA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).....	32
3.10.1. Reaktif hazırlama	33
3.10.2. İşlem prosedürü	33
4. BULGULAR.....	35
4.1. hsa-miR-let7b-5p ve hsa-miR-29a-5p ifade düzeyleri.....	35
4.2. Serum DNMT3A Ve ERα Konsantrasyon Miktarının Belirlenmesi.....	39
5. TARTIŞMA.....	42
6. SONUÇ.....	455
KAYNAKÇA.....	47

ÖZGEÇMİŞ	51
----------------	----



SİMGELER VE KISALTMALAR

cDNA	: Komplementer DNA
CT	: Cycle Threshold
CpG	: Sitozin-fosfat-guanin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Ethylenediamine Tetra Acetic Acid
ELISA	: Enzime bağlı immünosorbent analiz
EtBr	: Etidyum Bromür
IL	: İnterlökin
kb	: Kilobaz
lncRNA	: Long non-coding RNA
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
miRNA	: Mikro RNA
ml	: Mililitre
mRNA	: Mesajcı RNA
ng	: Nanogram
OR	: Odds Ratio
PCR	: Polimerase Chain Reaction
pre-miRNA	: Precursor miRNA
pri-miRNA	: Primer miRNA
qRT-PCR	: Quantitative Real Time-Polimerase Chain Reaction
RPM	: Rotations per minute
RISC	: RNA Induced Silencing Complex
RNA	: Ribonükleik asit
RNaz	: Ribonükleaz
USP	: Unmethylation Specific PCR
UTR	: Untranslated region
VKİ	: Vücut Kitle Endeksi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>In vitro</i> fertilizasyon şeması.....	9
Şekil 2.2. Bir Kromatin Alanının Özellikleri.....	16
Şekil 2.3. Germ Hattında Damgalama (imprinting).....	17
Şekil 2.4. MikroRNA (miRNA) Biyogenezi Ve Fonksiyonunun Çalışma Modeli.....	20
Şekil 2.5. Yumurtalık Fonksiyonunun Modülasyonunda Anahtar miRNA'lar.....	22
Şekil 2.6. miRNA'lar ve IVF.....	23
Şekil 3.1. Taqman Prob Sistemi.....	29
Şekil 4.1. Let7-b Ve miR29-a'ya ait $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerlerinin Histogram Ve Normalite Grafikleri.....	38
Şekil 4.2. DNMT3A Ve ER α 'ya Ait Standart eğri tabloları.....	41
Şekil 4.3. Başarılı Ve Başarısız Gruplar Arasındaki Dnmt3a Ve ER α Konsantrasyon Farkı.....	41

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. PCR Ters Transkripsiyon Reaksiyon Karışımı.....	27
Tablo 3.2. PCR Ters transkripsiyon programı.....	28
Tablo 3.3. miR-let7b-5p ve miR-29a-5p'ye ait tanımlar ve diziler.....	30
Tablo 3.4. Real-time PCR (qRT-PCR) reaksiyon karışımları.....	31
Tablo 3.5. miR-let7b-5p ve miR-29a-5p ifade düzeylerinin ölçüldüğü Real-time PCR (qRT-PCR) programı.....	32
Tablo 4.1. Kontrol Ve Hasta Grupların Klinik Ve Demografik Özellikleri.....	35
Tablo 4.2. Normallik Testi.....	36
Tablo 4.3. Basıklık ve Çarpıklık Değeri.....	37

1. GİRİŞ

İnfertilite, üreme çağındaki çiftlerin en az bir yıllık korunmasız düzenli cinsel ilişkisine rağmen gebe kalamama durumu olarak tanımlanmaktadır (Cengiz vd, 2015). İnfertilite, yaşamı tehdit eden bir hastalık olarak sınıflandırılmamasına karşın, çiftleri, aileyi ve toplumu ilgilendiren sosyal bir sorundur (Kırca ve Pasinlioğlu, 2013). Bu bakış açısından infertilite; psikolojik, psikiyatrik, sosyal, tıbbi ve ailevi sorunlarla sebebiyet veren, kültürel sorunlara sebep, bu problem ile uğraşan çiftleri çok ani ve beklenmedik streslerle yüz yüze bırakabilen, baş edilmesi gereken zorlu bir süreçtir (Güz vd, 2003).

Günümüzde bu durumla baş edebilmek için en çok tercih edilen kısırlık tedavilerinin başında yardımcı üreme uygulamaları ve tüp bebek tedavisi gelmektedir. İnsanların bu tedaviye başvurma sebeplerinin altında yatan birçok faktör vardır. Bunlar, nedeni açıklanamayan kısırlık, enfeksiyon, tüplerde tıkanma, erkeğin sperm kalite düşüklüğü, kilo veya ileri yaştan kaynaklanabilen durumlardır. Ancak bu tedavide başarıyı yakalayabilmek kadar tedavide başarısız sonuçlarla karşılaşabileceğinin de bilincinde olmak gerekir. Araştırmalar yardımcı üreme uygulamaları sürecindeki başarısızlık oranını çeşitli nedenlere bağlamaktadır. Tüp bebek tedavisinde başarısızlığa konu olan birincil sebepler arasında kalitesiz embriyo oluşumu, embriyonun yanlış ortamda bulundurulması ve embriyo zarının kalınlaşması yer almaktadır. İkincil sebepler arasında rahim iç duvarındaki bozukluklar, miyom ve polipler, enfeksiyon kaynaklı yapışıklıklar, pıhtılaşma bozuklukları, bağışıklık sistemi bozuklukları gibi pek çok rahim kaynaklı sebepler yer almaktadır. Üçüncül sebepler enfeksiyonlardan dolayı fallop tüplerinin yapışmış olması veya daha önce geçirilen cerrahi operasyonlarda tüplerin zarar görmesi, tüplerin tıkalı olması, içlerinde sıvı birikmesi ve sıvının da yumurtalıklara doğru akması, ayrıca rahimde embriyonun tutunmasını zorlaştırması sebebiyle tüp bebek tedavisinde zorluklara neden olabilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, epigenetik etkilerin de tüp bebek tedavi başarısını etkilediğini göstermiştir (E. Scalici vd, 2016)

Dolaşımdaki veya “hücre dışı” mikroRNA'lar (miRNA'lar), kanser, jinekolojik ve gebelik bozuklukları gibi çeşitli hastalıkların potansiyel teşhis ve prognostik biyobelirteçleri olarak kullanılabilir. Bununla birlikte, kadın infertilitesine ve *in vitro* fertilizasyona (IVF) katkıları halen bilinmemektedir (E. Scalici vd, 2016).

miRNA'lar, protein kodlamayan yaklaşık 22 nükleotid uzunluğundaki antisens RNA'lardır. miRNA'lar büyüme, farklılaşma ve apoptoz dahil olmak üzere temel hücresel süreçleri düzenleyerek gen ekspresyonunu etkileyebilmektedirler. Hem normal hem de patolojik durumlarla ilişkilendirilmişlerdir ve sinyal iletimi için önemli olabileceği düşünülmektedir (E. Scalici vd, 2016, Butler vd.2019).

Bu çalışmada çocuk sahibi olamayan ve tedavi yöntemleri uygulanan kadınlarda yumurta toplama sırasında alınan periferik kanlardan, let-7b, miR-29a seviyelerinin qRT-PCR yöntemiyle ve ayrıca ELİSA yöntemiyle, Estradiol Receptör Alpha (ER α), DNA Metil Transferaz 3a (DNMT3A) konsantrasyonları ölçülerek tedavi başarısına etkisinin incelenmesi amaçlanmaktadır. let-7b ve miR-29a'nın seçilmesinin nedeni önceki çalışmalarda daha anlamlı çıkmış olmalarıdır (E. Scalici vd, 2016).

Bilindiği üzere tüp bebek tedavisi aileler üzerinde madden ve manen büyük bir yük ve külfet getirmektedir. Ülkemiz ekonomisi açısından baktığımızda, tedavi süreci oldukça maliyetli olan bu uygulamaların tedaviye başlamadan önce tedavi başarı olasılığının yüksek seviyede olması, ailelerin manevi kayıplarının ve sonrasında doğacak maddi kayıpların en aza indirgenmesi her zaman amaçlanmaktadır. miRNA'ların tüp bebek tedavi yönteminde yapılan çalışmalarda büyük bir etkiye sahip olduğu ve tedavi başarı oranlarıyla ilişkili olduğu önerilmektedir, bu nedenle tedavide en etkin miRNA'ların belirlenmesi, oranlarının ölçülmesi ve ona bağlı olarak tedavi başarı oranının yüzdesi çıkartılıp ona göre tedaviye başlanıp başlanmaması aileler ve tedaviyi uygulayacak uzman ekip üzerinden büyük bir stres ve yükü kaldırmış olacaktır (Cengiz vd, 2015).

miRNA seviyelerinin tedavi başarısına etkisini inceleyen yurtdışında yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Genetik yapı bilindiği gibi gen havuzu nedeniyle populasyonlar arasında farklılık göstermektedir bu nedenle populasyon genetiği çalışmaları önem arz etmektedir. Son yıllarda infertilite üzerinde genetik çalışmalarla beraber özellikle intrinsik (metilasyon, antisense ve mikroRNA'lar, histon modifikasyonu) ve ekstrinsik (dış çevresel faktörler) faktörlerin gen ekspresyonu üzerine etkilerinin incelendiği epigenetik alanındaki çalışmalar infertilite patogenezinin açıklanmasında önem kazanmakta oluşu böyle bir çalışma hipotezi kurmaya yönlendirmiştir. Türk popülasyonundaki kadınların periferik kandaki miRNA seviyelerinin incelendiği ve bu seviyelerin yardımcı üreme

uygulamaları başarısına etkisinin incelendiği bir çalışma henüz yapılmamıştır. Diğer populasyonların verileri ile Türk populasyonu verileri birleştiğinde metanalizler yapılabilecek ve sonuçlar çok daha anlamlı olacaktır. Genetik çalışmaların yanısıra gen ekspresyonunu düzenleyen faktörleri içeren epigenetik bilimi son dönemlerin daha popüler ve güncel bir alanı olmuştur. Özellikle epigenetik çalışmalar açısından coğrafi farklılıklar önem arz etmektedir. Ülkelerarası farklılıkların öneminin yanısıra aynı ülkenin farklı coğrafik bölgelerindeki gen havuzlarının bile farklı olduğu bilinmekte ve bu coğrafik farklılıkların dahi popülasyon genetiği çalışmalar açısından çok değerli olduğu bilinmektedir. Yardımcı üreme tekniklerinin son yıllarda ne kadar yaygın olduğu göz önüne alındığında sonuçlarımızın bilim dünyasında ve bu alanda önemli bir etkiye ve değere sahip olacağı kanaatindeyiz.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnfertilite

Kısırlık, çiftlerin yaklaşık %8-10'unu etkileyen küresel bir sağlık sorunudur. Türkiye gibi güçlü demografik sorunları olan ülkelerde tehdit edici boyutlara ulaşabilen, sosyal, ekonomik ve kültürel sonuçları olan çok boyutlu bir sorundur. Son zamanlarda kısırlık sorunu yaşayan çiftlerin sayısı giderek artmakta ve suni tohumlamayı tercih etmektedir. Bu çalışmanın amacı üreme çağındaki kadınlarda kısırlık nedenlerinin epigenetik açıdan araştırılmasıdır.

Çocuk doğurma ve çocuk yetiştirme her insanın yaşamında son derece önemli olaylardır ve tamamlanma, mutluluk ve aile bütünleşmesi nihai hedefleriyle güçlü bir şekilde ilişkilidir. İnsan varlığının çocuk aracılığıyla bütünlüğe ulaştığı ve bireyin üreme ihtiyacını karşıladığı yaygın kabul görmektedir. İnsan doğurganlığı, hayvanlar alemindeki diğer türlerle karşılaştırıldığında ne yazık ki düşüktür. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) son araştırmalarına göre, çiftlerin yaklaşık %8-10'u bir tür kısırlık sorunu yaşıyor. Küresel olarak bu, 50-80 milyon insanın entegre bir aile edinme sorunuyla karşı karşıya olduğu anlamına geliyor. ABD'de yaklaşık 5 milyon kişi kısırlık sorunu yaşarken, Avrupa'da insidansın yaklaşık %14 olduğu tahmin edilmektedir. İnfertilite insidansı coğrafi farklılıklar ile ilişkilidir. Örneğin, bazı Batı Afrika topluluklarında kısırlık oranı %50 civarındayken, bazı Batı Avrupa ülkelerinde %12'dir. Aynı şekilde, oranların %3,5 ile %16,7 arasında değiştiği gelişmiş ülkelerde olduğu gibi, infertilite oranlarının %6,9 ile %9,3 arasında değiştiği az gelişmiş ülkelerde de farklılıklar görülmektedir. Nedenlerin coğrafi farklılıklarla ilgili olduğu da gözlemlenmiştir. Özellikle Batı ülkelerinde kısırlığın en yaygın risk faktörü yaş iken, Afrika'da cinsel yolla bulaşan hastalıklardır.

Kısırlık veya infertilite, 35 yaş üstü kadınlarda, doğum kontrol yöntemleri kullanılmadan ve normal cinsel ilişkiye girilirken en az 6 ay veya bir yıl denenmesine rağmen gebe kalamama durumu olarak tanımlanmaktadır. Yardımcı üreme uygulamaları, cinsel ilişki yoluyla elde edilmeyen döllenme için kullanılan tüm yöntemleri içerir. Geçmişte, insanların doğurganlıkları üzerinde çok az kontrolleri vardı ve çocuk sahibi olamayan çiftlerin bu gerçeği kabul etmekten başka çareleri yoktu. Buna karşılık, günümüzde kısırlık, buna dahil olan çiftlerin ruhuna

derinden dokunan nispeten yaygın bir sorun olsa da, tıp bilimi, Yardımcı Üreme ile soruna çözüm bulma şansını artırmıştır. İnsan yumurtasının laboratuvarında ilk başarılı dölleme 1978 yılında gerçekleşti. Bu işlemle ilk çocuğun dünyaya gelmesi gerçek bir dönüm noktası oldu çünkü soruna olası bir çözüm sunduğu için kısır çiftlere umut verdi. Ayrıca ABD'de 1981'de yardımcı üreme yöntemiyle yapılan ilk başarılı doğum, bu yöntemin hızla yaygınlaşmasına ve uzmanlaşmış merkezlerin kurulmasına yol açtı.(Roupa Z vd, 2009).

Kronik fizyolojik durumun daha iyi anlaşılmasına yardımcı olabilmesi için infertilite nedenleri, epigenetik mekanizmaların değişken olması ve buna sebep gen ekspresyonundaki düzenlenmelere sebebiyet vermesi ve aralarındaki genetik faktörler ile karmaşık ve hala çoğu bilinmeyen ilişkinin ortaya çıkarılması düşünülmektedir (A.P.A. van Montfoort vd. 2012). Gelişim sırasında, normal veya patolojik durumda hücre döngüsünün farklı zaman noktalarında insan genomunun kodlayıcı ve kodlayıcı olmayan kısımlarının ekspresyonunda karmaşık olan çeşitli moleküler mekanizmaların önemli rolünün keşfi, infertilite gibi hastalıkların karmaşıklığının anlaşılmasına yardımcı olabilir. İnfertilite fenotipi ile ilişkili genomik ve kromozomal varyasyonların düzenlenmesinde rol oynayan moleküler mekanizmalar, ardışık gebelik kayıpları veya tekrarlayan düşükler ve idiyopatik vakalar halen güncel çalışılmakta olan konuların başında gelmektedir (A.P.A. van Montfoort vd. 2012). İnfertiliteyi etkileyen genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde yer alan moleküler mekanizmaları anlamak için öncelikle kişinin epigenotipindeki değişikliklerle birlikte genotip, çevre, sağlık, beslenme ve yaşın rolü göz önünde bulundurulmalıdır, bu durum infertilitenin bilinmeyen nedenlerinin bulunmasında yardımcı olacaktır. Genetik kod, fenotipi belirleyen sabit bilgi taslağını ifade ederken, epigenetik kod, fenotipi çeşitli sinyallere, çevresel faktörlere ve gametleri ve daha sonra zigotu çevreleyen mikro çevreye göre ince ayar yapmak için dinamik bir anahat sağlamaktadır. İnfertiliteyi iki kısma ayırmak mümkündür: Birincil infertilite, bir kez uygun gebelik geçirmeyen çiftler anlamına gelirken, ikincil infertilite, daha önce yaşanabilir bir gebelik geçirdikten sonra infertilite sorunları yaşanması anlamına gelmektedir (Sami ve Ali, 2006). Bazı araştırmalar, düşük gelirli ortamlarda kısırlık prevalansının biraz daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu yaygınlığın temel nedeni sosyal, finansal ve tıbbi kaynakların yetersizliğidir. İnfertilitede cinsiyet ve etnik köken açısından net bir ayrım yoktur

(Watkins ve Baldo, 2004). İnfertilite yaşamı tehdit eden bir hastalık olmayıp bireyler, çiftler, aileler ve toplum üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır (Kırca ve Pasinlioğlu, 2013).

2.2. Türkiye’de İnfertilite

Diğer birçok dünya ülkesi gibi ülkemizde de yüksek kısırlık oranları görülmektedir. Yapay üreme teknikleri son yıllarda en hızlı gelişen sağlık hizmetlerinden biridir ve Türkiye, yüksek başarı oranları ve embriyolar için oldukça gelişmiş genetik testler nedeniyle yardımcı üreme teknikleri ile ilgili sağlık turizminde popüler bir lokasyon haline gelmiştir. Prevalans oranları dünya genelinde %10 ile %20 arasında değişmektedir ancak Saraç ve Koç'un (2017) çalışmasına göre Türkiye’de infertilite oranları 1993 ve 2013 yılları arasında sırasıyla %15,0’den %8,1’e düşmüştür. Öte yandan, hayatında en az bir kez ART (yapay üreme teknikleri) kullanmış olan kadınların oranı 2008’den 2019’e %1,9’dan %6,2’ye yükselmiştir. (Kahraman ve arkadaşları, 2021).

2.2.1. Tüp Bebekte Başarı Oranını Etkileyen Etkenler

Anne adayının yaşı ve fiziksel durumu tüp bebekte başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Tüp bebekte başarı oranının dramatik biçimde azalmasının sebeplerinden birisi anne adayının ileri yaşıdır. Yumurtalıkların yaşlanması, döllenme oranında azalma, rahim iç zarının döllenmiş yumurtayı tutma yeteneğinin azalması, endometriozis hastalığı ve miyomların görülme sıklığının artması, doğurganlığı etkileyebilecek cerrahi müdahaleler gibi problemler ileri yaş yüzünden gittikçe artmaktadır.

İnfertilitenin önüne geçmek için kadınlarda rahim içi yapışıklıklar, rahim içinde miyom veya polip gibi embriyonun tutunmasını engelleyebilen anormalliklerin saptanması ve ortadan kaldırılması önemli bir detaydır. Bu amaçla rahim içine sıvı verilerek ultrasonografi eşliğinde rahim boşluğunun normal olup olmadığı kontrol edilir. Basit ve hasta için ağrısız bir yöntem olan SIS (salin infusion sonografi) tekniği sıklıkla kullanılabilir. Ayrıca rahim filmi Histerosalpingografi (HSG), de bu tür bozuklukları görmek için sıklıkla başvurulmuş bir yöntemdir. Histeroskopi (H/S) ise rahim içine yerleştirilen ufak bir kamera sistemi ile rahim boşluğunu detaylı olarak inceleme şansı veren kolay bir yöntemdir. Aynı zamanda rahim içindeki bozuklukları düzeltme kolaylığı getirmektedir. Histeroskopi

tekrarlayan tüp bebek başarısızlığına sahip vakalarda rahime ait faktörleri saptamak için kullanılır. (Smith S vd. 2003)

Kadınlarda tüp bebek şansını azaltan en önemli ve en sık görülen nedenlerden birisi tüplerde sıvı toplanmasıdır. Tüp bebekte başarıyı etkileyen en önemli faktörler arasında hastaya özel olan problemlerin tespiti ve ona en uygun tedavinin belirlenmesi yani kişiye özel tedavinin uygulanmasıdır (E. Scalici vd, 2016, Butler vd.2019).

Doğduğu anda bir kadının yumurta rezervi belli olmaktadır ve bunu değiştirmek hiçbir şekilde mümkün değildir. Kadın kaç yaşında ise yumurtası da aynı yaştadır, yani kadınlar yaşlandıkça yumurtaları da yaşlanır. Hatta kimi zaman çok genç kadınlarda yaştan bağımsız olarak da yumurtalık yaşlanması görülebilmektedir. Yaşlanan yumurtalar da gebelik şansını çok önemli oranlarda azaltmaktadır. Tüp bebek tedavisi uygulanan hastalarda 20-30'lu yaşlardaki anne adaylarından 8-10 yumurta toplanırken, 40'lı yaşlardaki hastalardan yumurta toplama sayısı 1-2'ye düşmektedir (E. Scalici vd, 2016, Butler vd.2019).

2.3. *In Vitro* Fertilizasyon (İVF)

Tüp bebek kısır çiftler için en etkili tedavi yaklaşımlarından biridir. Rutin IVF prosedürü kısaca üç adımı içerir: yumurtalık stimülasyonu (uyarımı), IVF ve embriyo kültürü ve embriyo transferi.

2.3.1. Yumurtalık Uyarımı (Stimülasyon)

Yumurtalık stimülasyonu, IVF doğurganlık tedavisinin aşamalarından birisidir. Amaç, kadının yumurtalıklarından mümkün olduğunca çok sayıda olgun yumurta toplamaktır. Birçok yumurtanın hasat edilmesi, yumurtalardan birinin döllenme, rahme geri yerleştirilme ve sağlıklı bir bebek olma şansını en üst düzeye çıkarır. Doğal dişi üreme döngüsü inanılmaz derecede karmaşık olduğundan, yumurtalık uyarımı da karmaşık bir süreçtir. Kontrollü yumurtalık stimülasyonu, IVF sonuçlarını iyileştirmede önemli bir rol oynar. Tüp bebek döngüsünde, mümkün olduğunca çok sayıda olgun yumurta üreterek başarı şansı en üst düzeye çıkarılır. Stimülasyon aşaması, yumurtalıkların çok sayıda yumurta üretmesini sağlamak için 8-14 gün boyunca ilaç enjeksiyonunu içerir. Foliküllerinizin olgunlaşması daha yavaşsa, stimülasyon aşaması daha uzun sürer (L. Das vd. 2017).

İlaçlar, iki anahtar hormonu, Folikül Uyarıcı Hormonu (FSH) ve Lütenleştirici Hormonu (LH) uyarır. Bu hormonların belirli etkileri vardır: FSH, adet döngüsü sırasında foliküllerin gelişmesini uyarır. Normalde, baskın olmayan foliküller, FSH seviyeleri düştüğü için yumurtlamadan önce ölürler. FSH enjeksiyonları vücutta daha yüksek FSH seviyelerini korur ve yumurtalıkların daha olgun yumurtalar üretmesini sağlar. Yumurtlamadan hemen önce, daha yüksek östrojen seviyeleri, LH'de yumurtlamaya neden olan bir yükselmeyi tetikler. Yumurtlamayı uyaran yüksek dozda insan koryonik gonadotropininin (hCG) bir "tetik atışı" süreci başlatır. Yumurtalık uyarımından sonra, ancak yumurtlamadan önce IVF'nin yumurta toplama aşaması gelir (L. Das vd. 2017).

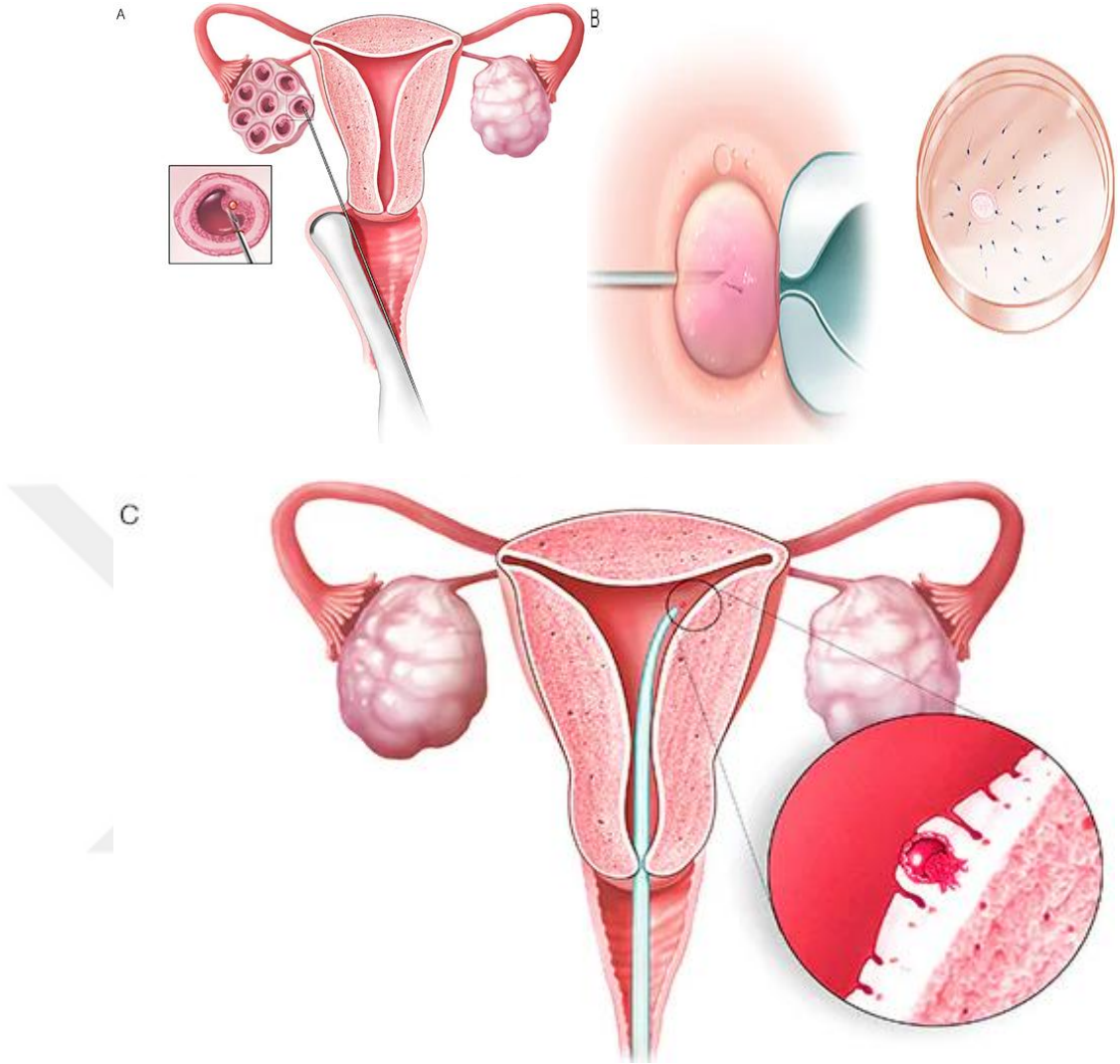
2.3.2. Riskler

Eksojen gonadotropinler, oosit ve embriyo gelişiminin yanı sıra endometriyal alıcılığı bozabilir, kromozomal anöploidiyi artırabilir ve epigenetik modifikasyonları değiştirerek perinatal sonuçlar ve uzun vadeli sağlık üzerinde zararlı etkilere yol açabilir. Ek olarak, birincil damgalama işlemi, oogeneizde nispeten geç bir aşamada gerçekleşir; Süperovülasyon sırasında birçok oositi aynı anda olgunlaştırmak için kullanılan gonadotropik hormonlar, oositlerde imprint kazanımına zarar verebilir. Alternatif olarak, damgalama işlemini tamamlamayan oositler erken salınabilir veya tedavi olmadan yumurtlamayacak olan kalitesiz oositler olgunlaşabilir (M.D. Pisarska vd. 2019). Çalışmalar, Finlandiya'da ART tedavisi gören bekar kızların, doğal olarak gebe kalan kontrollere göre ovulasyon indüksiyonu nedeniyle daha fazla majör kalp anomalisine sahip olduğunu göstermektedir (M.D. Pisarska vd. 2019).

2.4. IVF ve Embriyo Kültürü

Tüp bebek (IVF), doğurganlığa yardımcı olmak veya genetik sorunları önlemek ve çocuk sahibi olmaya yardımcı olmak için kullanılan karmaşık bir prosedürler dizisidir. IVF sırasında, olgun yumurtalar yumurtalıklardan toplanır (alınır) ve bir laboratuarda sperm tarafından döllenir. Daha sonra döllenmiş yumurta (embriyo) veya yumurtalar (embriyolar) rahme transfer edilir. Bir tam IVF döngüsü yaklaşık üç hafta sürer. Bazen bu adımlar farklı parçalara bölünür ve süreç daha uzun sürebilir. Tüp bebek, yardımcı üreme teknolojisinin en etkili şeklidir. İşlem bir çiftin kendi yumurtaları ve spermleri kullanılarak yapılabilir. Veya IVF, bilinen veya anonim bir donörden alınan yumurtaları, spermleri veya embriyoları içerebilir. Bazı

durumlarda, gestasyonel bir taşıyıcı uterusu implante edilmiş bir embriyoya sahip biri kullanılabilir. (M.D. Pisarska vd. 2019).



Şekil 2.1. *In vitro* fertilizasyon sırasında, yumurtalar bir yumurtalık içindeki olgun foliküllerden çıkarılır (A). Yumurtanın içine tek bir sperm enjekte edilerek veya bir petri kabında yumurta ile sperm karıştırılarak yumurta döllenir (B). Döllenmiş yumurta (embriyo) rahime aktarılır (C). (Kitap: Mayo Clinic Aile Sağlığı Kitabı, 5. Baskı)

2.4.1. Riskler

Optimal bir embriyo kültür ortamı, embriyonik gelişim ve akabinde IVF tedavisinin başarısı için önemlidir. Hangi embriyo kültür ortamının en uygun olduğu tartışmalıdır (F. Chedin, Vd. 2002). Klinik pratikte farklı kültür besiyerlerinin kullanılması ve insan embriyolarının blastosist aşamasına kadar uzatılmış embriyo

kültürü, preimplantasyon döneminde baskı sürecini etkileyebilir (E. R. Gibney vd. 2010).

Fare modellerini kullanan birkaç çalışma, preimplantasyon embriyolarında genomik damgalamanın belirli kültür koşulları tarafından bozulabileceğini göstermiştir (Hanna, Vd. 2014) Artan kanıtlar, kültür ortamı tipinin IVF çocuklarında doğum ağırlığını etkileyebileceğini düşündürmektedir (Wu, Vd, 2011). Schieve ve ark. (Chen, Vd, 2013), ART ile gebe kalan tekillerin düşük doğum ağırlığı riskinin arttığını, genel düzeltilmiş risk oranının 1.8 olduğunu buldu. Ek olarak, süperovulasyondan sonra ve belirli embriyo kültür ortamlarının kullanımından sonra fare embriyolarında anormal metilasyon paternlerinin oranlarının arttığını bulmuşlardır (Ziru Jiang vd. 2017).

2.5. Epigenetik

2.5.1. Gen Ekspresyonunu Modüle Eden Epigenetik Mekanizmalar

Özel ve yeni epigenetik işaret kalıplarının varlığı, somatik hücrelerde kalıtsal bir değişiklik olarak kabul edilebilir ve hücreler, DNA zincirini kodlayan genlerin nükleotid dizilerinde herhangi bir değişiklik olmaksızın hücresel hafıza olarak saklar (Mallory AC vd. 2010).

Epigenetik mekanizmalar, DNA veya histonlarda ve bazı durumlarda hem DNA hem de histonlarda kromatinin geri dönüşümlü modifikasyonlar yoluyla gen ekspresyonunu düzenler. Fizyolojik faktörlerin etkisi altında epigenetik modifikasyonlar, genomun paketlenmesinde ve yorumlanmasında çok önemli bir rol oynar. Hücre içinde, genleri susturmak için birbirleriyle etkileşime giren önemli moleküler ve biyokimyasal olaylar/süreçler, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, RNA ile ilişkili susturma ve nükleozom konumlandırmasının yeniden düzenlenmesi işlemidir (Borchert GM vd. 2006).

2.5.2. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, bir metil (-CH₃) grubunun DNA bazlarına post replikatif kovalent olarak bağlanmasıdır ve beşinci karbondaki sitozinin metilasyonu, insan genomundaki tüm sitozinlerin %5'inden azını temsil eden iyi karakterize edilmiş epigenetik modifikasyondur (Lee YS vd. 2006). DNA'daki sitozin-5 karbonun metilasyon reaksiyonu (bundan sonra DNA metilasyonu), DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) tarafından katalize edilir. Bu enzim ailesi, metil grubunu DNA'daki S-

Adenosil metioninden (SAM) sitozin-5-karbona aktarır. Beş DNMT vardır; DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3C ve bir kofaktör olan DNMT3L. Üç farklı süreci aktif olarak düzenlerler, ki bunlar, bakım(onarım) metilasyonu, *de novo* metilasyon ve retrotranspozon aktivitelerinden korunmadır (Carletti MZ vd. 2009). DNMT1, DNA'nın yarı metillenmiş bölgelerinin ebeveyn DNA zincirine göre tamamen metillenecek şekilde yenilenmesinden sorumlu tüm insan DNMT'lerinin ana enzimidir ve replikasyon sırasında meydana gelen bakım DNA metilasyonu olarak adlandırılır. DNMT3A ve DNMT3B, yeni CpG bölgelerinin metilasyonunda yer aldıkları için esas olarak *de novo* metilasyonda yer alırlar (Nicholson RH vd. 2004).

DNMT3C, promotörlerini metilleyerek erkek germ hattındaki evrimsel olarak genç retrotranspozonları susturmaktan sorumludur (Watanabe T vd. 2008).

DNMT3 ailesinin beşinci üyesi olan DNMT3L'nin, oositlerde maternal imprints oluşturulması ve spermatogenez sırasında eksprese edilmesi için gerekli olduğu düşünülmektedir (Murchison EP vd. 2007).

DNMT2 bu ailenin bir başka üyesidir, embriyonik kök hücrelerle ilişkili olmasına rağmen DNA metilasyonundan yoksundur ve aktif olarak RNA metilasyonunda yer alır (Tang F vd. 2009).

Memelilerde, genellikle transkripsiyon, sitozinin bir guaninin yanında bulunduğu ve bir CpG bölgesi adı verilen bir fosfat grubuyla bağlandığı CG dizileri açısından zengin promotör bölgelerinde başlatılır. DNA'daki bu tür CpG yoğun bölgeleri, CpG adacıkları olarak bilinir (Luense LJ vd. 2009).

2.5.3. Histon Modifikasyonu

Nükleer histonlar, N-terminallerinde çekirdek histon oktamerinin dış yüzeyine doğru uzanan ve "histon kuyruğu" olarak adlandırılan pozitif yüklü amino asitlere sahiptir. Histon kuyrukları sayı olarak 15-38 amino asit içerir ve nükleozom düzeneğini daha yüksek dereceli kromatin yapılarına tesir eder. Dört çekirdek histonun amino-terminal kuyrukları, seçilen amino asitlerin enzim katalizli transasyon sonrası modifikasyonlarına (PTM'ler) tabidir ve bilgi biriktirme veya kodunu çözme yeteneğine sahiptir. (Xu S vd. 2009). Nükleozom, histon proteinlerinin (H2A, H2B, H3 ve H4'ün her birinden ikişer adet) oluşan bir oktamer düzeneğinin 1.7 katı kadar 147 baz DNA sarmalından oluşur ve kromatinin ayrı birimleri olarak bilinir (Gillis AJ vd. 2007). Histonların PTM'leri, metilasyon,

fosforilasyon, asetilasyon, deaminasyon, ADP ribozilasyonu, kuyruk kırpma, prolin izomerizasyonu, ubiquitilasyon ve sumolasyon işlemiyle gen ekspresyonunu ve DNA histonları (oktamer) etkileşimlerinin dinamiklerini düzenler. Histon modifikasyonları, sırasıyla yazarlar veya siliciler olarak adlandırılan çeşitli histon değiştirici enzimler tarafından aktif olarak eklenir veya çıkarılır. Transkripsiyonel düzenlemeyi organize etmek için, histon değiştirici enzimler, bölgeye özgü bir şekilde belirli değiştirici gruplarla spesifik amino asitlerin modifikasyonunu katalize eder. Histon modifikasyonları, ikame edilmiş grup tarafından sağlanan elektrostatik yükü değiştirerek kromatinin yapısal organizasyonunda önemli bir rol oynar ve farklı adaptör proteinler için bölgelerin tanınmasını kolaylaştırır (Wei YF vd. 2013). Promoter bölgesindeki transkripsiyon faktör komplekslerine DNA erişilebilirliğinin belirlenmesi ve oktamer çekirdeği ile DNA arasındaki temas, histon modifikasyonları ile düzenlenir (Lu J vd.2005).

2.5.4. Kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar)

Açık okuma çerçevesinin olmaması nedeniyle bir proteini kodlama yeteneği olmayan RNA, yaygın olarak kodlamayan RNA (ncRNA) olarak adlandırılır.

Ancak ncRNA'lar, genomik damgalama, X-kromozomu inaktivasyonu, transpozon, virüs susturma, gelişimsel tasarım ve farklılaşma gibi önemli işlevlere katılımlarının yanı sıra cis ve trans-'deki diğer genlerin ekspresyonunu da düzenler (Rao P vd. 2013). Genel olarak, ncRNA'ların işlevi, gen ekspresyonunun transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası düzenlenmesidir (Hitachi K vd. 2013). ncRNA'lar cis oluştururken aynı kromozom üzerindeki bir veya daha fazla genin ekspresyonunu düzenlerken, trans formu farklı kromozomlar üzerindeki bir veya daha fazla genin ekspresyonunu düzenler veya sitoplazmada olgun RNA'ları düzenler (Sang Q vd. 2013).

Genel olarak, ncRNA'lar uzunluklarına veya işlevlerine göre sınıflandırılır. Epigenetik ile ilişkili ncRNA'ların heterokromatin oluşumunda, histon modifikasyonunda, DNA metilasyon hedeflemesinde ve gen susturmada rol oynadığı bildirilmektedir. ncRNA'lar (i) kısa ncRNA'lar (<30 nts) mikroRNA'lar (miRNA'lar), kısa enterferans yapan RNA'lar (siRNA'lar) ve piwi etkileşimli RNA'lar (piRNA'lar) (ii) uzun ncRNA'lar (>200 nts) (Roth LW vd. 2014). miRNA'lar, DNA metilasyonu ile ilişkili bir geri besleme mekanizması bağlamında gerçekleştirilecek bölünme veya bozulmayı indüklemek veya translasyonu bloke etmek için belirli bir hedef

mRNA'ya bağlanırlar (Yang S vd. 2013). lncRNA'lar, kromatin modifiye edici enzimlerle bir kompleks oluşturarak ve genomdaki belirli bölgelere katalitik aktivitelerini kullanarak kromatin yeniden modellemesinde rol oynar, sonuçta kromatin organizasyonunu ve gen ekspresyonunu değiştirir. Ek olarak, lncRNA'lar transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası düzenlemede işlev görür ve siRNA'ların öncüsüdür (Kuang H vd. 2014).

Epigenetik, DNA dizisini değiştirmeden kromatinde gen ekspresyonunu ve genom stabilitesini etkileyen moleküler modifikasyonları ifade eder. Alternatif olarak epigenetik, DNA dizilerindeki değişiklikler dışındaki mekanizmaların neden olduğu fenotipteki değişiklikleri ifade eder. Epigenetik modifikasyonlar, genleri açıp kapatabilir ve hangi genlerin kopyalanacağını belirleyebilir. DNA'nın moleküler modifikasyonları (nükleotid dizisi değişmeden) veya DNA ile yakından ilişkili olan histonlar epigenetik değişiklikler olarak kabul edilir. Bu, gen ekspresyonunun epigenetik kontrolünden kaynaklanır, bu nedenle bir cilt hücresi, karaciğer, akciğer, beyin veya kas dokusu hücresinden farklıdır. Doku hücrelerinin tümü aynı genomu içerir, ancak genler farklı şekilde ifade edilir ("açık" veya "kapalı"), bu da farklı hücre fenotiplerini oluşturur. DNA metilasyonu aracılı epigenetik susturma, genleri kapatmanın bir yoludur ve farklı ifadeye katkıda bulunur. Susturma, kısmen, genetik ikizlerin neden fenotipik olarak aynı olmadığını da açıklayabilir. Böylece epigenetik değişiklikler yoluyla genlerin devre dışı bırakılmasının önemi kolaylıkla algılanabilmektedir (Ziru Jiang vd. 2017). Sperm ve yumurta hücrelerinde meydana gelen epigenetik değişikliklerin çoğu, “yeniden programlama” adı verilen bir süreçte, ikisi bir araya gelerek döllenmiş bir yumurta oluşturduğunda ortadan kalkar. Bu yeniden programlama, fetüsün hücrelerinin “sıfırdan başlamasına” ve kendi epigenetik değişikliklerini yapmasına izin verir (Luense LJ vd. 2019). Ancak ebeveynlerin sperm ve yumurta hücrelerinde meydana gelen epigenetik değişikliklerin bir kısmı yeniden programlama sürecinden kaçabilir ve onu bir sonraki nesle aktarabilir (Mallory AC vd. 2010). Epigenetik işaretlerin (örneğin, DNA metilasyonu, histon metilasyonu vb.) bir neslin kromatini üzerinde kazanılabildiği ve gametler (yani sperm ve yumurtalar) yoluyla bir sonraki nesile kararlı bir şekilde aktarıldığı bu tür olaylar, nesiller arası epigenetik miras olarak tanımlanır.

2.6. Germ Hücreleri Gelişiminin Epigenetik Düzenlenmesi

Testis ve yumurtalıkların gelişmesinde, sırasıyla erkek ve dişide sperm veya yumurta (oosit) üreten özel hücrelere germ hücreleri denir. Germ hücrelerinin gametlere farklılaşması (gametogenez) ve embriyoları oluşturmak üzere gametlerin yeniden birleşmesi (döllenme), epigenetik mekanizmalar tarafından düzenlenen gen ekspresyonundaki şiddetli değişikliklerin eşlik ettiği dramatik hücresel farklılaşma ile ilişkilidir (Weber JA vd. 2010). Erkek ve dişi germ hücreleri, memelilerde genomik damgalama sağlayan ebeveyn damgalarıyla farklı şekilde işaretlenir (Gilad S vd. 2008). Gelişim sırasında, germ hücrelerinin epigenetik profili dinamik olarak değişir ve zigotu destekleme kapasitesinin embriyo gelişimine katılımında rol oynar (Resnick KE vd. 2009). Primordiyal germ hücreleri (PGC'ler) germ hattının kurucu hücreleridir ve gametlerin embriyonik öncüleri olabilir. Gelişmekte olan gonadlara yer değiştirme sırasında, PGC'ler, ebeveyne özgü epigenetik bilgiyi yeniden birleştirmek için çok önemli bir olay olan ve cinsiyete özgü germ hattı gelişimi ve kimliğinin organizasyonu için önemli olan genom çapında yeniden programlamayı deneyimler (Marfella R vd. 2013). Bununla birlikte, epigenetik programlama, çeşitli faktörlerin değişmesine karşı hassastır. Değiştirilmiş epigenetik durumlar bir sonraki nesle aktarılabilir ve yavruların sağlığını ve gelişimini etkileyebilir, sağlık ve hastalığın gelişimsel kökenlerine katkıda bulunabilir (Zheng H vd. 2013).

2.7. IVF Ve Epigenetik

Epigenetik, DNA dizisinde değişiklik olmaksızın gen ekspresyonundaki kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanır (Yao N vd. 2010). DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, mikro-RNA'lar ve nükleozomlar etrafında DNA'nın daha yüksek sıralı paketlenmesi dahil epigenetik modifikasyonlar, embriyonik, fetal ve doğum sonrası gelişimde gerekli olan zamansal ve uzaysal gen ekspresyon modellerini etkileyebilir (Christenson LK. 2010). DNA metilasyonu, üzerinde en çok çalışılan epigenetik mekanizmadır. DNA demetilasyonu ifadeyi aktive ederken, gen ifadesini inhibe edebilir. Gametogenez ve erken preimplantasyon gelişimi sırasında iki DNA metilasyonu ve demetilasyonu dalgası vardır (Xu S vd. 2011). Bu nedenle, yumurtalık stimülasyonu, destekli döllenme ve IVF'de yer alan diğer *in vitro* manipülasyonlar, preimplantasyon embriyolarında DNA metilasyonunun sürdürülmesi ile gametlerde DNA metilasyonunun kurulmasını bozabilir (Ma L vd. 2007). Genomik damgalamanın bozulmasının, Beckwith-Wiedemann sendromu

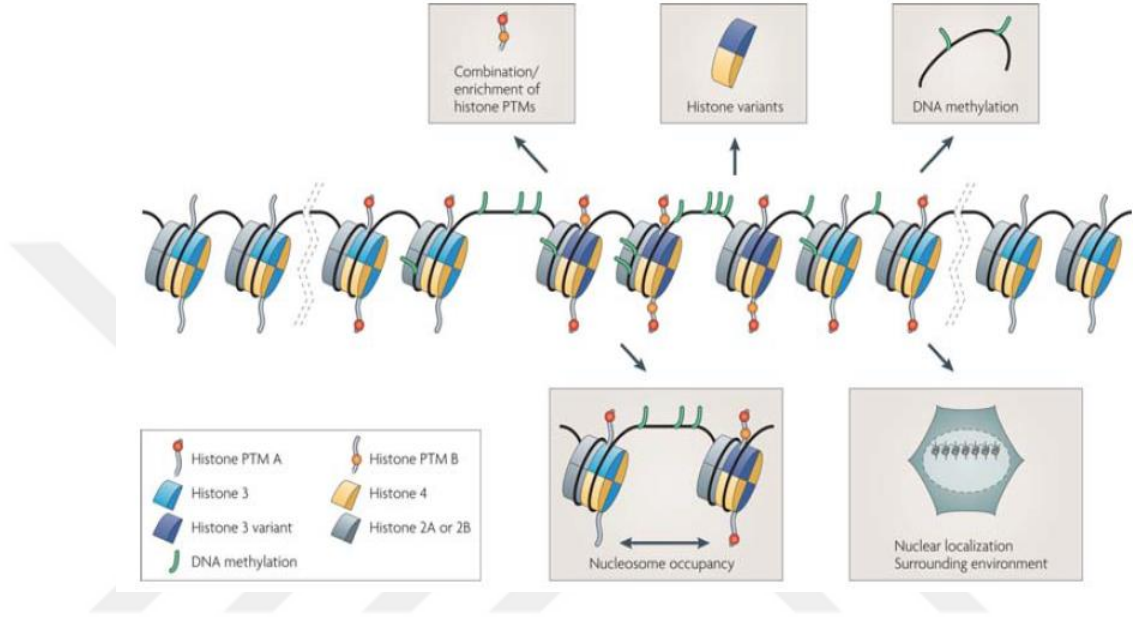
(BWS), Prader Willi sendromu ve Angelman sendromu (AS) gibi birkaç insan genetik sendromuna neden olduğu iyi bilinmektedir (Clark EA vd. 2000). Genel popülasyonda damgalama bozukluklarının insidansı çok düşüktür (15.000 yenidoğanda 1), %0.01'den azdır. Dolayısıyla, Asiste Üreme Teknolojileri (ART) tarafından tasarlanan yavrulardaki damgalama bozukluğu, sanıldığı kadar şiddetli değildir (Gillis AJ vd. 2007).

2.8. Kromatin Ve Epigenetik Mekanizmalar

Kromatin, DNA'nın hücre çekirdeği içinde paketleniği yapıdır. Kromatinin temel birimi, iki kopya histon H3, H4, H2A ve H2B içeren bir histon oktamersinin etrafına sarılmış 147 baz DNA çiftinden oluşan nükleozomdur. Nükleozomlar daha sonra daha yüksek dereceli kromatin yapılarına sıkıştırılır. Kromatin paketleme derecesi dinamik olarak düzenlenir ve heterokromatik (yoğun paketlenmiş kromatin, transkripsiyonel olarak bastırılmış) veya ökromatik (erişilebilir kromatin, transkripsiyonel olarak aktif) olabilir. Karmaşık bir epigenetik mekanizma ağı, kromatin durumunu ve dolayısıyla transkripsiyonu düzenlemek için çalışır (Şekil 2.2). En iyi çalışılan kromatin modifikasyonları, memelilerde CpG bölgelerinde meydana gelen DNA metilasyonu (Doerfler, 2008) ve Nterminal histon kuyruklarının modifikasyonudur. DNA'da, bir CG dimerinin sitozin üyesi, karbon 5'te metillendiğinde beşinci bir baz görevi görür. Yoğunluğa ve konuma bağlı olarak bu işaret, gen inaktivasyonu ve heterokromatin oluşumu ile ilişkilidir. Metillendikten sonra, 5metil CpG, S fazı sırasında kopyalanır. Bu nedenle, memelilerde metil gruplarının DNA'ya birikmesi, de novo (DNMT3) ve ağırlıklı olarak bakım (DNMT1) aktivitesi sergileyen iki DNA metiltransferaz ailesi (DNMT'ler) tarafından katalize edilir (Cheng ve Blumenthal, 2008), oysa hiçbir demetilaz tanımlanmamıştır. Histon kuyruklarının transkripsiyon sonrası modifikasyonları, metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon ve sumilasyonu içerir ve çok çeşitli enzimler tarafından biriktirilip uzaklaştırıldıkları için DNA metilasyonundan daha dinamik bir yapıya sahip oldukları düşünülür. Genellikle transkripsiyonun baskılanmasında yer alan DNA metilasyonunun aksine, histon kuyruk modifikasyonları hem baskılayıcı hem de aktive edici çok çeşitli işlevler sergiler ve genellikle tek bir gen seviyesinden büyük kromatin alanlarına kadar olan işlevsel durumu tanımlamak için yararlıdır. Histon işaretleri, etkilerini ya doğrudan kromatinin yapısını değiştirerek ya da transkripsiyon faktörleri ve ATP'ye bağlı kromatin yeniden modelleme kompleksleri

gibi kromatin bağlayıcı faktörlerin işe alınması yoluyla gösterir (A.P.A. van Montfoort vd. 2012).

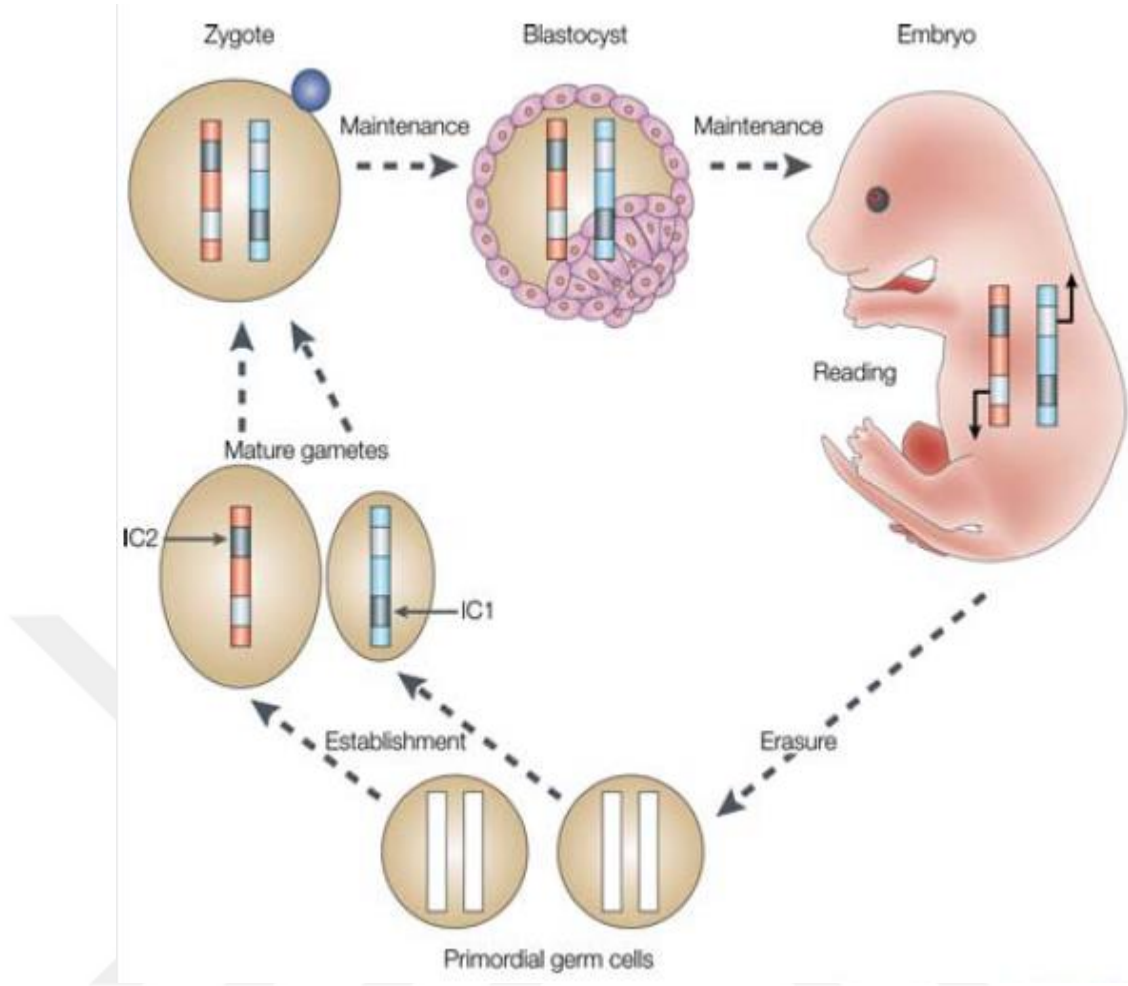
Histon varyantlarının dahil edilmesi ve çok çeşitli kodlama yapmayan uzun ve küçük RNA'ların kullanımı ile birlikte, bu modifikasyonlar, kromatin sıkıştırma, nükleozomal doluluk ve lokalizasyon gibi kromatin alanlarının yapısal yönlerini düzenlemek için çekirdeğin içinde karmaşık ve hassas bir ağda etkileşime girer.



Şekil 2.2. Bir Kromatin Alanının Özellikleri. Belirli bir kromatin alanını tanımlayan kovalent ve yapısal özelliklerin şematik gösterimi. Farklı katkıda bulunan faktörler gölgeli kutularda vurgulanmıştır. Kesikli çizgi, iki bitişik alan arasındaki bir ayrımı temsil eder. (Margueron ve Reinberg'den , 2010).

2.9. Genomik İmprinting

Genomik imprinting, genellikle kümeler halinde organize edilen anne veya babaya ait gen alellerini susturmak için çalışır. Genomik imprintinge tabi tutulan gen kümeleri/genler, bir imprinting kontrol bölgesi (ICR, ayrıca germ hattı farklı olarak metillenmiş bölge veya germ hattı imprint kontrol bölgesi olarak da adlandırılır) tarafından düzenlenir. Bir kümede, yalnızca baba alelinden eksprese edilen genler, yalnızca maternal alelden eksprese edilen genlerle birlikte var olabilir. Bununla birlikte imprint kontrol bölgesi iki germ hattından birinde CpG metilasyonu ile işaretlenir. Dolayısıyla metilasyon, cinsiyete özgü bir şekilde meydana gelir ve döllenme (fertilizasyon), embriyonik ve sonraki gelişim boyunca korunur. (Reem Sabry vd. 2019).



Şekil 2.3. Germ Hattında Damgalama (imprinting). Germ hücresi ve embriyonik gelişim sırasında baskı kontrol bölgelerinde metilasyon izlerinin silinmesi, oluşturulması ve sürdürülmesi. Baskı kontrol bölgeleri (IC1) ve IC2 örnek olarak gösterilmiştir. Gri, modifikasyonu belirtir ve beyaz, karşılık gelen alellerde değişiklik olmadığını gösterir. Ebeveyn kromozomları cinsiyetlerine göre mavi (erkek) veya kırmızı (dişi) olarak işaretlenir. Gelişmekte olan embriyodaki okuma oklarla gösterilmiştir. (Reik ve Walter (2001).

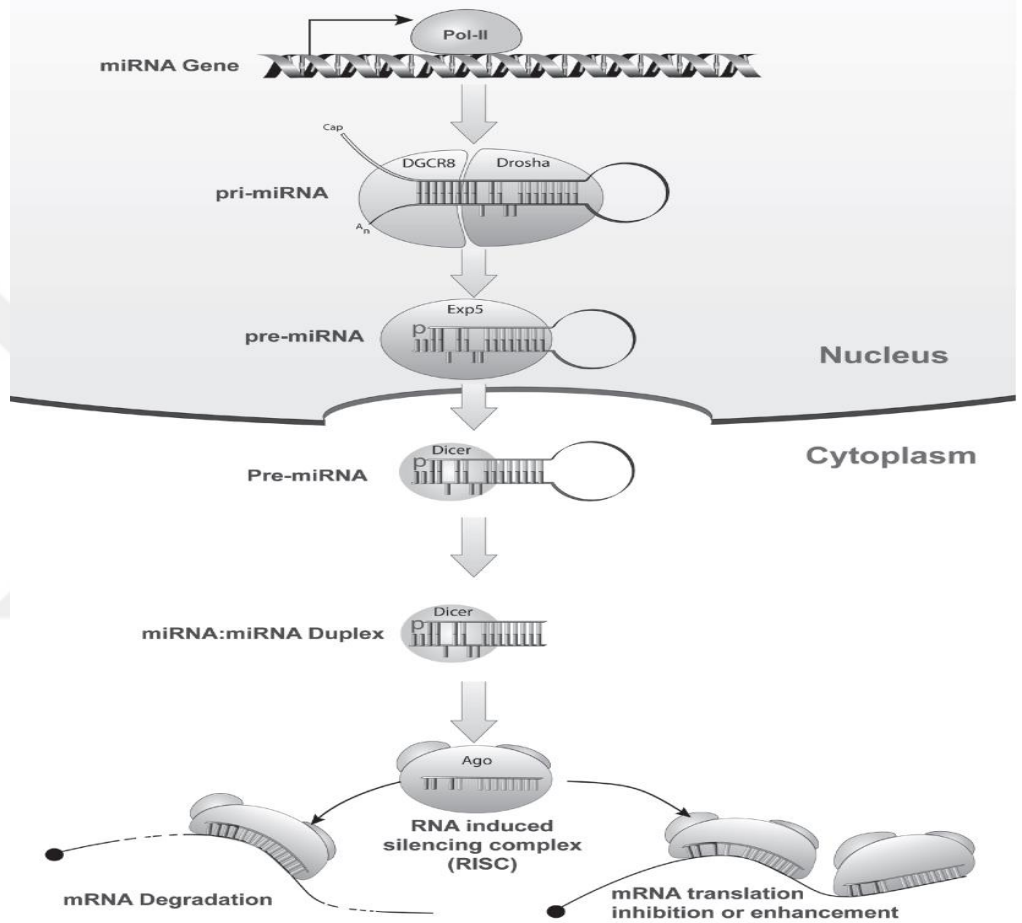
2.10. Mikro RNA'ların IVF Üzerindeki Etkisi

Transkripsiyon sonrası gen düzenlemesi, erkek ve dişi germ hücre fonksiyonunda hayati bir rol oynar, ancak somatik hücrelerdeki bu düzenleyici süreci ve bunun üreme dokusu gelişimi ve işlevi üzerindeki etkisini anlamamız hala tam olarak anlaşılamamıştır. Memeli hücrelerinde, mikroRNA (miRNA), transkripsiyon sonrası anahtar düzenleyicilerdir ve hedef mRNA'larının translasyonunu veya bozulmasını modüle ederek işlev görmektedirler. Olgun miRNA, stem loop (sap-ilmik) pre-miRNA'nın RNase III enzimi Dicer1 tarafından bölünmesiyle sonuçlanan çok adımlı bir süreçle sentezlenir. MiRNA düzenlemesinin kapsamını belirlemek ve bir temel oluşturmak için miRNA profili oluşturma, üreme dokuları ve hücreleri

içinde çok sayıda miRNA'nın varlığını göstermiştir. Ayrıca, birkaç çalışma üreme dokularındaki miRNA ekspresyonunun hipofiz ve gonadal hormonlara yanıt olarak değiştiğini göstermiştir (Reem Sabry vd. 2019). MikroRNA'lar (miRNA'lar) transkripsiyon sonrası gen regülasyonu, doku gelişimi ve farklılaşması sırasında önemli bir rol oynar. MikroRNA'lar, transkripsiyonel baskı veya bozunma yoluyla gen ekspresyon stabilitesini hedefler ve özellikle oosit olgunlaşması ve folikülogenez süreci olmak üzere üreme endokrin fonksiyonlarının kontrolünde önemli bir rol oynayabilir. MiRNA'ların son zamanlarda önemli transkripsiyonel gen düzenleyicileri olarak tanımlanması, transkripsiyonel gen düzenlemesinin organ işlevinde oynadığı role ilişkin bilgimizde bir patlamaya yol açmıştır. MikroRNA'lar, translasyonu etkilemek için hedef mRNA'nın 3' çevrilmemiş bölgesine bağlanan yaklaşık 21 nükleotid (nt) uzunluğundaki RNA molekülleridir. Genlerin %1 ila %5'inin miRNA'yı kodladığı ve mRNA'nın %30'una kadar ekspresyonunu düzenledikleri tahmin edilmektedir. MikroRNA'ların hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptoz dahil birçok biyolojik süreçte önemli roller oynadığı yapılan bir çok çalışmada gösterilmiştir (Reem Sabry vd. 2019).

MikroRNA genleri, genler arasında (yani, intergenik) ve genlerin intronları içinde bulunur ve birkaç durumda eksonlarda bulunur veya tüm intronu oluşturur. Sonuç olarak, miRNA ya bağımsız olarak (intergenik ve intronik) ya da bir intron veya ekson içinde bulunuyorlarsa bir mRNA ile art arda kopyalanabilir. İlk uzun birincil miRNA transkripti kapatılır (metil-7-GpppG) ve poliadenile edilir ve bu nedenle, transkripsiyona büyük olasılıkla polimeraz II veya III aracılık eder. Çekirdek içinde, birincil miRNA, RNA bağlayıcı protein, DiGeorge sendromu kritik bölge 8 tarafından bağlanır ve RNase III enzimi Drosha tarafından bir ~70-nt kök-ilmekli pre-miRNA oluşturmak üzere bölünür (Şekil 2.4.). Exportin 5 ile çekirdekten dışa aktarıldıktan sonra, pre-miRNA, bir geçici ~21-nt RNA duplesi oluşturmak üzere ikinci bir RNase III enzimi Dicer tarafından daha da bölünür. Dupleksin bir ipliği tercihen Dicer, transaktivasyon yanıt elemanı RNA bağlayıcı protein ve birkaç farklı argonaut proteinden oluşan büyük bir protein kompleksi olan RNA kaynaklı susturma kompleksine (RISC) yüklenir. RISC içinde miRNA, hedef mRNA transkriptinin 3' çevrilmemiş bölgesine, miRNA'nın 5' ucu ile mRNA, tohum dizisi adı verilen 7-8-nt bölgesi arasında neredeyse kesin hedef spesifikliğı ile bağlanır. Bu bağlanma, 80S ribozomlarının birleştirilmesini önleyen ökaryotik translasyon

başlatma faktörü 6 ile RISC etkileşimi yoluyla translasyonu bloke edebilir (Chendrimada ve diğerleri, 2007) veya başlatmadan sonra translasyonun inhibisyonu yoluyla bloke edilir. Bu nedenle miRNA'nın transkripsiyon sonrası gen düzenlemesini 3 yoldan 1'inde etkilediği gösterilmiştir: translasyon inhibisyonu, translasyon geliştirme ve mRNA bozulması. (Reem Sabry vd. 2019).

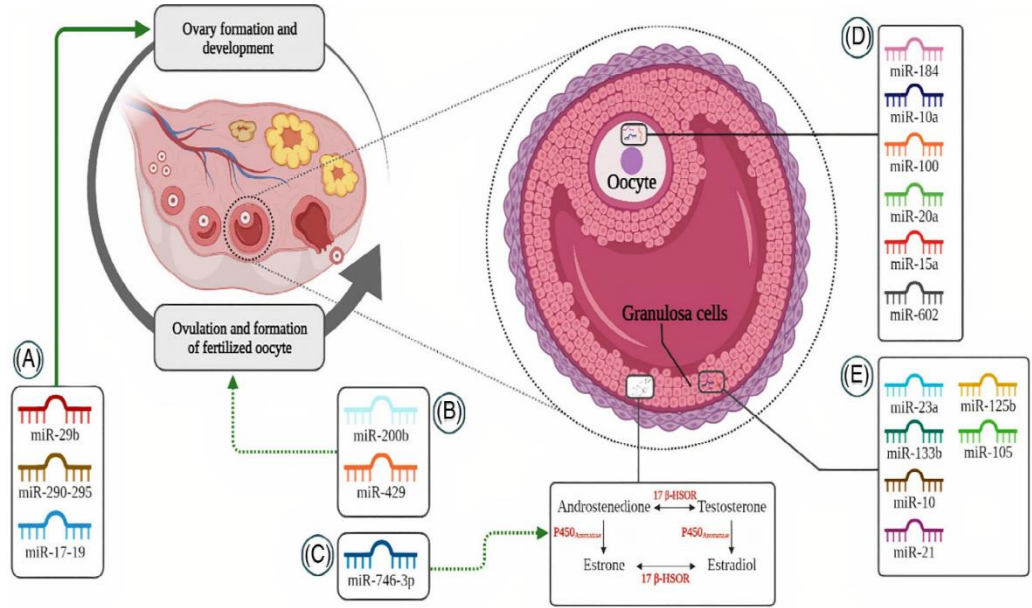


Şekil 2.4. MikroRNA (miRNA) Biyogenezi Ve Fonksiyonunun Çalışma Modeli. Çekirdek içinde miRNA, RNA polimeraz II (Pol-II) tarafından çift sarmallı bir birincil miRNA'ya (pri-miRNA) katlanan tek sarmallı RNA'ya kopyalanır. Primer-miRNA daha sonra hücre çekirdeğine DiGeorge sendromu kritik bölge geni 8 (DGCR8) tarafından bağlanır ve daha sonra prekürsör premiRNA'yı verecek şekilde Drosha tarafından bölünür. Pre-miRNA daha sonra çekirdekten exportin-5 (Exp5) yoluyla sitoplazmaya taşınır ve burada RNase III endonükleaz Dicer tarafından çift sarmallı bir miRNA'ya bölünürler. Çift sarmallı miRNA, biri parçalanmakta ve diğer sarmal, argonaute proteinlerle bir kompleks (Ago) oluşturarak, RNA indükleyen susturma kompleksini (RISC) oluşturan 2 tek sarmal olarak ayrılır. RISC daha sonra hedef mRNA'ya bağlanır ve bu da ya translasyon baskısına, translasyon geliştirmesine ya da transkript bozulmasına yol açar. (http://www.journalofanimalscience.org/content/87/14_suppl/E29)

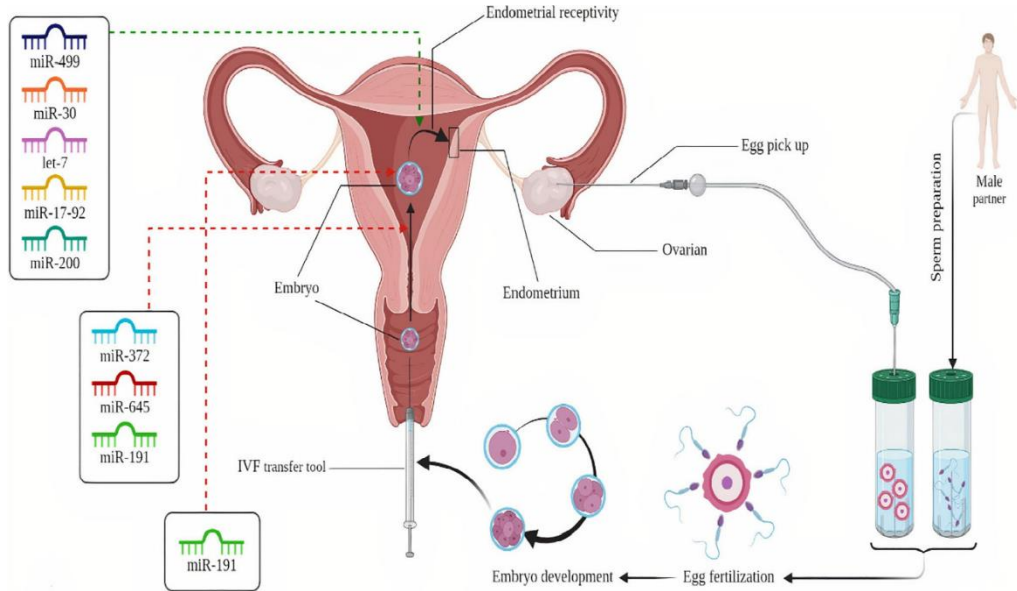
2.11. Kadın İnfertilitesinde Mikro RNA'ların Etkisi Ve Rolü

Doğurganlık, çiftlerin klinik gebelik elde etme yeteneği olarak tanımlanır. Bir çift herhangi bir koruma olmaksızın 1 yıl düzenli cinsel ilişkiye girdikten sonra hamile kalamazlarsa infertil olarak adlandırılırlar. Dünyadaki çiftlerin yaklaşık %17'si kısırlıktan muzdariptir. Kadın faktörleri kısırlık vakalarının yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır. Erken yumurtalık yetmezliği, polikistik over sendromu (PCOS) ve endometriozis gibi çeşitli hastalıklar kadınların doğurganlığını etkiler ve kısırlığa neden olabilir. Genetik faktörler muhtemelen kısırlığın nedenlerindendir. Ökaryotik hücrelerdeki genomun çoğu parçası protein dizilerine çevrilmez. Mikro RNA'lar (miRNA'lar), kodlamayan RNA'ların yaklaşık 18 ila 25 nükleoid dizisidir; bir proteini kodlamasalar da miRNA'lar gen ekspresyonunda önemli bir role sahiptir ve protein üretimindeki prosedürlerin yaklaşık %50'sini düzenlerler. Ayrıca miRNA'lar hücre büyümesi, sinyal iletimi, apoptoz ve patolojik süreç dahil olmak üzere hücredeki birçok fizyolojik süreci derinden etkiler. Ayrıca serum, plazma, idrar, foliküler sıvı ve beyin omurilik sıvısı gibi hücre dışı sıvılarda da bulunabilirler. Ayrıca, tarama ve prognoz bozukluklarında biyobelirteç olarak kullanılmak üzere farklı hücre durumları tarafından değiştirilirler (M. Z. Carletti vd. 2014).

miRNA'lar kadın genital sisteminin tüm hücrelerinde bulunmaktadır, bu nedenle miRNA'ların kusurları kadınların üreme yeteneğini etkileyebilir. Ayrıca adet döngüsünde uterus endometriyumunu düzenlerler. Ayrıca bir oosit ve çevresindeki somatik hücrelerde (granüloza ve tekal hücreler) bulunan folikülde, miRNA'ların granüloza hücrelerinin proliferasyonu, apoptozu, oosit olgunlaşması ve oositlerin apoptozunda önemli rolleri olduğuna dair kanıtlar yapılan bazı çalışmalarda bulunmuştur. Çalışmalar, fertil ve infertil kadınlarda miRNA ekspresyon miktarının farklı olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, farklı jinekolojik malignite türlerinde ve infertilite ile güçlü bir ilişkisi olan PCOS'lar, primer yumurtalık yetmezliği (POI) ve endometriozis gibi çeşitli kadın hastalıklarında miRNA düzensizliği gözlenmiştir. Ayrıca, implantasyon penceresini tanımlamak ve yardımcı üreme teknolojisi sonuçlarını iyileştirmek için miRNA'lar kullanılabilir.



Şekil 2.5. Yumurtalık Fonksiyonunun Modülasyonunda Anahtar miRNA'lar. (A) yumurtalık oluşumu ve gelişiminde rol oynayan miRNA'lar. (B) yumurtlama sürecini ve döllenmiş oosit oluşumunu düzenleyen miRNA'lar. (C) Granüloza hücrelerinde 17 β-estradil sentezinin modülasyonundan sorumlu olan miRNA. (D) oosit içinde bulunan miRNA'lar. (E) granüloza hücrelerinde ifade edilen miRNA'lar. Yeşil okun takviyeyi, kesikli okların ise düzenlemeyi gösterdiğine dikkat edilmelidir.(17 β-HSD, 17 beta hidroksisteroid oksidoredüktaz; miR, mikro RNA). (Cell Biochem Funct. 2021;39:955–969.)



Şekil 2.6. miRNA'lar ve IVF. Önceki araştırmalara dayanarak, bu şematik şekilde görebileceğiniz gibi, bir IVF prosedürünün farklı adımlarında bir grup miRNA yer almaktadır. Yeşil ok, karşılık gelen miRNA'ların ilgili işlemle pozitif olarak bağlantılı olduğunu gösterirken

kırmızı oklar, bahsedilen miRNA'lar ve belirli işlemler arasındaki olumsuz etkileşimleri gösterir (Aslında, miRNA-372 ve miR-645 IVF başarısızlığı ile ilişkilidir ve miRNA-191 hem IVF başarısızlığı hem de anöploidi embriyolarının oluşumu ile ilişkilidir). (Cell Biochem Funct. 2021;39:955–969.)

PCOS'ta GC'lerde miR-29a'nın aşağı regülasyonu: antral folikül (over içindeki primer folikül) ve estradiol üretimini artırır ve GC'lerin hücre döngüsü ilerlemesi, aromataz ekspresyonu olarak GC'lerin çoğalmasını arttırdığı bildirilmiştir.

Endometriozis hastalığının epigenetik doğasının miRNA'ların düzenlenmesine kadar uzandığını gösteren diferansiyel Let-7b metilasyonu yapılan çalışmalarda belirlenmiştir. (Dana A.Meixell ve ark, 2022). Let-7b düzenleyici bölgesinin metilasyonu, endometrioziste bu miRNA'nın azalmış seviyelerini açıklamaktadır ve kanserde Let-7b'nin düzenlenmesinde rol oynayan bölgelerden farklı olduğu saptanmıştır. Ekspresyonun azalmasına yol açan hastalığa özgü mekanizmaların anlaşılması, endometriozis etiyolojisinin daha iyi anlaşılmasına ve yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine olanak sağlayabilir.

Bizim çalışmamızda seçtiğimiz iki miRNA (let7-b ve miR29-a) infertiliteye sebep olan özellikle polikistik over sendromu (PCOS) ve endometriyozis üzerine etkileri olduğu da yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Hasta ve Kontrol Grubu Seçimi

Çalışmamıza, Samsun ve çevre illerde yaşayan, Ondokuz Mayıs Üniversitesi (OMÜ) Tıp Fakültesi, Kadın Doğum ve Hastalıkları Anabilim Dalında yapılan klinik değerlendirmeler sonucunda infertilite tanısı konan ve OMÜ tüp bebek merkezinde yardımcı üreme teknikleri uygulanan 60 infertil kadın dahil edildi, bu 60 kişilik grup daha sonra gebe kalıp başarılı olanlar (kontrol) ve gebe kalamayıp başarısız olanlar (hasta) olmak üzere ikiye ayrıldı.

Araştırmamız, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun (KAEEK) 14.11.2019 tarihli ve OMÜ KAEEK 2019/746 nolu etik kurul kararıyla onaylanmıştır. ilaveten, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından PYO.TIP.1904.21.002 proje numarası ile Doktora Tez Projesi olarak desteklenmiştir.

3.2. Power Analizi

Open Epi programı ile yapılmış olup, Güç=%80 alınarak yapılan güç analizinde herbir grupta bulunması gereken minimum birey sayısı $n=21$ olarak hesaplanmış ve her bir gruba en az $n=30$ birey olacak şekilde çalışmaya 60 kişinin alınmasına karar verilmiştir.

3.3. Periferik Kan Numunelerinin Toplanması

Örnekler 1 Aralık 2020 ile 31 Mart 2021 tarihleri arasında toplandı. Tüm katılımcılara çalışma hakkında bilgi, imza için bilgilendirilmiş onam formu, genel sağlık ve yaşam tarzı sorunları ile birlikte EDTA'lı tüpler içinde 2ml periferik kan örnekleri toplanmıştır. OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Genetik laboratuvarında RNA izolasyonu ve mikroRNA analiz ve ekspresyonu çalışmalarında istifade edilmek üzere alınan kan örnekleri -20°C 'de saklanmıştır.

3.4. Çalışmamızda Kullanılan Cihazlar

- Otoklav (Nüve OT 4060, Türkiye)

- Derin Dondurucu (Arçelik, Türkiye)
- Vorteks (Clifton Cyclone, İngiltere)
- Bidistile Su Üretim Cihazı
- Santrifüj (Nüve NF048, Türkiye)
- Mikrolaka spektrofotometre cihazı (Thermo Fisher, Multiskan Go)
- RNA sayacı: Nano-drop (Jenway Genova Nano, İngiltere)
- Kantitatif eş zamanlı PCR cihazı: Bio-Rad CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad, ABD)

3.5. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Materyaller

- %100'lük Etanol (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Kloroform (MERCK, Almanya)
- İsoopropanol alkol (Sigma-Aldrich, Almanya)
- TRİZOL (GENEzol™ Reagent)

3.6. Çalışmamızda Kullanılan Kitler

- cDNA sentez kiti: TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Litvanya)
- Revers transkripsiyon primerleri: TaqMan™ MicroRNA Assays (Applied Biosystems, ABD)
- qRT-PCR için endojen kontrol primer-prob: TaqMan® MicroRNA Assay RNU6B (Applied Biosystems, ABD)
- qRT-PCR primer-problar: TaqMan® MicroRNA Assay hsa-miR-29a 5p ve TaqMan® MicroRNA Assay hsa-miR-let7b-5p (Applied Biosystems, ABD)
- qRT-PCR Master Mix: TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems, ABD)
- İnsan Estradiol Receptor Alpha Elisa Kiti: Bioassay Technology Laboratory (BT LAB,Çin)
- İnsan DNA Methyl Transferas 3A Elisa Kiti: Bioassay Technology Laboratory (BT LAB,Çin)

3.7. Periferik Kandan RNA İzolasyonu

Trizol manuel RNA izolasyonu yöntemiyle daha önceden toplanan kan örneklerinden total RNA'nın izolasyon işlemi gerçekleştirildi. Çalışmaya başlamadan önce kullanılacak pipet uçları ve 1.5ml'lik ependorf tüpleri otoklavda steril edildi. Periferik kan numuneleri çalışma süreci başlamadan önce -20°C 'de muhafaza edilen dolaptan oda sıcaklığına getirilerek çözdürüldü.

Total RNA'nın izolasyonu periferik kan örneklerinden aşağıda belirtilen süreçte gerçekleştirildi:

1. Sterile edilmiş 1.5ml'lik bir mikro santrifüj tüpün içine 200µl tam kan örneği alındı.
2. Ependorf tüp içerisindeki kan örneği üzerine 700µl Trizol eklendi ve vorteks yapılarak homojenize edildi.
3. Oluşan homojen karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. Homojen karışım üzerine 140µl kloroform eklendi ve 20 saniye kuvvetlice vortekslendi.
5. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyon sonrasında, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de $12.000\times g$ 'de 15 dakika santrifüj yapıldı.
7. Santrifüj sonrası tüpte oluşan üst sıvı fazı yeni bir steril tüp içine aktarıldı.
8. Sıvı faz üzerine 350 µl isopropanol eklendi ve maksimum hızda vortekslendi.
9. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
10. İnkübasyon sonrasında, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de $12.000\times g$ 'de 10 dakika santrifüj yapıldı.
11. Süpernatant atıldı, dipte oluşan beyaz veya şeffaf pellet üzerine 700 µl, %75 etanol eklendi. Sonrası iyice pipetaj yapıldı.
12. $+4^{\circ}\text{C}$ 'de $7.500\times g$ 'de 5 dakika santrifüj yapıldı.
13. Süpernatant atıldı, ependorf tüpte dipte kalan RNA'lar oda sıcaklığında 10 15 dk bekleterek hafifçe kurutuldu. Üzerine 50 µl RNAase free su eklendi ve iyice pipetaj yapıldı.
14. Elde edilen RNA örneklerinin miktarı ve saflığı Nano-drop ile 260nm'de ölçüldü.

15. RNA örneği, sonraki işlemlere kadar -80°C 'de muhafaza edildi.

3.8. Revers Transkripsiyon ile cDNA Sentezi

Elde edilen total RNA içindeki miRNA örneklerinden, cDNA sentez kiti ile cDNA sentezi yapıldı. Aşağıdaki tabloda verildiği ters transkripsiyon PCR reaksiyon karışım verilerine dayanarak elde edilen miRNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. (toplam reaksiyon hacmi 15 μl)

Tablo 3.1. PCR Ters Transkripsiyon Reaksiyon Karışımı

Bileşenler Örnek Başına	Hacim (μl)
dNTP 10 mM	0.15 μl
(50U/ μl) MultiScribe™ Revers Transkriptaz	1 μl
Revers Transkripsiyon Buffer 10X	1.5 μl
RNase İnhibitör (20U/ μl)	0.19 μl
Nükleaz içermeyen su	4.16 μl
Toplam	7 μl

cDNA sentezi aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

1. Teste tabi tutulacak 5X RT primerler ve her bir RNA örneğinin çözündürülme işlemi buz üzerinde gerçekleştirildi.

2. Kullanmadan önce tüpleri hafifçe vorteksleyip daha sonra içerikleri dibe toplamak için çok kısa santrifüj yapıldı.

3. Her bir örnek için kit içerisindeki RT master mix'ten 7 μl alındı ve daha önceden hazırladığımız 5 μl RNA örneği ile karıştırıldı. Hafifçe karıştırdıktan sonra, kısa bir santrifüj yapılarak karışım tüpün dibinde toplandı.

4. Elde edilen toplamda 12 μl 'lik RT master mix artı RNA karışımına 3 μl 5X RT primer eklendi. Daha sonra tüplerin iyi bir şekilde karıştırılması için inversiyon metodu uygulandı ve karışım çok kısa süreliğine santrifüj yapılarak tüpün dibinde toplandı.

5. İnkübasyon işlemi için tüplere yaptığımız bu işlemlerden sonra 5 dakika boyunca buz üstünde uygulama yapıldı.

6. Sonraki aşamada tüpler PCR cihazı içine konularak aşağıdaki Tablo'da gösterilen PCR programı ile reaksiyonlar gerçekleştirildi.

7. PCR cihazı ile yapılan reaksiyon sonrasında elde edilen cDNA örnekleri, real time PCR (qRT-PCR) analiz işlemine tabi tutulana kadar -20°C 'de saklandı.

Tablo 3.2. PCR Ters transkripsiyon programı

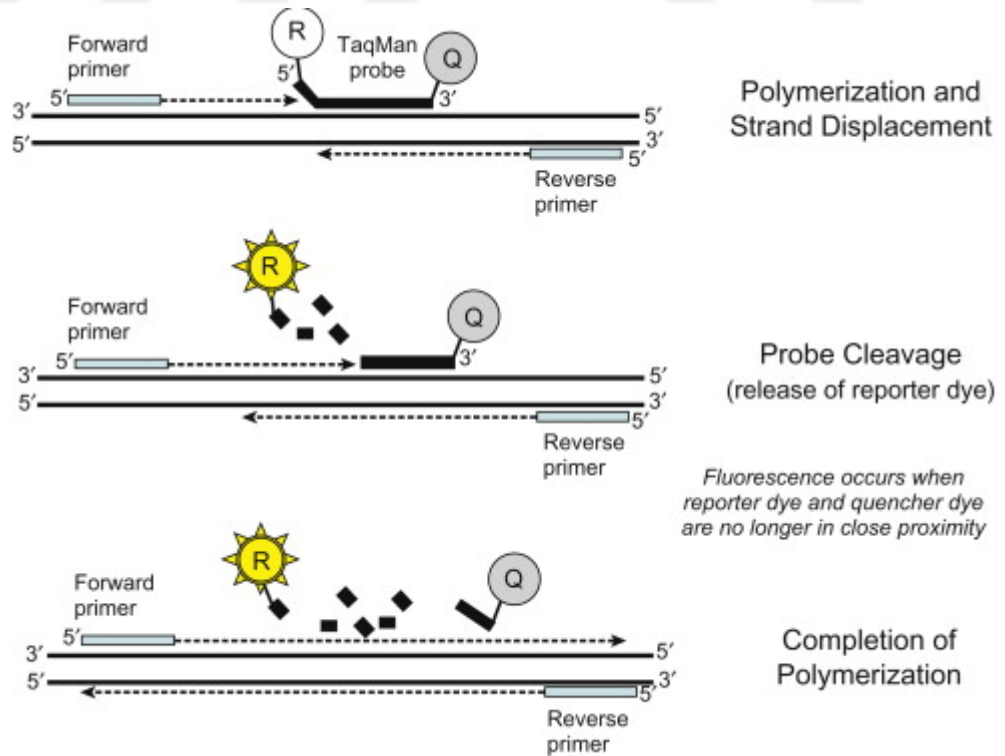
	Süre	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)
1	30 dakika	16
2	30 dakika	42
3	5 dakika	85
4	∞	

3.9. Real time PCR (qRT-PCR) Yöntemi İle Kantitatif Ölçüm

Gerçek zamanlı PCR'nin temel amacı, çok küçük bir miktar olsa bile bir numunedeki spesifik nükleik asit dizilerini kesin olarak ayırt etmek ve ölçmektir. Real-time PCR, bir numunedeki belirli bir hedef sekansı amplifiye eder, ardından floresan teknolojisini kullanarak amplifikasyon ilerlemesini izler. Amplifikasyon sırasında, floresan sinyalinin bir eşik seviyesine ne kadar hızlı ulaştığı, orijinal hedef sekansın miktarı ile bağıntılıdır ve böylece kantifikasyon mümkün olur. Ek olarak, nihai ürün, çift sarmallı ürünün ne zaman "eridiğini" belirlemek için artan sıcaklıklara tabi tutularak daha fazla karakterize edilebilir. Bu erime noktası, ürün uzunluğuna ve nükleotit bileşimine bağlı benzersiz bir özelliktir. Bu görevleri yerine getirmek için, geleneksel PCR, gerçek zamanlı PCR'ye dönüşmek üzere son teknoloji floresan kimyaları ve enstrümantasyonla birleştirilmiştir.(Mark A vd. 2008) Gerçek zamanlı PCR, floresan tabanlı teknoloji kullanılarak her bir amplifikasyon döngüsü sırasında üretilen ampikon miktarını ölçer. Gerçek zamanlı PCR, reaksiyonun uç noktasındaki ürün miktarını ölçmenin aksine, PCR reaksiyonunun üstel fazındaki

amplikon üretimini ölçebilir. Amplikon, "gerçek zamanlı" olarak veya üretilirken, amplifikasyon prosedürü sırasında floresan etiketli bir substrat ile biriken ürünü etiketleyerek ve saptayarak izlenir. Bu yöntemin, konvansiyonel PCR'ye göre, azaltılmış döngü sayısı nedeniyle artan hız, ürünlerin PCR sonrası jel elektroforez tespiti eksikliği ve amplikon tespiti için kullanılan floresan boyaların daha yüksek hassasiyeti dahil olmak üzere birçok avantajı vardır.(Dean F Vd.2014)

Bizim çalışmamızda özgül dizilere bağlanan iki-işaretli TaqMan prob yöntemi kullanılmıştır, bu yöntem en yüksek sinyal veren prob sistemidir. TaqMan proble, farklı dalga boylarında yayılan iki floresan boya ile etiketlenmiştir (Şekil 3.4). Prob sekansının, iki PCR primeri arasındaki ilgili DNA hedef bölgesinde spesifik olarak hibritlenmesi amaçlanır. "Reporter" (R) boyası prob dizisinin 5'-ucuna eklenirken, "söndürücü" (Q) boyası 3'-ucunda sentezlenir. Bu yöntemde öncelikle TaqMan proble bağlanır, primerler bir sonraki aşamada PCR'nin primer bağlanması evresinde bağlanır ve Taq polimeraz ile uzama gerçekleşir. Floresan ışımının açığa çıkması için Taq polimerazın 5'-ekzonükleaz aktivitesi ile proba bağlı florofor kesilir.



Şekil 3.1. Taqman Prob Sistemi.

3.9.1. Primerlerin Seçilme İşlemi

‘www.ncbi.nlm.nih.gov’ sitesinden iki mikro-RNA ile ilgili bilgiler (miR-let7b-5p ve miR-29a-5p) elde edildi. ‘http://www.mirbase.org’ veritabanı Mikro-RNA ile ilgili dizilerin belirlenmesinde kullanıldı. Aşağıdaki Tablo’da primer dizileri, mikro-RNA genleri ve mikro-RNA’lara ile ilgili bilgiler yer almıştır.

Tablo 3.3. miR-let7b-5p ve miR-29a-5p’ye ait tanımlar ve diziler

	miR-let7b-5p	miR-29a-5p
Gen Adı	miRlet7-b	miR29-a
Gen ID	46113686	130876747
Genomik Yerleşim	22q13.31	7q32.3
Ekzon Sayısı	1	1
miRBase ID	Hsa-miR-let7b-5p, MI0000063	Hsa-miR-29a-5p, MI0000087
miRBase Erişim Numarası	MIMAT0000063	MIMAT0004503
MikroRNA Dizisi	5'-UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU-3' 5'-ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCAG-3'	

3.9.2. Çalışmada Kullanılan İki Mikro RNA Hsa-miR-let7b-5p Ve Hsa-miR-29a-5p Ekspresyon Düzeylerinin Ölçülmesi

Hsa-miR-let7b-5p ve hsa-miR-29a-5p’nin real-time PCR (qRT-PCR) süreci için ‘TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-let7b-5p’ ve ‘TaqMan MicroRNA Assay hsa-miR-29a-5p’ ile ‘TaqMan Universal Master Mix II, no UNG’ kullanıldı. Kontrol endojen olarak ‘TaqMan MicroRNA Assay RNU6B’ iki miRNA ile karşılaştırma ve veri normalizasyonu için kullanıldı.

Real-time PCR (qRT-PCR) analiz süreci aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

1. En başta TaqMan MicroRNA Assay (20X) ve daha önceden hazırladığımız cDNA örnekleri buz üstünde çözündürüldü.

2. Kullanmadan önce ‘TaqMan Universal Master Mix II, şişesi nazıkçe karıştırıldı.

3. Reaksiyon sayıları cihazda kullanacağımız her bir assay için hesaplandı. Her bir reaksiyon iki tekrarlı olarak yapılmaya karar verildi.

4. Hazırlanan her bir plate de, cDNA örneklerinin her biri için, bir endojen kontrol assay, bir miRNA assay şeklinde hazırlandı.

5. Real-time PCR (qRT-PCR) reaksiyon toplamı 20µl hacim olacak şekilde hazırlandı.

6. Real-time PCR (qRT-PCR) reaksiyon karışımları, 1.5ml’lik mikro santrifüj tüplerinde her bir assay için ayrı ve steril olacak şekilde, Tablo’daki miktarlar ve bileşenlere göre hazırlandı. Tüpler kullanılmadan önce hafifçe karıştırıldı ve kısaca santrifüj işlemi yapıldı.

7. Mikro pipetler ile daha önceden hazırlanan cDNA örnekleri ve Real-time PCR (qRT-PCR) reaksiyon karışımı, her bir örnek için iki tekrar olacak şekilde 96-kuyucuklu plate içine aktarıldı.

8. Bütün işlemlerin sonunda hazırladığımız 96’lı plate, eş zamanlı PCR cihazına yüklendi.

9. Daha önceden ayarlanan programa göre Tablo’da verilen bilgilere dayanarak ısı döngü cihazı real-time PCR (qRT-PCR) ayarlandı ve reaksiyon gerçekleştirildi.

Bütün gerçekleşen işlemlerimiz ve miRNA’ların ekspresyon analizleri, KİTAM’da bulunan real-time PCR (qRT-PCR) (Bio-Rad CFX96™ Real-Time System) cihazı kullanılarak yapıldı. $\Delta\Delta CT$ metodu kullanılarak real-time PCR (qRT-PCR) yapıldıktan sonra miRNA ekspresyon düzeyleri, hedef miRNA’ların Ct değerlerinin endojen kontrolün Ct değerine normalize edilerek belirlendi. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ile gen ekspresyonundaki rölatif değişimler hesaplandı.

Tablo 3.4. Real-time PCR (qRT-PCR) reaksiyon karışımları

	Bileşenler	Bir reaksiyon için hacim (µl)
1	TaqMan MicroRNA Assay (20X)	1µl
2	cDNA	1,33µl

3	TaqMan Universal Master Mix II, with UNG	10µl
4	Nükleaz içermeyen su	7,67µl
5	Toplam hacim	20µl

Tablo 3.5. miR-let7b-5p ve miR-29a-5p ifade düzeylerinin ölçüldüğü Real-time PCR (qRT-PCR) programı

	Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre
1	UNG Aktivasyonu	50	2 dakika
2	Enzim Aktivasyonu	95	10 dakika
3	Denatürasyon	95	15 saniye
4	Bağlanma/Uzama	60	60 saniye 40 döngü

3.10. ELİSA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Enzime bağlı immünosorbent deneyi (ELISA), katı bir yüzeye bağlı antikorları veya antijenleri saptamak ve ölçmek için basit ve hızlı bir tekniktir. En hassas immün testlerden biri olan ELISA, laboratuvar araştırmalarında, hastalık biyobelirteçlerinin teşhisinde ve çeşitli endüstrilerde kalite kontrolünde ticari değer sunar. Bu teknik, yüzeye bağlı bir antijene bağlanan enzime bağlı bir antikor kullanır. Daha sonra, orijinal numunede bulunan antijen miktarıyla ilişkili bir renk değişikliği veya ışık sinyali üretmek için bir substrat eklenir. Bu bölüm, polistirenle immobilize edilmiş antijeni saptamak için birçok ELISA biçiminden biri olan dolaylı ELISA'yı gerçekleştirmek için gerekli prosedürleri sağlar. Otomasyon ve çoğullama için bir ön koşul olan bu tahlil tekniğini optimize etmeye yönelik metodolojik yaklaşımlar da açıklanmaktadır. Geleneksel olarak 96-kuyulu veya 384-kuyulu polistiren plakalarda uygulanan teknoloji, otomasyondaki artışla birlikte diğer platformlara da yayıldı. Antijen epitopuna ve spesifik antikoru mevcudiyetine bağlı olarak, ELISA kurulumunda farklılıklar vardır. Dört temel biçim, doğrudan, dolaylı, sandviç ve

rekabetçi ELISA'lardır. Direkt ELISA, bir antijen ve antijene özgü enzim konjuge antikor gerektiren en basit formattır.

Kullandığımız bu serum sandviç kiti, plazma, hücre kültürü süpernatantlarında insan estradiol reseptörü ve DNA Methyl Transferas3a, asitler, doku homojenatları veya diğer biyolojik sıvıların doğru kantitatif tespiti içindir. Kullandığımız kit bir enzim bağlantılı immünosorbent testidir (ELİSA). Kit içindeki plaka, insan ER α , DNMT3a antikoruna ile önceden kaplanmış. Ayrı ayrı olarak Numunede bulunan ER ve DNMT3a eklenir ve kuyucuklarda kaplanmış antikorlara bağlanır. Ardından biyotinlenmiş insan ER α ve DNMT3a antikoruna eklenir ve numunedeki ER α 'ya ve DNMT3a'ya bağlanır. daha sonra streptavidin-HRP eklenir ve biyotinlenmiş ER α ve DNMT3a antikoruna bağlanır. inkübasyondan sonra bağlanmamış streptavidin-HRP bir yıkama aşaması sırasında yıkanır. daha sonra substrat çözeltisi eklenir ve insan ER α ve DNMT3a miktarıyla orantılı olarak renk gelişir. reaksiyon asidik stop solüsyonu eklenerek sonlandırılır ve absorbans 450 nm'de ölçülür.

Alınan kan örneklerinden elde edilen plazmada ELİSA yöntemiyle miR29a hedef geni ile bağlantılı olarak insan DNA Metiltransferaz 3A ve miRlet7b hedef geni ile bağlantılı olarak insan Estradiol Reseptör Alfa düzeyleri incelenmiştir.

Bu çalışmada BT LAB (Bioassay Technology Laboratory) ELİSA kitleri kullanılmıştır.

3.10.1. Reaktif hazırlama

1. Tüm reaktifler kullanımdan önce oda sıcaklığına getirildi.

2. Standart, 24 ng/ml standart stok solüsyonu oluşturmak için 120 ml standardı (48 ng/ml) 120 ml standart seyreltici ile sulandırıldı. Seyreltme yapmadan önce standardın hafif çalkalama ile 15 dakika oturmasına izin verildi. 12 ng/ml, 6 ng/ml, 3 ng/ml ve 1.5 ng/ml çözeltiler üretmek için standart stok solüsyonunu (24 ng/ml) 1:2 standart seyreltici ile seri olarak seyrelterek çift standart noktalar hazırlandı. Standart seyreltici sıfır standart (0 ng/ml) olarak işlev görür. Kalan solüsyon -20 C'de donduruldu ve bir ay içinde tekrardan gerek görülmesi halinde hazır şekilde bekletildi. Önerilen standart çözeltilerin seyreltilmesi aşağıdaki gibi hazırlandı:

24 ng/ml	5 Nolu Standard	120 µl orijinal standard + 120µl seyreltici standard
12 ng/ml	4 Nolu Standard	120 µl 5 Nolu standard + 120µl seyreltici standard
6 ng/ml	3 Nolu Standard	120 µl 4 Nolu standard + 120µl seyreltici standard
3 ng/ml	2 Nolu Standard	120 µl 3 Nolu standard + 120µl seyreltici standard
1,5 ng/ml	1 Nolu Standard	120 µl 2 Nolu standard + 120µl seyreltici standard

Yıkama tamponu: 500 ml 1x yıkama tamponu elde etmek için 20 ml yıkama tamponu konsantresini 25x deiyonize veya damıtılmış distile su içinde seyreltildi. Eğer konsantrede kristaller oluşmuşsa, kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırıldı.

3.10.2. İşlem prosedürü

1. Tüm reaktifler, standart solüsyonlar ve numuneler talimatlara göre hazırlandı. kullanmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Uygulama oda sıcaklığında gerçekleştirildi

2. Uygulama için gereken strip (şerit) sayısını belirlendi. Karıştırıcıları kullanmak için çerçevelere yerleştirildi. kullanılmayan stripler 2-8 °C'de saklanıldı.

3. Standart kuyuya 50 µl standart eklendi. not: standart solüsyon biyotinlenmiş antikor içerdiğinden standart kuyuya antikor eklenmemesine dikkat edildi.

4. Numune kuyularına 40 µl numune eklendi ve ardından birinci plaka numune kuyularına 10 µl anti DNMT3A antikor ve ikinci plaka numune kuyularına 10 µL anti ER antikor eklendi, ardından numune kuyularına ve standart kuyulara 50 µl streptavidin-HRP eklenildi (kör kontrol kuyusu hariç). iyice karıştırıldı. Plakanın üzeri bir kapatıcı ile örtüldü. 37 c'de 60 dakika inkübe edildi

5. Kapatıcı çıkartıldı ve plakalar yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı. Kuyular en az 0,35 ml yıkama tamponu ile her yıkama için 30 saniye ila 1 dakika bekletildi. otomatik yıkama için, her kuyu aspire edildi veya boşaltıldı ve yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı. plakalar kağıt veya diğer emici malzeme üzerinde iyice kurutuldu.

6. Her kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu A eklenildi ve ardından her kuyucuğa 50 µl solüsyon B eklenildi. Yeni bir kapatıcı ile kaplanmış plakalar, karanlıkta 37°C'de 10 dakika inkübe edildi.

7. Her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenildikten sonra, mavi rengin hemen sarıya dönüştüğü gözlemlenildi.

8. Durdurma solüsyonunu ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropłaka okuyucu kullanılarak hemen her kuyunun optik yoğunluğu (OD değeri) belirlenildi.

Elde edilen bütün sonuçlar SPSS programında (Version.26) analiz edilmiştir. Çarpıklık ve basıklık değerlerine bakılarak grupların varyanslarının homojen olup olmadığı incelenmiştir. Shapiro-Wilk testi ile de gruplara ait verilerin normal dağılıma uyup uymadığı incelenmiştir. Bağımsız iki örneklem t testi homojen olduğu kabul edilen gruplar için uygulanmıştır. Mann-Whitney U testi ve Spearman's Korelasyon analizi farklı grupların parametrelerini karşılaştırmak için ve Regresyon analizi için kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi tüm testler için $p < 0,05$ olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. hsa-miR-let7b-5p ve hsa-miR-29a-5p ifade düzeyleri

Ondokuz Mayıs Üniversitesi hastanesi tüp bebek tedavi merkezine başvurmuş toplamda 60 infertilite hastanın tedavi işlemi uygulandıktan sonra başarılı olup gebe kalanlar ile (kontrol) başarısız olup gebe kalamayanlardan (hasta) izole edilen periferik kanlardan seçtiğimiz iki mikro RNA'nın (miR-let7b-5p ve miR-29a-5p) ekspresyon ve ifade düzeyleri verileri kantitatif eş zamanlı real-time PCR (qRT-PCR) yöntemi ile irdelenip tahlil edilmiştir. snoRNA-U6 (TaqMan MicroRNA Assay RNU6B) endojen kontrol olarak veri normalizasyonu için kullanıldı.

Tablo 4.1. Kontrol Ve Hasta Grupların Klinik Ve Demografik Özellikleri

Değişkenler		Kontrol	Hasta	P Değeri
Yaş		32.2 ± 5.7	34.2 ± 4.8	0,04
BMI (Kg/m²)		24.7 ± 2.8	27.4 ± 2.6	0,03
Döngü uzunluğu (Gün)		29.4 ± 1.7	28.2 ± 1.2	0,3
LH (mIU/mL)		12.84 ± 6.75	13.47 ± 7.33	0,6
FSH (mIU/mL)		6.20 ± 3.43	6.69 ± 3.23	0,5

Özellik		Kontrol	Hasta	P Değeri
Sigara Kullanımı	Tüketiyor	14	12	0,6
	Tüketmiyor	9	12	0,8
	Bırakmış	9	4	0,2
Alkol Tüketimi	Tüketiyor	5	8	0,4
	Tüketmiyor	22	18	0,7
	Bırakmış	5	2	0,5

Real-time PCR (qRT-PCR) yapıldıktan sonra, $\Delta\Delta CT$ (Delta-Delta CT) metodu kullanılarak miRNA ekspresyon düzeyleri, elde edilen endojen kontrolün Ct değerlerinin ışığında hedef miRNA'ların Ct (cycle threshold) değerlerine normalize edilerek belirlendi. Genlerin ifade edilmesi ve ekspresyonların'daki rölatif ve gözlemlenebilir değişimlere ise $2^{-\Delta\Delta CT}$ ile metodu ile hesaplandı.

Elde edilen bütün sonuçlar hipoteze uyup uymadıklarını belirlemek için SPSS uygulamasının 26'ncı sürümü istifade edilerek istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Basıklık ve çarpıklık testi ile gruplara ait verilerin normal dağılıma uyup uymadıkları incelendi. Grupların normal dağılım gösterdiği gözlemlendikten sonra bağımsız iki örneklem t testi uygulanıp uygulanmayacağının kontrolü için levene testi ile değişirliklerin (varyans) bağdaşık (homojen) olup olmadığı incelenmiş ve bağımsız iki örneklem t testi homojen olduğu kabul edilen gruplar için uygulanmıştır. Spearmans korelasyon ve Mann-whitney U testi analizi farklı grupların parametlerini karşılaştırmak için kullanıldı fakat anlamlı bir ilişki tespit edilemedi. istatistiksel olarak anlamlı kabul edilebilmesi için P değerinin 0.05'den küçük olması gereklidir.

Tablo 4.2. Normallik Testi

Shapiro-Wilk			
	İstatistik	df	Sig.
Başarılı Grubunun miR-Let7-b $2^{-\Delta\Delta Ct}$	0,974	32	0,467**
Başarısız Grubunun mir-Let7-b $2^{-\Delta\Delta Ct}$	0,969	28	0,681**
Başarılı Grubunun miR-29a $2^{-\Delta\Delta Ct}$	0,921	32	0,062**
Başarısız Grubunun mir-29a $2^{-\Delta\Delta Ct}$	0,957	28	0,298**

**0,05 'den büyük ise veriler normal ve homojendir

Shapiro wilk testi ile miR29a ve mirLet7b ekspresyon ve ifade edilme düzeylerinin homojen ve orantılı dağılıp dağılmadığı (sırasıyla: $P=0.146$: $P=0.278$) SPSS uygulaması ile belirlendi. Bağımsız iki örneklem t testi homojen olduğu gösterilen verilerin parametrelerle karşılaştırılması için uygulanmış ve her iki mikro RNA için anlamlı bulgular elde edilmiştir. ($p<0.05$).

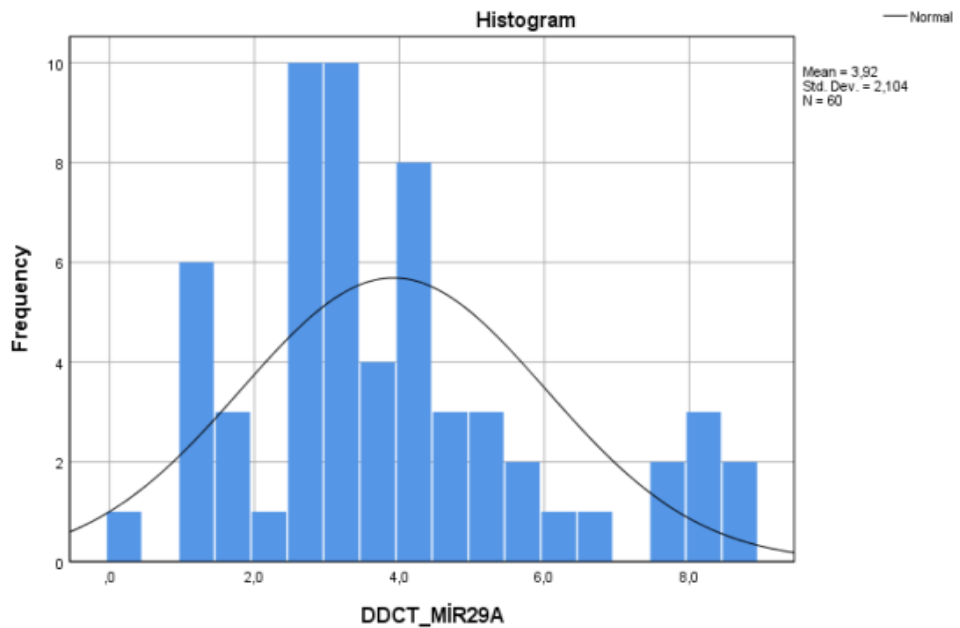
Ayrıca Skewness (çarpıklık) ve Kurtosis (basıklık) değeri de incelenmiştir (Tablo 4.4). Tabachnick ve Fidell (2013) 'e göre çarpıklık ve basıklık değeri $-1,5 < x < +1,5$ arasında ise veri normal dağılım göstermektedir.

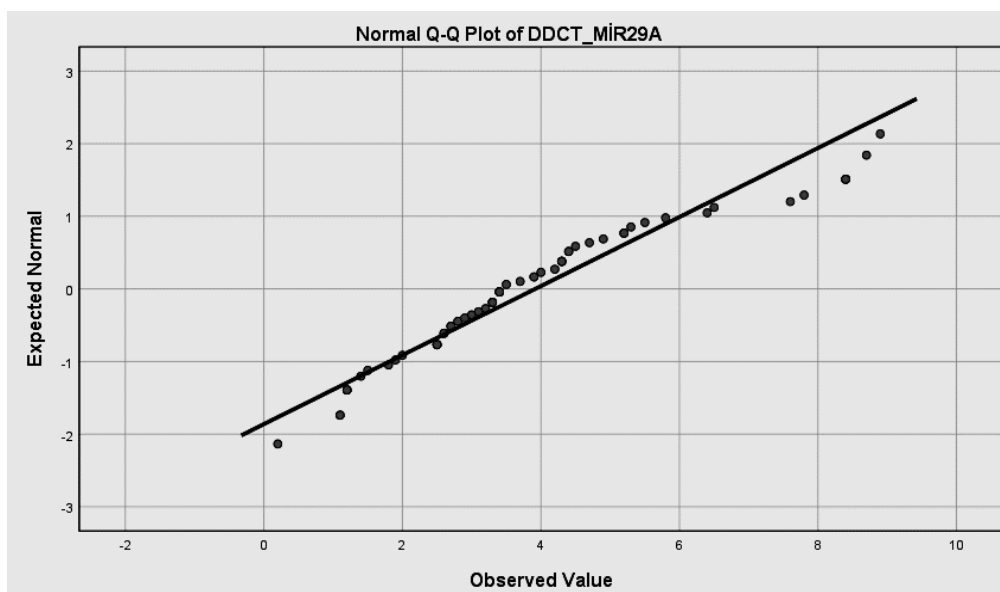
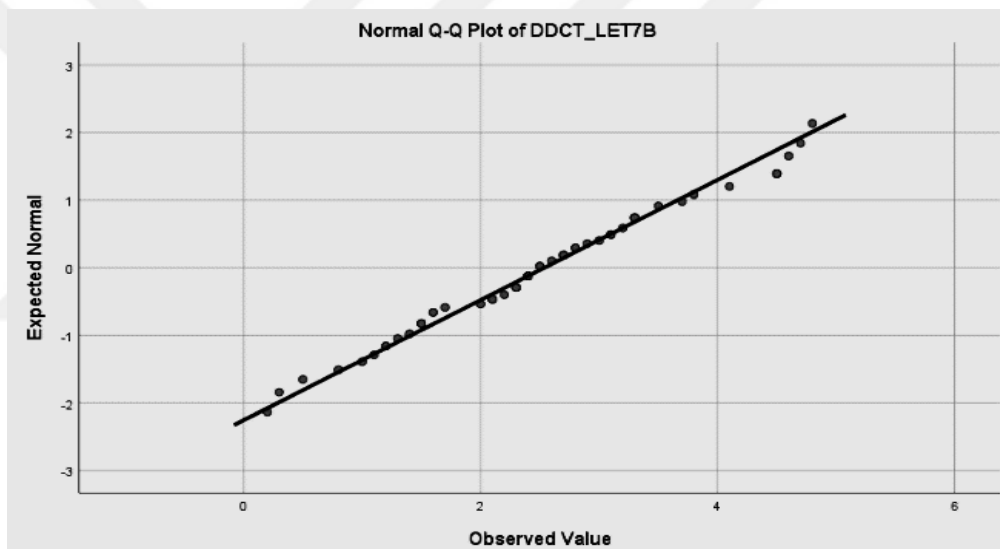
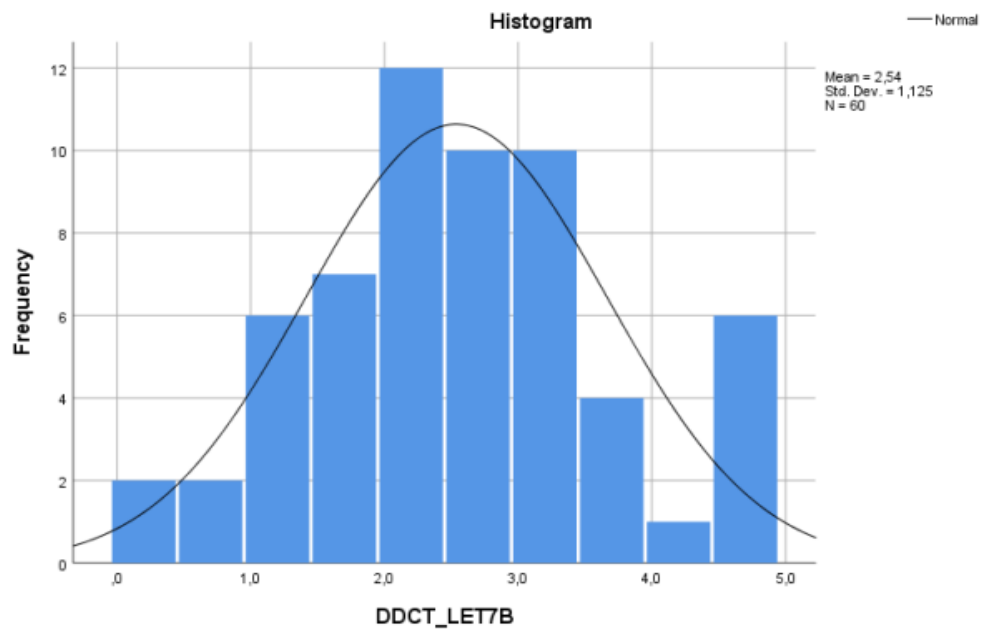
Tablo 4.3. Basıklık ve Çarpıklık Değeri

		İstatistik	Standart hata
Başarılı Grubun Let7-b $2^{-\Delta\Delta Ct}$	Çarpıklık	0,08	0,24
	Basıklık	0,3	0,58
Başarısız Grubun Let7-b $2^{-\Delta\Delta Ct}$	Çarpıklık	-0,4	0,43
	Basıklık	0,6	0,56
Başarılı Grubun miR29-a $2^{-\Delta\Delta Ct}$	Çarpıklık	0,8	0,53
	Basıklık	0,3	0,65
Başarısız Grubun miR29-a $2^{-\Delta\Delta Ct}$	Çarpıklık	0,2	0,23
	Basıklık	0,6	0,56

SS:Standart sapma

Şekil 4.1. Let7-b Ve miR29-a'ya ait $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin Histogram Ve Normalite Grafikleri





İki grup (kontrol-hasta) arasındaki hsa-miR-let7b-5p'nin ifade düzeyleri istatistiksel olarak bakılıp ve kıyaslandığında anlamlı bir fark bulundu ($p<0.011$). Başarılı gruptaki Toplam 32 hastanın 26'sında miR-let7b-5p'nin ifade düzeyinde azalma ve 6'sında miR-let7b-5p'nin ifade düzeyinde artış gözlemlendi. Başarısız grubunda toplam 28 hastanın 12'sinde miR-let7b-5p'nin ifade düzeyinde azalma ve 16'sında ise artış gözlemlenmiştir. Başarısız grubunda miR-let7b-5p'nin ifade düzeyinde maksimum 1.36 kat artış gözlemlendi.

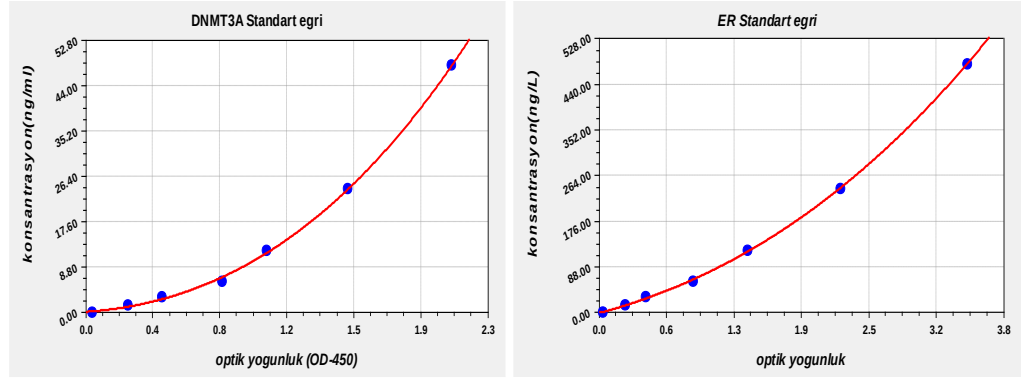
hsa-miR-29a-5p'nin iki grup arasındaki ifade düzeyleri farklılıkları istatistiksel olarak kıyaslandığında yine anlamlı bir fark bulundu ($p<0.021$). Başarılı gruptaki Toplam 32 hastanın 24'ünde miR-29a-5p'nin ifade düzeyinde artış ve 8'inde miR-29a-5p'nin ifade düzeyinde azalma gözlemlendi. Başarısız grubunda toplam 28 hastanın 8'inde miR-29a-5p'nin ifade düzeyinde artış ve 20'sinde azalma gözlemlenmiştir. Başarılı grubunda miR-let7b-5p'nin ifade düzeyinde maksimum 1.68 kat artış gözlemlendi.

Hsa-miR-Let7b ifade ve ekspresyon düzeylerine bakıldığında ve istatistiksel olarak kıyaslayıp bakıldığında gebe kalamayıp hasta grubunda olanların, gebe kalıp kontrol grubunda olanlara mukayese edildiğinde 1,31 kat artış gösterdiği ($p=0.03$) ve fark edilebilir bir oran ve miktar olduğu görülmüştür. Hsa-miR-29a ekspresyon ve ifade seviyeleri istatistiksel olarak bakılıp mukayese edildiğinde gebe kalıp kontrol grubunda olanların, gebe kalamayıp hasta grubunda olanlara mukayese edildiğinde 1,6 kat artış gösterdiği ($p=0.02$) ve anlamlı bir fark olduğu gözlemlenmiştir.

4.2. Serum DNMT3A Ve ER α Konsantrasyon Miktarının Belirlenmesi

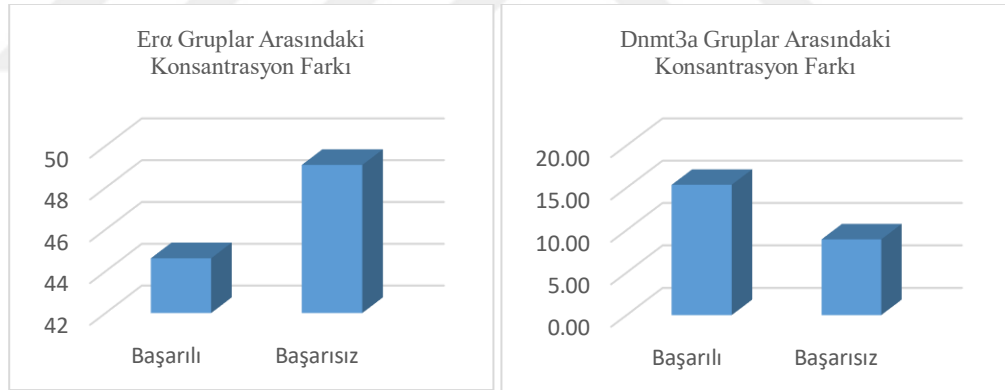
DNMT3A ve ER α ifade edilme ve serum konsantrasyon düzeyinin, IVF tedavisine başarılı olma etkisi Ondokuz Mayıs Üniversitesi hastanesinde yardımcı üreme teknikleri (IVF) uygulanan 60 gönüllü katılımcıdan alınan periferik kan numunelerindeki serum düzeylerine ELİSA tekniği kullanılarak ölçülüp ve bakıldı. Curve expert 1.4 programı ile serum konsantrasyonundaki rölatif değişimler tek tek bakılarak hesaplandı. Elde edilen bütün sonuçlar ve veriler ve bilgiler curve expert 1.4 programı ile incelenip ve analiz edildikten sonra her iki enzim için standart eğri oluşturuldu.

Şekil 4.2. DNMT3A Ve ER α 'ya Ait Standart eğri tabloları



Aşağıdaki tablolarda gösterildiği gibi curve expert 1.4 programı ile formülize edilip hesaplanmış verilerin ışığında her iki grup (kontrol ve hasta) arasındaki konsantrasyon farklılıkları ve ifade edilme oranlarındaki değişimler ortaya konulmuştur.

Şekil 4.3. Başarılı Ve Başarısız Gruplar Arasındaki DNMT3A Ve ER α Konsantrasyon Farkı



Elde ettiğimiz bütün sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi ve hipoteze uygunlukları SPSS 26.0 sürümü kullanılarak test edildi. Basıklık ve çarpıklık testi uygulayarak oluşturulan iki gruba ait bilgi ve verilerin normal dağılıma uyup uymadığı test edilip ve incelendi. Levene testi ile varyansların homojen olup olmadığı incelenmiş ve bağımsız iki örneklem t testi homojen olduğu kabul edilen gruplar için uygulanmıştır. Spearmans korelasyon analizi ve Mann-whitney U testi farklı grupların parametrelerini karşılaştırmak için kullanıldı ve gruplar arasında

anlamalı bir ilişki olduğu tespit edildi, genellikle P değerleri 0.05'den az ve küçük olan veriler istatistiksel olarak anlamlı ve manalı kabul edilmektedir.

Bağımsız iki örneklem ti testi ER α ve DNMT3A ifade düzeylerine uygulanmış ve anlamlı fark edilebilir sonuçlar elde edilmiştir. ($p<0.05$). Levene testi ile DNMT3A ve ER α ifade düzeylerine baktığımızda DNMT3A için P değeri 0.6, ER α için ise P değeri 0.1 olarak SPSS programı tarafından hesaplandı ve homojen dağılıp dağılmadığı belirlendi. Bağımsız iki örneklem t testi homojen olduğu gösterilip belirlenen verilerin parametrelerle karşılaştırılması için uygulanmış ve her iki serumun ekspresyonu ve ifade edilmesinde anlamlı bilgi ve sonuçlar elde edilmiştir ($p<0.05$). DNMT3A serum konsantrasyon ve ifade edilme düzeylerine istatistiksel olarak bakılıp mukayese edildiğinde kontrol grubunda olanların, hasta grubunda olanlara kıyasla 1.72 kat artış gösterdiğini ve anlamlı bir ayrım olduğunu gözlemleye bildik. ($p=0.04$). ER α ifade ve serum konsantrasyon miktarları istatistiksel olarak kıyaslanıp bakıldığında ise hasta grubunda olanların, kontrol grubunda olanlara kıyasla 1.1 kat artış gösterdiği ve anlamlı bir ayrım olduğu gözlemleye bildik. ($p=0.01$).

Vücut ve yaş kitle endeksi parametreleri arasındaki ilişkiler bakılıp incelendiğinde ise DNMT3A ve ER α serum konsantrasyon ve ifade düzeyleri, ER α adına her iki kriter için pozitif korelasyon ($r=0,508$) ($r=0,541$), ve DNMT3A adına yaş kriteri için ($r= -0,652$) negatif, Vücut kitle endeksi kriteri ($r=0,546$) için ise pozitif korelasyon olduğu saptandı ($p<0,05$).

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, infertilite yaşayan kadınların durumunun, bireyin genel sağlık faktörleri ve muayene sırasında tüp bebek tedavisi için gerekli fiziki şartlar ve hormonal düzeylerinin göz önüne alınarak, infertil kadınların Let7-b ve miR29-a ekspresyon düzeylerinin olası etkileri araştırıldı. Bununla birlikte DNMT3A ve ER α serum konsantrasyon düzeyleri de belirlendi.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi hastanesi tüp bebek tedavi merkezine başvurmuş infertil hastalar ve tedavi sonrası gebe kalıp başarılı olan grubun başarısız olan gruba kıyasla iki grup arasındaki let7-b ifade düzeyinde anlamlı bir fark olduğu ve başarılı olan grupta başarısız olan gruba kıyasla miR-Let7b'nin daha az ifade edildiği ve anlamlı ve fark edilebilir bir ayrım olduğu saptanmıştır ($P=0.03$). Aynı şekilde incelenen diğer mikro RNA (miR-29a) ifade düzeyinde de iki grup arasında farklı ifade düzeylerine sahip oldukları gözlemlenmiştir. Kontrol grubunda hasta grubuna kıyasla daha fazla ifade edildiği gözlemlenmiş ve ($p= 0.02$) bulunarak iki grup arasındaki ifade düzeyinde anlamlı bir fark olduğu açık bir şekilde gözlemlene bilmiştir. Daha sonra incelenen serum DNMT3A ve ER α ifade düzeylerinde de iki grup arasında anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. DNMT3A ifade miktarı kontrol grubunda hasta olan gruba kıyasla daha fazla ifade edildiği ve P değeri ($p=0,04$) bulunarak anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır. Ayrıca iki grup arasındaki ER α ifade düzeyini incelendiğinde yine iki grup arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir. ER α ifade düzeyi kontrol grubunda hasta grubuna kıyasla daha az ifade edildiği ve P değeri ($p=0.01$) bulunarak iki grup arasındaki ifade düzeylerinde anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra çalışma sırasında belirlediğimiz birkaç kriter arasında bulunan yaş ve vücut kitle endeksine ait parametreler arasındaki bağlantılar ve ilişkiler incelendiğinde, DNMT3A ve ER α serum konsantrasyon düzeyi, elde edilen veriler ışığında ER α için pozitif korelasyon ($r = 0,541$), ($r = 0,508$) ve DNMT3A için ise yaş kriterinde negatif ($r = -0,652$), vücut kitle endeksi kriterinden pozitif korelasyon ($r = 0,546$) göstermiştir, elde edilen bu veriler ışığında anlamlı korelasyon olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Sonuç olarak kişiselleştirilmiş bir IVF stratejisinin başarıya çok daha fazla bir oranda ulaşıp ve geliştirilmesine yönelik dolaşımdaki bu miRNA'ların, klinik gebelik başarı düzeyinin tahmin edilmesinde ve gelişmesinin daha fazla mümkün kılınmasında rolü olabileceği hipotezi her geçen gün daha da fazla düşünülmektedir.

Bu çalışma, IVF/ICSI prosedürü uygulanan hastalardan alınan periferik kanda dolaşan iki mikro RNA'nın (let-7b, miR-29a) ekspresyon profillerini araştırmıştır. Bu dolaşımdaki mikroRNA'lar, kadınların yumurtalık rezerv durumuna, gonadotropin tedavilerine ve/veya IVF sonuçlarına göre farklı şekilde ifade edildiği gözlemlenmiştir (J. M. Moreno vd. 2015).

Önceki çalışmalar, let-7b'nin memeli ve insan yumurtalıklarında granüloza ve kümülüs hücrelerinde eksprese edildiğini bildirmiştir (Qian Yang vd. 2018). Buna göre, PCOS'lu hastalarda gözlenen let-7b ekspresyonundaki anlamlı azalma, bu anormal folikülogenezi yansıtır olabilir (Qian Yang vd. 2018). Gerçekten de, let-7b'nin yumurtalık foliküler gelişiminde özel bir rol oynayabileceği bildirilmiştir. Spesifik olarak, let-7b, aktivin reseptörü I ve Smad2/3 genlerini hedefleyerek keçi yumurtalığında TGF- β sinyal yolunu düzenlediği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (E. Scalici vd. 2016).

Anormal östrojen reseptörü (ER) ekspresyonu, infertil hastalarda zayıf foliküler gelişime ve yumurtlama yetmezliğine de katkıda bulunabilir. MiRNA'ların erken embriyo gelişimindeki önemi birçok memeli türünde gösterilmiştir (E. Scalici vd. 2016). embriyo kalitesine göre periferik kan örneklerinde let-7b'nin anlamlı farklı ekspresyonunu gözlemlememesine rağmen, periferik kandaki let-7b seviyesinin embriyo gelişim potansiyeli ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu yapılan çalışmalarda bulunmuştur (Qian Yang vd. 2018).

Aslında, periferik kan'daki let-7b seviyeleri önemli ölçüde blastokist oluşumunu ve genişlemesinin öngörüldüğü yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (J. M. Moreno vd. 2015). Let-7b'nin *Caenorhabditis elegans*'ta gelişimsel zamanlamayı düzenleyebileceği daha önce yapılan bir çalışmada gösterilmişti (Tal Imbar vd. 2015). Bu nedenle, periferik kandaki let-7b ekspresyonunun değerlendirilmesi, IVF sırasında en iyi embriyo kültürü stratejisini tanımlamak için yararlı olabileceği düşünülmektedir (Qian Yang vd. 2018).

Ek olarak, periferik kandaki miR-29a seviyeleri, yapılan bir çalışma grubundaki en kaliteli embriyo oranına kıyasla daha yüksek hassasiyetle (%83,3) klinik gebelik sonucunu önemli ölçüde öngördüğünü göstermiştir (E. Scalici vd. 2016). Yapılan bir diğer çalışmada MiR-29a, embriyo implantasyonu sırasında sıçan uterusunda yüksek oranda eksprese edildiği ve ekspresyonu, blastosist aktivasyonu

ve uterus desidualizasyonu ile düzenlendiği ortaya konulmuştur (Reem Sabry vd. 2019).

İlginç bir şekilde, miR-29a ekspresyonu, hem foliküler hem de endometriyal tarafta hareket ederek gebelik sonucunu etkileyebilir, bu da uygun foliküler ve endometrial ortamların gebe kalmak için gerekli olduğu hipotezini destekler (E. Scalici vd. 2016).

Yapılan bir diğer çalışmada MII oositlerinde yukarı regüle edilen birkaç DNA metiltransferazın (DNMT'ler) miR29a tarafından hedeflendiğini gösterilmiştir (Reem Sabry vd. 2019).

Ayrıca, DNMT ekspresyonunun miR29a'ya bağımlı regülasyonunun değiştirilmesi, oositlerde anormal DNA metilasyonuna yol açan temel moleküler olaylardan biri olduğu ve üreme potansiyelinde bir azalma ile ilişkilendirildiği yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (Qian Yang vd. 2018). Yapılan aynı çalışmada ayrıca miR29a'nın karışık işlevlere sahip genleri hedefleyebileceğini göstermektedir (M Farsimadan vd. 2021). Örneğin, miR29a'nın hem anti-apoptotik (BCL2 ve MCL1) hem de pro-apoptotik (CASP7) genleri hedeflediği görüldü, bu da yumurtalık yetmezliğine yol açabilecek patolojik durumlarda rol oynayabileceğini düşündürüyor (Reem Sabry vd. 2019).

Sonuç olarak, insan periferik kan örneklerinde miRNA ekspresyon profili, infertil kadınları etkili bir şekilde ayırt etmek ve blastosist gelişimini ve klinik gebelik sonuçlarını tahmin etmek için biyobelirteçler sağlayabilir. Bununla birlikte, oosit mikro ortamındaki spesifik rolleri, gonadotropinler tarafından düzenlenmesi ve kadın kısırlığına katılımları daha fazla araştırılmalıdır. Bu yeni potansiyel biyobelirteçler, kişiselleştirilmiş IVF stratejilerini geliştirmek ve kadın kısırlığı yönetiminde yeni terapötik hedefler belirlemek için günlük uygulamada kullanılabilir.

6. SONUÇ

Araştırmamızda OMÜ hastanesi tüp bebek merkezine başvurmuş toplamda 60 gönüllü infertil hastanın ve tedavi sonrası gebe kalma durumuna göre başarılı veya başarısız olanların miR_let7b, miR-29a ve serum DNMT3A, ER α etkileri incelenmiş ve iki grup arasındaki ifade düzeylerinde anlamlı farklılıklar olduğu gözlemlenmiştir. İki grup arasındaki Let7b ifade düzeyine baktığımızda başarılı (kontrol) grupta başarısız (hasta) olan gruba kıyasla daha az miktarda ifade edildiğini, miR29a ekspresyon ve ifade edilme düzeyinde ise başarılı (kontrol) grupta başarısız (hasta) olan gruba kıyasla daha fazla eksprese ve ifade edildiğini gözlemleye bildik. Elde edilen sonuçlara bakıldığında kişiselleştirilmiş bir IVF stratejisinin geliştirilmesine yönelik dolaşımdaki bu her iki miRNA'nın, klinik gebelik olasılığını ve başarısının tahmin edilebilmesinde potansiyel ve muhtemel bir rolü olabileceği düşünülmekte ve IVF sürecinin zorluğu ve karmaşıklığına bakıldığında özelleştirilmiş tıbbi bakımı daha da fazla kolaylaştırılması, taze ve faydalı biyobelirteçlerin sağlanabileceği düşüncesi oluşmuştur.

Ayrıca araştırmamızın diğer bölümünde her iki mikro RNA ile bağlantılı olan iki hormon düzeyinin (DNMT3A Ve ER α) başarılı (kontrol) ve başarısız (hasta) olan grup verileri kıyaslanıp bakıldığında, ekspresyon ve ifade miktarlarındaki anlamlı ve ciddi farklılıklar her iki grup arasında görülmüştür.

ER- α prognostik öneme sahip olduğundan bu hormonun ifade düzeyi ve ekspresyonu açıklanamayan infertilite ile bağlı önemini açık bir şekilde göstermiştir ve ayrıca her iki grup arasındaki farklı ifade düzeylerine bakıldığında ifade miktarı başarısız olan grupta başarılı olan grupla mukayesede artış göstermiştir. Endometriyal ER- α ekspresyonundaki artış veya azalma ve buna bağlı olarak ifade düzeyindeki herhangi bir bozulma, rahim alıcılığında kusurlara yol açan ve açıklanamayan infertilite veya kısırlığa etken çalışmalarda, elde edilen mevcut verilere dayanarak katkıda bulunabileceği gösterilmiştir.

Yapılan diğer çalışmalarda implantasyon üzerinde etkili olabileceği düşünülen DNMT3A iki grup arasındaki ifade düzeyi farklılıklarına bakıldığında ise başarısız (hasta) grupta başarılı (kontrol) grubuna kıyasla düşüş gösterdiği, yalnız elde edilen bilgilerin infertil hastalara tam olarak nasıl bir etkiye sahip olduğunu anlaya bilmek

ve daha açıklayıcı olabilmesi adına bu konuyla ilgili daha fazla detaylı çalışmalar yapılması öngörülmektedir.

Bu çalışma, infertil hastalarda miR-Let7b, miR-29a, serum DNMT3A ve ER α tedavi sonrası ifade düzeylerini ve olası etkilerini araştırıldığı ve literatüre katkıda bulunabileceğini düşündüğümüz ülkemizde ve karadeniz bölgesinde yapılan ilk çalışmadır.

Sonuç olarak implantasyon sırasında yer alan bütün etken biyobelirteçlerin ve embryo implantasyonu sürecinde endometriumun geçici olarak uygun hale gelmesi, (endometriyal reseptivitedeki) o an oluşan bütün durumları, ilişkileri ve bağlantıları yöneten bütün mekanizmaların en iyi ve açık şekilde anlaşılması, açıklanamayan infertilite için yeni tedavi edici (terapötik) stratejilerin oluşması ve bu konuyla alakalı yapılacak bütün çalışmaların katkı sağlayabileceği ve çok daha açıklanabilir olacağı düşüncesini her geçen gün daha da güçlendirmektedir.

KAYNAKLAR

- A.p.a. van Montfoort, L.l.p. Hanssen, P. de Sutter, S. Viville, J.p.m. Geraedts, P. de Boer, (2012), Assisted reproduction treatment and epigenetic inheritance, Human Reproduction Update, Volume 18, Issue 2, March/April 2012, Pages 171–197.
- A. Portela and M. Esteller, (2010), "Epigenetic modifications and human disease". Nat Biotechnol, 28(10), 1057–68.
- A. Sadakierska-Chudy and M. Filip, (2015), "A comprehensive view of the epigenetic landscape. Part II: Histone post-translational modification, nucleosome level, and chromatin regulation by ncRNAs". Neurotox Res, 27(2), 172–97.
- Ayşe Güler Okayay, Mehmet Aslan, Abdullah Taşkın, Sahbettin Selek, Günseli Cengiz Altın, Semra Kahraman, (2014), "Oxidative Stress Markers in IVF Patients and Their Association with Pregnancy Results", Türkiye Klinikleri J Med Sci 2014;34(2).
- Buttler EA Pires, LC Padilha, PPM Teixeira, M Apparício, TF Motheo, PAP Savi, EYO Nakaghi, AE Alves, WRR Vicente, (2013), "In vitro Maturation of Oocytes from Santa Ines Ewes Subjected to Consecutive Sessions of Follicular Aspiration by Laparoscopy", Reprod Dom Anim49, 243–248.
- Borchert Glen M, William Lanier & Beverly L Davidson, (2006), RNA polymerase III transcribes human microRNAs, Nature Structural & Molecular Biology volume 13, pages 1097–1101.
- Bora Cengiz; Laxmi Baxi, (2001), Congenital Cataract in Triplet Pregnancy after IVF with Frozen Embryos: Prenatal Diagnosis and Management, Fetal Diagn Ther 16 (4): 234–236.
- Carletti M. Z, L. K. Christenson Author Notes, (2009), "MicroRNA in the ovary and female reproductive tract", Journal of Animal Science, Volume 87, Issue suppl_14, April 2009, Pages E29–E38.
- C. C. Chen, K. Y. Wang and C. K. Shen, (2013), "DNA 5-methylcytosine demethylation activities of the mammalian DNA methyltransferases". J Biol Chem, 288(13), 9084–91.
- C. W. Hanna and G. Kelsey, (2014), "The specification of imprints in mammals". Heredity (Edinb), 113(2), 176–83.
- Deaton AM, Bird A. (2011) "CpG islands and the regulation of transcription". Genes & Dev. 2011;25(10):1010–22.
- E. R. Gibney and C. M. Nolan, (2010), "Epigenetics and gene expression". Heredity (Edinb), 105(1), 4–13.
- E. Scalici, S. Traver, T. Mullet, N. Molinari, A. Ferrières, C. Brunet, S. Belloc & S. Hamamah, (2016), "Circulating microRNAs in follicular fluid, powerful tools to explore in vitro fertilization process", Scientific Reports volume 6, Article number: 24976.
- F. Chedin, M. R. Lieber and C. L. Hsieh, (2002), "The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a". Proc Natl Acad Sci U S A, 99(26), 16916–21.
- Federica Zachhini, Silvestre Sampino, Adrian M. Stankiewicz, Thomas Haf and Grazyna E. Ptak, (2019), "Assessing the epigenetic risks of assisted reproductive technologies: a way forward", Int. J. Dev. Biol. 63: 217-222.
- H. T. Bjornsson, M. D. Fallin and A. P. Feinberg, (2004), "An integrated epigenetic and genetic approach to common human disease". Trends Genet, 20(8), 350–8.

- H. Wu and Y. Zhang, (2014), "Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions". *Cell*, 156(1–2), 45–68.
- H. Wu and Y. Zhang, (2011), "Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation". *Genes Dev*, 25(23), 2436–52.
- Irma Virant-Klun, Anders Ståhlberg, Mikael Kubista, and Thomas Skutella, (2016), "MicroRNAs: From Female Fertility, Germ Cells, and Stem Cells to Cancer in Humans", Hindawi Publishing Corporation *Stem Cells International* Volume 2016, Article ID 3984937, 17 pages.
- Juan Manuel Moreno, Ph.D., María Jose Nuñez, M.D., Alicia Quiñero, Sebastian Martínez, Marina de la Orden, Ph.D., Carlos Simon, M.D., Antonio Pellicer, M.D., Cesar Díaz-García, M.D., and Francisco Domínguez, Ph.D, (2015), "Follicular fluid and mural granulosa cells microRNA profiles vary in in vitro fertilization patients depending on their age and oocyte maturation stage", *Fertility and Sterility®* Vol. 104, No. 4, 0015-0282.
- J. B. Stanford, T. A. Parnell and P. C. Boyle, (2008) "Outcomes from treatment of infertility with natural procreative technology in an Irish general practice". *J Am Board Fam Med*, 21(5), 375–84.
- J. L. Rinn and H. Y. Chang, (2012), "Genome regulation by long noncoding RNAs". *Annu Rev Biochem*, 81, 145–66.
- K. C. Wang and H. Y. Chang, (2011), "Molecular mechanisms of long noncoding RNAs". *Mol Cell*, 43(6), 904–14.
- K. Rull, L. Nagirnaja and M. Laan, (2012), "Genetics of recurrent miscarriage: challenges, current knowledge, future directions". *Front Genet*, 3, 34.
- Laxmidhar Das, Sabnam Parbin, Nibedita Pradhan, Chahat Kausar, Samir K Patra, (2017), "Epigenetics of reproductive infertility", *Frontiers In Bioscience, Scholar*, 9, 509-535.
- L. Liu, Y. Li and T. O. Tollefsbol, (2008), "Geneenvironment interactions and epigenetic basis of human diseases". *Curr Issues Mol Biol*, 10(1–2), 25–36.
- Margareta D. Pisarska, Jessica L. Chan, Kate Lawrenson, Tania L. Gonzalez, and Erica T. Wang, (2019), "Genetics and Epigenetics of Infertility and Treatments on Outcomes", *J Clin Endocrinol Metab*, 104(6):1871–1886.
- M Farsimadan, M Ismail Haje, C Khudhur Mawlood, I Arabipour, A Emamvirdizadeh, S Takamoli, M Masumi & H Vaziri, (2021), "MicroRNA variants in endometriosis and its severity", *British Journal of Biomedical Science*, 78:4, 206-210.
- M. U. Kaikkonen, M. T. Lam and C. K. Glass, (2011), "Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics". *Cardiovasc Res*, 90(3), 430–40.
- M. V. Koerner, F. M. Pauler, R. Huang and D. P. Barlow, (2009), "The function of non-coding RNAs in genomic imprinting". *Development*, 136(11), 1771–83.
- Naqvi H, Ilagan Y, Krikun G, Taylor HS. (2014), "Altered genomewide methylation in endometriosis". *Reprod Sci*. 2014;21(10):1237–43.
- N. Bhutani, D. M. Burns and H. M. Blau, (2011), "DNA demethylation dynamics". *Cell*, 146(6), 866–72.
- N. Bunkar, N. Pathak, N. K. Lohiya and P. K. Mishra, (2016), "Epigenetics: A key paradigm in reproductive health". *Clin Exp Reprod Med*, 43(2), 59–81.
- Oh JH, Gertych A, Tajbakhsh J. (2013), "Nuclear DNA methylation and chromatin condensation phenotypes are distinct between normally proliferating/aging, rapidly growing/immortal, and senescent cells". *Oncotarget*. 2013;4(3):474–93.

- Pan Z, Zhang J, Li Q, Li Y, Shi F, Xie Z, et al. (2012), "Current advances in epigenetic modification and alteration during mammalian ovarian folliculogenesis". *J Genet Genomics*. 2012;39(3):111–23.
- Qian Yang, Wen-Wen Gun, Yan Gu, Na-Na Yan, Yan-Yan Mao, Xing-Xing Zhen, Jian-Mei Wang, Jing Yang, Hui-Juan Shi, Xuan Zhang and Jian Wang, (2018), "Association of the peripheral blood levels of circulating microRNAs with both recurrent miscarriage and the outcomes of embryo transfer in an in vitro fertilization process", Yang et al. *J Transl Med* 16:186.
- Reem Sabry, Jyoji Yamate, Laura Favetta, and Jonathan LaMarre, (2019), "MicroRNAs: potential targets and agents of endocrine disruption in female reproduction", *Toxicol Pathol* 2019; 32: 213–221.
- Rose NR, Klose RJ. (2014), "Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation". *Biochim Biophys Acta*. 2014;1839(12):1362–72.
- Rossetto D, Avvakumov N, Côté J. (2012), "Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events". *Epigenetics*. 2012;7(10):1098–108.
- R. Sharma, K. R. Biedenharn, J. M. Fedor and A. Agarwal, (2013) "Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility". *Reprod Biol Endocrinol*, 11, 66.
- Sedigheh Bahmyari, Zeinab Jamali, Seyyed Hossein Khatami, Omid Vakili, Mahin Roozitalab, Amir Savardashtaki, Arezoo Solati, Pegah Mousavi, Zahra Shabaninejad, Sina Vakili, Hamid Behrouj, Hassan Ghasemi, Ahmad Movahedpour, (2021), "microRNAs in female infertility: An overview", *Cell Biochem Funct*. 2021;39:955–969.
- Semra Kahraman, Ipek Nur Balin Duzguner, Soner Duzguner, Yucel Sahin and Cihat Sen, (2021), "Incidence of multiple births in relation to current regulations in Turkey regarding embryo transfer", *BMC Pregnancy and Childbirth* 21:117.
- Silvia W. Lestari, Meidika D. Rizki, (2016), "Epigenetic: A new approach to etiology of infertility", *Med J Indones*. 2016;25:255–62.
- Stanford JB, Parnell TA, Boyle PC. (2008), "Outcomes from treatment of infertility with natural procreative technology in an Irish general practice". *J Am Board Fam Med*. 2008;21(5):375–84.
- Tal Imbar, M.D., and Iris Eisenberg, Ph.D, (2014), "Regulatory role of microRNAs in ovarian function", *Fertility and Sterility*, Volume 101, Issue 6, June 2014, Pages 1524-1530.
- T. Clouaire and I. Stancheva, (2008), "Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin?" *Cell Mol Life Sci*, 65(10), 1509–22.
- T. R. Mercer and J. S. Mattick, (2013), "Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation". *Nat Struct Mol Biol*, 20(3), 300–7.
- V. E. Villegas and P. G. Zaphiropoulos, (2015), "Neighboring gene regulation by antisense long non-coding RNAs". *Int J Mol Sci*, 16(2), 3251–66.
- V. J. Peschansky and C. Wahlestedt, (2014) , "Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation". *Epigenetics*, 9(1), 3–12.
- Young JM, McNeilly AS. (2010), "Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction*". 2010;140(4):489–504.

- Yue Mx, Fu Xw, Zhou Gb, Hou Yp, Du M, Wang L, et al. (2012), "Abnormal DNA methylation in oocytes could be associated with a decrease in reproductive potential in old mice". *J Assist Reprod Genet.* 2012;29(7):643–50.
- Y. Wei, H. Schatten and Q. Y. Sun, (2015), "Environmental epigenetic inheritance through gametes and implications for human reproduction. *Hum Reprod Update*, 21(2), 194–208.
- Ziru Jiang, Yinyu Wang, Jing Lin, Jingjing Xu, Guolian Ding, Hefeng Huang, (2017), "Genetic and epigenetic risks of assisted reproduction", *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, Volume 44, October 2017, Pages 90-104.



ÖZ GEÇMİŞ

Mehdi Ghadimzadeh Şehit Kuçeri, (Khoy, Batı Azerbaycan, İran) Lisesi'ni bitirdikten sonra İran Azad Üniversitesi Fen Fakültesi, Zooloji bölümünden 2006 yılında mezun oldu. 2013 yılında Ankara Üniversitesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programına girdi. Temmuz 2016 tarihinde Yüksek lisans eğitimini bitirdikten sonra, Eylül 2017 tarihinde OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD'de doktora programına başladı. Ana dili Azerbaycan Türkçesi, orta derecede İngilizce, iyi derecede Farsça bilmektedir.

İletişim Bilgileri

ORCID ID : <https://orcid.org/0000-0002-9297-2127>

Yayınlar:

1. Ghadimzadeh, M., Tural, Ş. and Güven, D. 2022. "Yardımcı Üreme Uygulamalarında Let7-b VE miR29-a'nın rolü ". *Uluslararası Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırmaları Kongresi*, Online, Ankara/TÜRKİYE (Sözlü Sunum, Tam Metin) (27-28 Ağustos 2022).
2. Ghadimzadeh, M., Tural, Ş. and Onal, M. 2022. " Serum Dnmt3a Ve Era Konsantrasyon Düzeylerinin Fertilité Başarısına Etkisi". *Uluslararası Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırmaları Kongresi*, Online, Ankara/TÜRKİYE (Sözlü Sunum, Tam Metin) (27-28 Ağustos 2022).



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/850-945-546

04.10.2021

Sayın Doç.Dr. ŞENGÜL TURAL

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **Yardımcı Üreme Uygulamalarında let-7b, miR-29a düzeylerinin Tedavi Başarısına Etkilerinin Araştırılması** başlıklı OMÜ KAEK 2019/746 Karar nolu Genetik çalışma nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları açısından Klinik Araştırmalar Etik Kurulu yönergesine göre incelenmiş ve etik açıdan bir sakınca olmadığına, çalışmanın süresi 6 ayı geçerse 6 aylık bildirimlerinin yapılmasına, çalışma tamamlandıktan sonra sonucunun tarafımıza en geç üç(3) ay içerisinde bildirilmesine 14.11.2019 tarihli Etik kurulumuzda oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.

Prof.Dr.Ramis ÇOLAK
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı