

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**IVF SIKLUSLARINDA FOLİKÜL SIVISI VE GRANULOSA
HÜCRELERİNDE miRNA EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Dr. Cem DAĞDELEN

UZMANLIK TEZİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Gökhan BAYHAN

ISPARTA-2020

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Projeleri Yönetim
Birimi tarafından TTU-2020-7497 proje numarası ile desteklenmiştir**

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmamda desteklerini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan kıymetli tez danışmanım Prof. Dr. Gökhan Bayhan olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Baha Oral, Prof. Dr. Okan Özkaya, Prof. Dr. Mekin Sezik, Prof. Dr. Mehmet Güney, Prof. Dr. Evrim Erdemoğlu, Doç. Dr. İlker Günyeli'ne;

Tez çalışmalarım sırasında benden yardımlarını esirgemeyen başta embriyolog Dr. Öğr. Üyesi Dilek Ulusoy Karatopuk olmak üzere tüm İVF ünitesi embriyolog, hemşire ve yardımcı sağlık personellerine;

Tezimin genetik açıdan planlanması, çalışılması ve değerlendirilmesi aşamasında yardımcı olan, değerli görüş ve fikirlerine başvurduğum Dr. Öğr.Üyesi Kuyuş Hekimler Öztürk'e;

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım bütün asistan arkadaşlarıma, kliniğimizde aile ortamında çalıştığımı hissettiren özveriyle çalışan tüm hemşire ve personellerimize;

Tez projeme TTU-2020-7497 numarası ile maddi destek sağlayan Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen, anneme, babama ve abime;

Tıp eğitimim sırasında hayatıma giren bana değer katan ve her anlamda destek olan sevgili eşime

Sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım...

Dr. Cem DAĞDELEN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	iv
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. İnfertilite	4
2.1.1. İnfertilite Tanımı	4
2.1.2. İnfertilite Nedenleri.....	5
2.1.3. İnfertil Çiftin Değerlendirilmesi	5
2.1.3.1. Anamnez	5
2.1.3.2. Fizik Muayene	6
2.1.3.3. Ultrasonografi.....	7
2.1.3.4. Laboratuvar	7
2.1.3.5. Histerosalpingografi.....	7
2.1.3.6. Laparaskopi ve Histeroskopi.....	7
2.1.4. Kadın İnfertilitesi Nedenleri ve Değerlendirilmesi.....	8
2.1.4.1. Ovulatuvar Bozukluklar	8
2.1.4.2. Tubaperitoneal Bozukluk	10
2.1.4.3. Uterin Anomali	10
2.1.4.4. Servikal Bozukluk	10
2.1.5. Erkek İnfertilitesi ve Semen Analizi	10
2.1.6. İnfertilite Tedavisinde İn Vitro Fertilizasyon Yöntemleri.....	11
2.1.6.1. ICSI Yöntemi.....	11
2.1.6.2. Kontrollü Overyan Hiperstimülasyon Protokolleri	13
2.1.6.3. Ovulasyonun Tetiklenmesi.....	14
2.1.6.4. Luteal Faz Desteği	14
2.2. Foliküler Sıvısı ve Granülosa Hücresi	15
2.3. MicroRNA	15
2.3.1. MicroRNA ve Over İlişkisi	16
2.3.2. MicroRNA ile Over Fonksiyon ve Patolojilerine Etkisi	16
3. MATERYAL ve METOD.....	18
3.1. Materyal	18
3.2. Metod.....	19
3.2.1. Hastaların Seçimi	19
3.2.2. Kontrollü overyan hiperstimülasyon.....	21
3.2.3. Oosit Pick-up İşlemi ve folikül sıvısı granülosa toplanması	22
3.2.4. Folikül Sıvılarının ve Granülosa Hücrelerinin Elde Edilmesi ve Hazırlanması.....	23
3.2.5. Folikül ve Granülosa Hücrelerinin Tüpe Alınması ve Saklanması	23
3.2.6. İCSI İşlemi, Embriyo Değerlendirilmesi ve Transferi	23
3.2.7. Folikül Sıvısı ve Granülosa Hücrelerinde Araştırılan Parametrelerin Tayini	25
3.2.8. Genetik Çalışma.....	25

3.2.8.1. miRNA izolasyon protokolü	25
3.2.8.2. cDNA izolasyon protokolü:	26
3.2.8.3. RT-PCR Protokolü:.....	26
3.2.8.4. Verilerin Değerlendirilmesi:.....	26
3.2.9. İstatistiksel Analiz	27
4. BULGULAR.....	28
4.1 Erkek kaynaklı infertil grupta bulunan kadınlar ile açıklanamayan infertil grupta bulunan kadınların bazı demografik özelliklerinin karşılaştırılması	28
4.2 Erkek kaynaklı infertil grupta bulunan kadınlar ile açıklanamayan infertil grupta bulunan kadınların bazal hormon değerlerine göre karşılaştırılması	29
4.3 Erkek kaynaklı infertil grupta bulunan kadınlar ile açıklanamayan infertil grupta bulunan kadınların folikül ve granülosa hücrelerinde miR-21, miR-17-5P miR-126 ekspresyon düzeyilerine göre fark analizleri.....	30
4.4 Erkek kaynaklı infertil grupta bulunan kadınlar ile açıklanamayan infertil grupta bulunan kadınların IVF başarı kriterlerimize göre fark analizleri.....	38
4.5. Çalışmaya katılan kadınların sigara içme alışkanlıklarına göre miRNA ekspresyon düzeyi arasındaki farklar	39
4.6. Çalışmaya katılan kadınların yaşlarına göre miRNA ekspresyon düzeyleri değerlendirilmesi.....	40
4.6.1 Çalışmaya katılan kadınların 35 yaş üzeri ve 35 yaş altı olarak iki gruba ayrıldığında çalıştığımız miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin arasındaki değerlendirme	40
4.6.2 Çalışmaya katılan kadınların yaş ortalamasına göre yaş ortalamasının altında kalanlar ve üzerinde olanlarda miRNA ekspresyon düzeyi farkları.....	41
4.7. Çalışmaya katılan kadınların VKİ değerine göre miRNA ekspresyon düzeyi değerlendirmesi	41
4.8. Çalışmamıza katılan kadınlar arasında IVF başarı kriterlerine göre olumlu sonuçlanan parametrelerin miRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırması	42
5. TARTIŞMA.....	43
6. SONUÇ	47
ÖZET.....	48
SUMMARY.....	49
KAYNAKLAR.....	50

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

İVF	: İn vitro fertilizasyon
FS	: Foliküler sıvı
PKOS	: Polikistik over sendromu
VKİ	: Vücut kitle indeksi
TV-USG	: Transvaginal ultrasonografi
FSH	: Folikül Stimülan Hormon
LH	: Luteinizan Hormon
TSH	: Tiroid Stimülan Hormon
E2	: Estradiol
AMH	: Antimüllerian Hormon
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GnRHa	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon Agonisti
HBsAg	: Hepatit B antijeni
Anti-HBs	: Hepatit B yüzey antikoru
Anti-HCV	: Hepatit C antikoru
Anti-HIV	: İnsan immün yetmelik virusu antikoru
IgG	: İmmünoglobulin G
IgM	: İmmünoglobulin M
HSG	: Histerosalpingografi
PG	: Progesteron
CL	: Korpus luteum
CC	: Klomifen sitrat
Sc	: Subkutan
AFS	: Antral folikül sayısı
KOS	: Kontrollü overyan stimülasyon
OHSS	: Overyan hiperstimülasyon sendromu
PIH	: Pelvik inflamatuvar hastalık
hCG	: Human koryonik gonadotropin
OPU	: Oosit pick-up
İCSİ	: İntrastoplazmik sperm injeksiyonu
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon

ZP	: Zona pellusida
CO₂	: Karbondioksit
PVP	: Polivinilpirolidin
im	: İntramuskuler
ROT	: Reaktif oksijen türleri
DNA	: Deoksi ribo nukleik asit
RNA	: Ribonukleik asit
SDÜ	: Süleyman Demirel Üniversitesi
DOR	: Düşük overyan rezerv
DHEA-S	: Dehidroepiandrosteron sülfat
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
N2	: Azot
PN	: Pronükleus
TESE	: Testicular Sperm Extraction
miRNA	: Mikro Ribonükleik Asit
NSAİİ	: Non Steroidal Anti-İnflamatuvar İlaç
YÜT	: Yardımcı Üreme Teknikleri
ET	: Embriyo Transferi

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Kadın ve Erkek İnfertilitesi Nedenleri.....	4
Tablo 2. İnfertilite etyolojisi dağılımı	5
Tablo 3. Semen Analizinde Normal Değerler (24)	11
Tablo 4. Erkek kaynaklı infertil grupta bulunan kadınlar ile açıklanamayan infertil grupta bulunan kadınlar'a ilişkin bazı demografik özellikleri.....	28
Tablo 5. Erkek kaynaklı infertil grupta bulunan kadınlar ile açıklanamayan infertil grupta bulunan kadınlar'ın bazal hormon değerleri ile fark analizi sonuçları.....	29
Tablo 6. Erkek kaynaklı infertil grupta bulunan kadınlar ile açıklanamayan infertil grupta bulunan kadınların folikül ve granülosa hücrelerinde miR-21, miR-17-5P miR-126 ekspresyon düzeyi ortalama değerleri ile fark analizi sonuçları.....	30
Tablo 7. Erkek kaynaklı infertil grup ile Açıklanamayan infertil kadınların folikül sıvısı ve granülosa hücrelerinde miRNA ekspresyon düzeyi parametreleri arasındaki ilişki için yapılan Spearman's rho korelasyon analizi sonuçları	31
Tablo 8. miRNA parametreleri ve sigara kullanımının, açıklanamayan infertilitenin bağımlı değişken olduğu lojistik regresyon analizi sonuçları	32
Tablo 9. Erkek kaynaklı infertil grupta bulunan kadınlar ile açıklanamayan infertil grupta yer alan kadınlar'ın gebelik sonucu, canlı doğum ve embriyo kalitesi dağılımları ve fark analizi sonuçları	38
Tablo 10. Sigara içme durumuna göre miRNA sonuçları arasındaki farklar	39
Tablo 11. Yaşa göre miRNA sonuçları arasındaki farklar	40
Tablo 12. Yaş ortalamasına göre miRNA sonuçları arasındaki farklar	41
Tablo 13. VKİ değerine göre miRNA sonuçları arasındaki farklar	41
Tablo 14. İnfertil kadınlarda kinik gebelik, canlı doğum ve embriyo kalitesi ile folikül sıvısı ve granülosa hücrelerinde miRNA ekspresyon düzeyi parametreleri arasındaki ilişki için yapılan Spearman's rho korelasyon analizi sonuçları	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Oosit pick-up işlemi sırasında overin ultrasonografik görünümü	22
Şekil 2. Granülosa hücrelerinin izolasyon aşamaları (SDÜ Tıp Fakültesi IVF Ünitesi).....	23
Şekil 3. İki polar cismi de içeren fertilize oosit.....	24
Şekil 4. Folikül sıvısı miR-17-5p relatif ekspresyon seviyesinin fertilite gruplarına göre farkı	32
Şekil 5. Folikül sıvısı miR-21 relatif ekspresyon seviyesinin fertilite gruplarına göre farkı	33
Şekil 6. Folikül sıvısı miR-126 relatif ekspresyon seviyesinin fertilite gruplarına göre farkı	34
Şekil 7. Granülosa hücrelerinde miR-17-5p relatif ekspresyon seviyesinin fertilite gruplarına göre farkı	35
Şekil 8. Granülosa hücrelerinde miR-126 relatif ekspresyon seviyesinin fertilite gruplarına göre farkı	36
Şekil 9. Granülosa hücrelerinde miR-21 relatif ekspresyon seviyesinin fertilite gruplarına göre farkı	37

1. GİRİŞ

İnfertilite reproduktif dönemdeki kadınların yaklaşık %15' ini etkileyen çok yönlü bir durumdur. İnfertiliteyi tanımlarken 12 aylık bir dönemde kontraseptif bir yöntem kullanmadan, düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebe kalınamaması olarak tanımlanabilir. İnfertilitenin yaklaşık %25 nedeni erkek kaynaklı, %30 nedeni kadın kaynaklı, %30 nedeni ise her iki çift kaynaklı olup %15'lik bir kısmında ise her iki çiftte ait bir patolojiye rastlanmasa da gebelik elde edilememektedir. Son zamanlarda ülkemizde de sıklığı günden güne artan bu soruna karşı infertilite tipine bakılarak infertil çiftlere önerilen seçenekler mevcuttur. Bu önerilen seçeneklerden en sık başvurulanı ise "in vitro fertilizasyon (IVF)" olarak adlandırılan yardımcı üreme tekniğidir. Yaygın olarak kullanılan bu yöntem beraberinde bazı problemleri de beraberinde getirmektedir. Hastanın katlandığı maliyetler, ilaç yükü, fizyolojik ve sosyolojik süreçlerde düşünüldüğünde son derece külfetli olan bu tedavinin başarısını öngörmede alternatif arayışları ciddi önem taşımakta ve halen devam etmektedir.

Oosit kalitesinin fertilite üzerinde anahtar bir rolü vardır. Foliküler sıvı, folikül gelişimi sırasında salgılanır, oositlerin gelişimi için kritik bir mikro ortamdır ve biyolojik olarak aktif molekül ve proteinleri içerir. Oosit, granülosa ve folikülün metabolizmasını düzenleyen birçok molekül içerir. Metabolitler, gerekli proteinler, iyonlar, plazma bileşenleri ve kodlayıcı olmayan Ribonükleik asit (RNA)'ler dahil çeşitli molekül bulunur. Granülosa hücreleri, ovaryan folikülün somatik hücrelerini oluşturur. Oositler folikül içerisinde olgunlaşıp geliştiklerinden granülosa hücreleri ile karşılıklı ve yoğun bir etkileşim içindedir. Çift yönlü olarak oosit, foliküler sıvı ve overyan folikülü çevreleyen granülosa hücreleri arasındaki karşılıklı konuşma oositin ileri gelişimi için gereklidir, fertilizasyon ve embriyo gelişimi ile bağlantısı da çok sayıda yayın ile gösterilmiştir.

IVF siklusuna dahil olan hastalarda oosit pick up (OPU) işlemi ile toplanan sıvı içinde oosit ve folikül sıvısı vardır. OPU işlemi sırasında bu sıvıdan hızlı bir şekilde oosit ya da oositlerin uzaklaştırılması ve farklı bir kültür ortamına aktarılması istenmektedir. Aktarmayı takiben ise bu sıvı atılmaktadır.

Granülosa hücreleri de rutin IVF prosedürü gereği oositler etrafından uzaklaştırılarak hem işlemin sağlığı hem de döllenmenin gözlenmesi için mekanik ve enzimatik olarak uzaklaştırılarak atılmaktadır.

Folikül sıvısı ve granülosa hücreleri içinde ayrıca oositlerin gelişim için gerekli proteinler, iyonlar plazma bileşenleri ve kodlayıcı olmayan RNA'lar mevcuttur.

MikroRNA(miRNA)'lar büyümeyi, farklılaşma ve apoptoz gibi hücrede temel süreçleri düzenleyerek gen ekspresyonunu etkileyebilirler. miRNA'lar özellikle mesajcı RNA hedeflerine bağlanarak transkripsiyonel regülasyon veya translasyon baskılanmasına yol açarak transkripsiyon sonrası düzenlemeye katkıda bulunan, uzunluğu 19-25 nükleotid olan küçük kodlayıcı olmayan moleküllerdir. Bizde bu proje ile foliküler sıvı ve granülosa hücrelerinde miR-17-5p, miR-21, miR-126 değerlendirmesini yapmayı amaçladık. Son zamanlarda literatürde yapılan çalışmalar bazı miRNA çeşitlerinin embriyo kalitesi ve fertilizasyon başarısıyla karakterize olduğu gösterilmiştir, bazı çalışmalarda ise miRNA ekspresyon düzeyinin polikistik over sendromu (PKOS) ve yaş ile korelasyonu araştırılmış ve anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.

Mevcut tez araştırmasının birincil araştırma sorusu şu şekilde özetlenebilir:

miRNA'lar büyüme, farklılaşma ve apoptoz gibi hücrede temel süreçleri düzenleyip gen ekspresyonunu etkileyerek infertilitede ne oranda etkili olmaktadır? Güncel literatürde yapılan çalışmalar bazı miRNA çeşitlerinin embriyo kalitesi ve fertilizasyon başarısıyla ilişkili olabileceği göstermiştir, bazı çalışmalarda ise miRNA ekspresyon düzeyinin PKOS ve yaş ile korelasyonu araştırılmış ve anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Folikül sıvısında yer alan çeşitli miRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesiyle beraber “çeşitli miRNA'lar IVF sonuçlarında da etkili olabilir mi?” “miRNA'lar infertilitede yeni bir biyobelirteç olabilir mi?” sorularını akla getirmektedir.

Çalışmamızdaki ikincil amaç ise IVF tedavisi uygulanan açıklanamayan infertil ve erkek faktör sebebiyle IVF tedavisi alan kadınlar üzerinde miRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenerek, günümüz imkanları kullanılarak klinik ve laboratuvar teknikleriyle açıklanamayan infertil hastaların genetik yöntemlerle

belirlemek ve son yıllarda üzerinde yapılan çalışma sayısı artan miRNA'ların bu tanıya nasıl katkı sağlayabileceğini araştırmaktır.

Antimüllerian hormon (AMH) ve antral folikül sayısı (AFS) gibi IVF sonuçlarının başarısını öngörmeye kullanılan belirteçlerin laboratuvar ve klinisyen uygulamalarındaki standartizasyon eksikliğini gidererek, literatürde yapılan çalışmalarda IVF sikluslarında folikül sıvısında ve granülosa hücrelerinde yer alan bazı miRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesiyle IVF sonuçlarında etkili olabilecek belirteçlerin önceden tespit edilmesi başarı hedeflerinin netleştirilmesi, hastanın katlandığı maliyetlerin azaltılmasının sağlanması mümkün müdür sorusuna cevap aramaktayız. Ayrıca belirlenmesi planlanan miRNA ekspresyon düzeyleri ile infertilitede miRNA'lar yeni bir biyobelirteç olabilir mi sorusununa da cevap aranmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnfertilite

2.1.1. İnfertilite Tanımı

Fekundabilite ve infertilite, nüfusun üreme yeteneği gösteren önemli göstergelerdir. Fekundabilite, bir kadının, bir adet döngüsünde korunmasız cinsel ilişki sonrası gebe kalabilme olasılığıdır. İnfertilite ise 12 aylık bir dönem boyunca korunmasız, düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebe kalınamaması durumudur (1).

Bir kadının her siklus döngüsünde doğurganlık oranı hemen hemen % 20'dir, 12 aylık dönemde %90, 24 aylık dönemde ise %94'tür (2, 3).

Tablo 1. Kadın ve Erkek İnfertilitesi Nedenleri

Kadın İnfertilitesi Nedenleri	1. Ovulatuvar Bozukluklar 2. Tubaperitoneal 3. Uterin Faktörler 4. Servikal Faktörler
Erkek İnfertilitesi Nedenleri	1. İdiopatik Erkek İnfertilitesi 2. İnmemiş Testis 3. Ürogenital Enfeksiyonlar 4. Cinsel Ejakulatuar Disfonksiyon 5. Varikosel 6. Hipogonadizm 7. İmmünolojik Faktörler 8. Obstrüksiyonlar 9. Diğer Nedenler

2.1.2. İnfertilite Nedenleri

Kabaca infertilitenin 1/3 nedeni kadın kaynaklı, 1/3 nedeni erkek kaynaklı olduğu söylenebilir. Bu nedenler, Tablo 1 ve Tablo 2’de özetlenmiştir.

Tablo 2. İnfertilite etyolojisi dağılımı

İnfertilite Etiyolojisi	Oran
Erkek Faktörü	% 25
Ovulatuvar Faktör	% 27
Tubal/Uterin Faktör	% 22
Açıklanamayan	% 17
Diğer	% 9

2.1.3. İnfertil Çiftin Değerlendirilmesi

İnfertil çiftlerin hekime ilk muayene başvurularında mutlak suretle her ikisinin de bulunması sağlanmalıdır. Mevcut araştırmada da kadın hastaların infertilitesi ön planda tutulmuştur. Kadın hastaların anamnezi sorgulanırken jinekolojik öykü, tıbbi öykü, geçirilmiş operasyon ve operasyonların türü ve içeriği, kullanılmış ve kullanılmaya devam eden medikasyonlar, sosyal öykü ve etnisite sorgulanmalıdır. Detaylı fizik muayene yapılarak gerekli tetkiklerle infertilite nedeni belirlenmesi sağlanmalıdır.

2.1.3.1. Anamnez

Hastalardan detaylı anamnez alınmalı (jinekolojik öykü, medikal öykü geçirilmiş operasyon ve operasyonların türü ve içeriği, , kullanılmış ve kullanılmaya devam eden medikasyonlar, sosyal öykü, etnisite), fizik muayene yapılmalıdır.

Jinekolojik öyküde menstruasyon siklusları, önceki kontrasepsiyon deneyimi, infertil geçen süre, koit sıklığı üzerine ayrıntılı bilgi edinilmelidir. Boy ve kilosu değerlendirilerek vücut kitle indeksine (VKİ) hesaplanmalıdır. Soygeçmişte infertil bireylerin olup olmadığı, ailede fetal anomali öyküsü, tekrarlayan abortus öyküsü bunlardan bir veya birkaçının olması genetik neden olabileceğini akla getirir(4).

Tıbbi öyküde hiperprolaktinemi, hipertiroidi, hipotirodi, hiperandrojenemi, polikistik over sendromu (PKOS), konjenital adrenal hiperplazi (KAH) gibi kadın fertilitesine doğrudan etki edebilecek olan endokrin hastalıklarının mevcut olup olmadığı hakkında bilgi alınmalıdır. Kemoterapi öyküsü, radyoterapi öyküsü gibi over rezervini ve fertilitayı büyük oranda zarar veren medikasyonlar olup olmadığı sorgulanmalıdır.

Cerrahi öyküsünde Batın cerrahileri, önceki geçirilmiş uterin operasyonların varlığı ve sonucu ayrıca batın içi abse öyküsü batın içi adezyonlarla normal batın anatomisinde ve normal uterus anatomisinde değişikliklere neden olabileceği için bu konu da sorgulanmalıdır (5).

Kullanılan ilaçlar, alışkanlıklar öyküsünde özellikle ovulasyonu kötü yönde etkilediği bilinen non steroid anti-inflamatuvar ilaçların (NSAİİ) kullanımı sorgulanmalıdır. Bitkisel ilaç kullanımı sorgulanmalıdır. Hastanın yaşam şekliyle ilgili mesleği, sigara ve alkol kullanıp kullanmadığı kullanıyorsa miktarı, maruhana kullanımı, kafein alımını ve miktarı vb gibi özellikler sorgulanmalıdır (6).

Soygeçmişte infertil bireylerin olup olmadığı, ailede fetal anomali öyküsü, tekrarlayan abortus öyküsü, erken menapoz bulunması bunlardan bir veya birkaçının olması muhtemel genetik bir neden olabileceğini akla getirir. Bu sebeplerden dolayı soygeçmiş mutlaka sorgulanmalıdır (7).

2.1.3.2. Fizik Muayene

İnfertilite nedeni ile başvuran kadınlarda boy ölçümü, kilo ölçümü, tansiyon ölçümü yapılmalı vücut kitle indeksi (VKİ) hesaplanmalı, hirsutizm, alopesi, akne değerlendirilmeli, tiroid ve meme muayenesi yapılmalıdır.

Jinekolojik muayenede, serviks yapısı, uterusun şekli ve mobil olup olmaması vaginal muayene esnasında değerlendirilmelidir. Batın muayenesinde batında hassasiyet değerlendirilmelidir. İnfertilite nedeniyle başvuran bütün kadınlardan servikal patolojiler açısından servikal smear alınmalı , cinsel yolla bulaşan hastalıkları değerlendirmek üzere neisseria gonore ve klamidya için kültür alınması gereklidir (7).

2.1.3.3. Ultrasonografi

Öncelik olarak transvaginal ultrasonografi (TV-USG) ile görüntüleme yapılmalıdır. Ultrasonografide uterusun boyutu, kontur ve pozisyonu, myometriumun homojenitesi, uterin patolojilerden myoma uteri ve bunların uterustaki yeri, boyutu, menstrüel siklusun süresine göre endometriumun değerlendirilmesi, endometrium kalınlık ve yapısı, kavite içi patolojik miyomu polip vs olup olmaması, overlerin ekojenitesi, overlerin stromasının yapısı, overlerin stromasının boyutu, antral folikül sayısı (AFS), menstrüel siklusun süresine bağlı olarak dominant folikül veya korpus luteum (CL) varlığı, overde, paraoveryan alanlarda kitle varlığı, solid kistik ayrımı değerlendirilmeli ve kayıt edilmelidir. TV USG, histereskopi ve histerosalpingografi (HSG) ile beraber kombine kullanımında başarı steriliteye sebep olan patolojileri saptamada sadece bu tanı araçlarının tek tek kullanımına göre daha fazla güvenilirliği olduğu görülmüştür (8).

2.1.3.4. Laboratuvar

Hormonal, serolojik, hematolojik testlerden luteinizan hormon (LH), estradiol (E2) ve folikül stimulan hormon (FSH) eğer hirsutizm varsa serbest testosteron, 17 hidroksi progesteron, dehidroepiandrostenodion sülfat, androstenedion, siklusun 3.günü değerlendirilmesi ve prolaktin, antimüllerian hormon (AMH), tiroid stimulan hormon (TSH) siklustan bağımsız olarak, tam kan sayımı, kan grubu tayini, ölçümleri bütün infertil kadınlarda değerlendirilmelidir.

2.1.3.5. Histerosalpingografi

Histerosalpingografi(HSG), tubal patens hakkında bilgi vermesinin yanı sıra, konjenital uterin anomaliler, intrakaviter patolojiler (myom, polip, adezyon) açısından da yol gösterici olabilir (9).

2.1.3.6. Laparaskopi ve Histeroskopi

Hem diagnostik hem operatif amaçlı laparaskopi ve/veya histeroskopi yapılabilir. Pahalı ve invaziv yöntemlerdir. *Histeroskopi* uterin kavite hakkında bilgi

edinilmesini sağlar. Tanısal laparoskopi infertilitenin tam değerlendirilmesi ve tedavisinin önemli bir parçasıdır. Tanısal laparoskopiyle hem tubular değerlendirilirken hem de infertiliteye sebep olabilecek ovarian patolojiler ve diğer (örneğin pelvik inflamatuvar hastalık (PIH), adezyon vb.) batin içi patolojiler belirlenebilir (10).

2.1.4. Kadın İnfertilitesi Nedenleri ve Değerlendirilmesi

2.1.4.1. Ovulatuvar Bozukluklar

Ovulatuvar bozuklukların tanısında rutin pratikte kullanılan çeşitli yöntemler mevcuttur ve bu yöntemler her geçen gün geliştirilmeye devam etmektedir. Bu yöntemlerin bazıları basit ve invazif değilken, bu yöntemlerden bazıları daha karmaşık, pahalı ve klinik pratikte kullanılması daha zordur.

Bazal Vücut Isısı

Progesteronun (PG) termojenik etkisinden faydalanmak amacıyla her sabah vücut ısı ölçülerek yapılır. PG etkisi ile ovulasyon sonrası bazal vücut ısı 0.4° - 0.8° F artar. Bu bifazik patern ovulasyona prediktiftir. Progesteron >5 ng/ml veya ovulasyondan 4 gün geçtikten sonra vücut ısı artışı olur, bu yöntemle LH pikini 2-3 gün doğrulukla tespit edilebilir. Böylelikle ovulasyonu tahmin etmek için uygulaması kolay, invazif olmayan ve ucuz bir yöntemdir (11, 12).

Menstrual Öykü

Siklus süresi 25-35 gün arası ve menstruasyon 3-10 gün arası olan, mittelschmerz izlenen, premenstrual semptomların varlığı, dismenorenin olduğu sikluslar ovulatuvar sikluslar olarak tahmin edilebilir.

Serum Progesteron Düzeyi

Midluteal fazda serum PG düzeyi 28 günlük bir siklusta 21. gün bakılır. PG >10 ng/ml olması ovulasyon olduğunu tahmine yardımcı olur (13).

Endometrial Biyopsi

Endometrial reseptivite değerdendirilmesi histolojik ve biyokimyasal olarak yapılabilir. Yardımcı üreme teknikleri denenmeden önce endometrium hangi menstrüel döngüde olduğu öğrenilebilir (14).

Overyan Rezerv Testleri

Bir kadının mevcut oosit sayısı ve bu oositlerin üreme fonksiyonuna katkısı over rezervi olarak değerdendirilebilir. Bazı testlerle üreme fonksiyonu katkısı değerdendirilerek over rezervi tahmin edilmeye çalışılmaktadır. Bunlardan bazıları;

1. Yaş: Yardımcı üreme tekniklerinde (YÜT) elde edilen başarı, yaş arttıkça azalmaktadır. Yaşlı kadınlarda oosit, embriyo sayısı ve implantasyon şansı düşüktür (15).

2. Bazal Estradiol: Evers ve ark. foliküler evrenin başlangıcında bakılan estradiol (E2) seviyesi 60 pg/ml üzerinde olanlarda yüksek siklus iptali ve toplanan oosit sayısında azalma saptamıştır. Fratelli ve ark. ise siklusum iptal edilme oranının bazal estradiol (E2) 20 pg/ml altında ve 80 pg/ml üzerinde olan kadınlarda daha yüksek oldurak tespit etmişlerdir (16).

3. Bazal Serum FSH: Aschrafti ve ark. 212 İVF siklusunun erken foliküler evrede bakılan FSH düzeyleri 15 IU/ml üzerinde olan kadınlarda, daha az oosit toplandığını ve siklus iptalinin daha fazla olduğunu saptamıştır (17).

4. İnhibin B: Overde granülosa ve teka hücrelerinden salgılanan, primer olarak görevi FSH salgılanmasını inhibe etmek olan hormondur. 3.ve 10. Gün bakılan inhibin b değerdlerinin düşük over rezervli kadınlarda daha düşük olduğu görülmüştür (18).

5. Klomifen Sitrat (CC) Stimölasyon Testi CC'nin pituitier reseptörlerde estrojeni antagonize ederek FSH düzeylerini arttırması sonrası oluşan foliküllerden salgılanan E2'nin FSH'yı baskılamasına dayanmaktadır. (18).

6. Gonadotropin Salgılatıcı Hormon Agonisti Stimölasyon Testi: Gonadotropin salgılatıcı hormon agonisti (GnRHa) uygulanması sonrasındaki ilk 24 saatte parlama (flare-up) etkisiyle E2 ve inhibin B seviyelerinde artış olmasını esas alan dinamik over rezerv testidir. Yüksek maliyetli olması ve gebelik planlanmadan analogların kullanılması nedeniyle kullanımı kısıtlanmıştır (19).

7. Antral Folikül Sayısı (AFS): Transvaginal ultrason (TV-USG) ile overlerdeki 10 mm'den küçük foliküllerin menstrüal siklusun başında sayılmasıyla uygulanan bir testtir. Yapılan çalışmalar gösteriyorki antral folikül sayısı yaş ve fertilite ile korele olduğunu gösteriyor (20).

8. Antimülleryan Hormon (AMH): Başlıca primordial ve preantral foliküllerden salgılanmaktadır. AMH, klinik olarak inaktif oositlerin rezervini gösteren en iyi belirteçlerden olduğu görülmektedir (21).

2.1.4.2. Tubaperitoneal Bozukluk

Tubaperitoneal bozukluk yapan bazı risk faktörleri cinsel yolla bulaşan hastalıklar, multipartner, ilk cinsel ilişkide erken yaş, ırk, sosyoekonomik ve medeni durum, kontraseptif yöntemlerin kullanımı, septik abortuslar ve abdominal veya pelvik cerrahi. Tubal değerlendirmeler laporoskopik yöntemle, ultrasonografi ile veya histerosapingografiyle yapılabilir (22).

2.1.4.3. Uterin Anomali

Fertiliteyi etkileyen uterus anomaliler sıklığını belirlemek kolay değildir. Tanıları özel araştırmalara ihtiyaç duyar (histerosalpingografi, histeroskopi ve laparoskop). Rahim anormallikleri ile ilişkili olarak fertilite bozulabilir. Tüm bu anormallikler, küretaj, erken doğum, vasküler patolojiler ve intrauterin büyüme geriliği gibi nedenlere sebep olabilir (9).

2.1.4.4. Servikal Bozukluk

Post koital testte (Sims Hühner Testi), servikal mukus ovulasyondan hemen önce veya ilişkiden sonra 2-12 saat içinde değerlendirilir. Yapılan çalışmalarda fertil olguların anlamlı sonuçları saptanmıştır (23).

2.1.5 Erkek İnfertilitesi ve Semen Analizi

Üç günlük koitus yasağından sonra erkekte masturbasyon yöntemi ile spermler alınır, sperm örneği verme işlemi minimum 15 gün geçtikten sonra

tekrarlanmalı 2 veya 3 örnek değerlendirilmesi yapılmalıdır. Alınan ejakulatın volumüne, viskozitesine, spermilerin sayısına ve morfolojisine bakılmaktadır (Tablo 3).

Tablo 3. Semen Analizinde Normal Değerler (24)

Ejekulat volümü	$\geq 1,5$ ml
Sperm Konsantrasyonu	≥ 15 milyon/ml
Progresif motil sperm oranı	Progresif motil sperm oranı (A+B) $\geq$ %32 Total motilite $\geq$ %40
Morfoloji	$> \%4$ (3-4) (Kruger's)
Peroksidaz-positif Lökosit	< 1 milyon/ml
Ph	$> 7,2$
Fruktose (optional)	≥ 13 μ mol/Ejakulat

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2010 kriterlerine oligospermi sperm sayısının normalin altında olması konsantrasyon < 15 milyon, azospermi semende hiç sperm bulunmaması, treatozoospermi $< \%4$ normal form sperm, astenospermi motil sperm yüzdesinin düşük olması $< \%32$ progresif motil, oligoastenospermi sperm sayı ve motilitesinin normalin altında olması, konsantrasyon < 15 milyon ve $< \%32$ progresif motil olarak tanımlanmıştır.

2.1.6. İnfertilite Tedavisinde İn Vitro Fertilizasyon Yöntemleri

Bin dokuz yüz yetmiş sekiz yılında ilk tüp bebek canlı doğumundan sonra tüp bebek önemi artmıştır. Ancak fertilizasyon aşmasında uygulanan geleneksel IVF prosedürünün ağır erkek faktörlerinde başarısız olduğu görülmüştür. 1992 yılında ilk defa kullanılmaya başlanan intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yöntemiyle daha başarılı sonuçlar alınmaya başlanmıştır (25).

2.1.6.1. ICSI Yöntemi

ICSI prosedürü oosit içine tek bir sperm enjeksiyonudur. Bu prosedure mineral ve yağ ile kaplı mikrodamlacıklar içeren plastik bir mikroenjeksiyon kabında gerçekleştirilir. Polivinilpirolidin (PVP) dropunun çevresine sperm süspansiyonu eklenir. Epididimal veya testiküler sperm kullanımında farklı mediumlar kullanılır.

Kumulus ve koronadan ayrıştırılan oositler 8 medium dropunun merkezine yerleştirilir. PVP solüsyonlarının visköz karakteri sayesinde sperm manipülasyonu kolaylaşır. Aynı zamanda sıvının enjeksiyon iğnesiyle kontrolünü kolaylatır ve pipet uçuna sperm hücrelerinin yapışmasını önler. ICSI'nin bu aşamasında canlı spermin seçimi ve immobilizasyonu enjeksiyondan önce oolemmının yırtılmadan oositin konumlandırılması doğru bir şekilde yapılabilir. PVP ile doldurulmuş enjeksiyon pipetinde tek bir canlı, normal morfolojik spermatozoon aspire edilir. Daha sonra sperm hücresi enjeksiyon pipetine dik bir biçimde salınır. ICSI pipetiyle sperm kuyruğuna basılarak sperm immobil hale getirilir. Immobilizasyondan sonra sperm hücresi ile beraber minimum hacimde medium tekrar aspire edilir. Oositteki polar body saat 6 pozisyonuna getirilir. Hem holding pipeti hem de oosit en iyi görüntülendiğinde oositin saat 3 hizasında enjeksiyon iğnesi yaklaştırılır. Zona pellucida'dan geçmek kolaydır. Sadece enjeksiyon iğnesini ilerletmek yeterlidir. Fakat oolemma her zaman kolay delinmez minimal aspirasyon uygulanmalıdır. Ooplazma enjeksiyon pipetine girer bu akışın ani hızlanması membran rüptürünün göstergesidir. Aspirasyon hemen durdurulmalı sperm hücresi minimal hacimle beraber oosit içine yavaş ve nazıkçe verilir ve dikkatlice geri çekilir. Enjeksiyon işleminden sonra oositler durulanır ve hafif parafin yağı ile kaplanmış mikro damlacıklar içinde kültürlenir. Oositler % 5 oksijen (O₂), % 5 karbondioksit (CO₂) ve %90 azot (N₂) atmosferinde 37°C'de tutulur. Enjekte edilen oositler ICSI'den yaklaşık 16-18 saat sonra bütünlük ve fertilizasyon açısından incelenir. Oositler, "two individualized" görünümündeyse fertilizasyonun olduğu kabul edilir veya parçalanmış polar cisimler, nükleoller içeren açıkça görülebilir iki pronükleusla (2-PN) birlikte bulunur. ICSI sonrası fertilizasyon oranı genellikle enjekte edilen oosit sayısı başına % 57 ila % 67 arasındadır.

Pronükleer aşama kadar erken, pronükleusların hizalanması ve boyutu, nükleollerin hizalanması ve sayısı ve sitoplazmanın halo etkisi dahil olmak üzere morfolojik skora, transfer gününde morfolojik özelliklere ek olarak değerli bir noninvaziv seçim yöntemi olarak kullanılabilir. Pronükleer zigotun morfolojik özellikleri implantasyon ve gebelik oranları ile ilişkilidir. Döllenmiş oositlerin yarıma özellikleri günlük olarak değerlendirilir. Transfer edilecek embriyonun seçiminde en önemli kriterlerden birisi blastomer sayısının gün ile uyumudur. Bölünen embriyolar, blastomerler ve anükleer fragmanlarının oranının büyüklüğüne göre puanlanır. Tip A

(mükemmel) embriyolar, nükleer fragman içermez. Tip B (kaliteli) embriyolar, anükleaz fragmanları ile doldurulmuş embriyo hacminin maksimum% 20'sine sahiptir. C tipi embriyolarda, anükleaz fragmanları embriyo hacminin% 21 ila% 50'sini temsil eder. D Tipi (kalitesiz) embriyoların anükleaz fragmanları vardır embriyo hacminin% 50'sinden fazlasında bulunur. A, B ve C tipi embriyolar transfer için uygundur.

Embriyo transferleri oositin alınmasından sonraki 3. gün uygulanmaktadır. IVF ve ICSI'de çoğul gebelikleri önlemek için mümkün olan tek strateji tek bir embriyo transfer etmektir (25).

2.1.6.2. Kontrollü Overyan Hiperstimulasyon Protokolleri

Ayrıca, yumurtalık stimülasyon protokolleri, birçok farmakolojik müdahale nedeniyle, yumurtalık cevabının yoğun bir şekilde izlenmesini gerektiren, önemli yan etkileri ve komplikasyon şansı ile son derece karmaşık ve maliyetli hale gelmiştir. Folikül gelişimi takip edilerek gonadotropin dozlarını veya preparat tipini ayarlama ile yumurtalık stimülasyonunu kontrol ediliyor. İVF yöntemlerinde öncelikle kontrollü overyan hiperstimulasyon(KOS) yapılarak overyan folikül gelişimi sağlanır.

GnRH agonistleri (GnRHa)

GnRHa'nın in vivo kullanımının gonadotropin salınımını bifazik olarak etkilediği görülmüştür. İlk olarak FSH ve LH'da gibi gonadotropinlerde ani salınım başlar, daha sonra GnRH reseptörü down regülasyonu ve hücre içi uncoupling ile pitüiter desensitizasyon aşaması gelişir. GnRH kullanımı devam ettikçe gonadotropin sentezi de progresif olarak azalmaya devam eder. Kullanılan ilaç dozuna göre desensitizasyon süre ve şiddeti değişir. İlaç kullanımı durdurulduktan sonra doza bağlı olarak endojen GnRH'a karşı yanıt başlar desensitizasyon kalkar. GnRHa'nın bu özelliklerinden iki tedavi protokünde de yararlanılmaktadır (26).

1. Kısa Dönem GnRHa Protokolü: Erken foliküler fazda GnRHa kullanımı başlanır. GnRHa'nın ön planda FSH ve LH'ın ani salınım etkisiyle artışından foliküler gelişim için yararlanır, daha çok düşük over rezervli hastalarda tercih edilir (27).

2. Uzun Dönem GnRHa Protokolü: GnRH uzun agonist protokolü, GnRH agonistinin, uyarılmadan önceki döngünün midluteal fazında uygulanmasıyla başlar.

Uzun protokolde pituiter ve over desensitizasyonu sağlanır. Overyan cevap TV usg ve serum östrojen seviyesi ile moniterize edilir. GnRHa enjeksiyonuna 5.000-10.000 human koryonik gonadotropin (hCG) verilene dek devam edilir (27). Bu yöntem ile IVF siklus iptal oranını daha az olduğu klinik gebelik oranı ve oosit sayısında olumlu etkileri ortaya koyulmuştur.

GnRH antagonistleri

GnRH antagonistleri, agonistlerle ilişkili kontrollü yumurtalık hiperstimülasyonu sırasında LH dalgalanmasını önlemek için kullanılabilir. Ganireliks ve setroreliks klinik kullanım için onaylanmış GnRH antagonistleridir. Fleksible rejim folikül boyutuna göre düzenlenen, daha az sayıda ve sürede ayarlanabilen bir protokoldür (28).

2.1.6.3. Ovulasyonun Tetiklenmesi

On yıllardır, 5000-10.000 IU insan koryonik gonadotropin (HCG) ovulasyonu tetiklemek için başarıyla kullanıldı. Endojen LH pikine benzer bir etkiyle ovulasyon tetiklemesini çok benzer bir etkiyle yapabilmektedir. HCG'nin uzamış yarı ömrü, uzun bir luteotrofik etkiye yol açar, bu da overyan hiperstimulasyon sendromu (OHSS) gelişme riskini artırır (29). Yapılan çalışmalar gösteriyorki OHSS riskinde GnRH analogları ile yapılan tetiklemeler sonrası nerdeyse hiç OHSS riskini arttırmadığı görülmüştür (30).

2.1.6.4. Luteal Faz Desteği

KOS sikluslarında ilk çalışmalar ayrıca, artmış progesteron seviyelerinin karakteristik özelliklerinin yanı sıra, önemli ölçüde azalmış luteal faz uzunluğuyla birlikte IVF sikluslarında anormal bir luteal fazın ortaya çıktığını doğruladı. Korpus luteumun hCG ile tetikleme yapılan vaklardan sonra daha iyi çalıştığı görülmüştür (31).

2.2. Folikuler Sıvısı ve Granülosa Hücresi

Hem kan folikül bariyerini geçen kan plazma bileşenlerinin hem de granülosa ve teka hücrelerinin sekretuar aktivitesinin bir ürünü olan folikül sıvısı(FS), oositlerin gelişimi için çok önemli bir mikroçevre oluşturur (32). Oositi çevreleyen FS'nin bazı biyokimyasal ve genetik özelliklerinin, oosit kalitesi ve embriyo gelişimi üzerine etki ettiği ve FS'nin fertilizasyon başarısında önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir. FS'nin bileşenleri dolaşımdaki biyokimyasal genetik çevreye de yansiyabileceğinden, FS komponentlerinin incelenmesi kan serumundaki metabolik değişimler hakkında da bilgi sağlayabilir .

OPU sırasında oositlerle birlikte aspire edildiğinden FS'nin temini oldukça kolaydır. Son yıllarda FS içeriğinin incelenmesi, çeşitli foliküllerden alınan sıvıda bir yada daha fazla mikroRNA(miRNA) analizi veya bunların o spesifik folikülden gelen oositin akıbetiyle ilişkilendirilmesi önem kazanmıştır.

FS'nin biyokimyasal bileşenlerinden bazıları hormonlar, büyüme faktörleri, interlökinler, reaktif oksijen türleri (ROT), anti-apoptotik faktörler, proteinler, peptidler ve amino asitler, şekerler, miRNA ve prostanooidlerdir (33).

Granülosa hücreleri; Oosit mayozu, ovulasyon ve fertilizasyon sırasında, her oosit birkaç granülosa hücre tabakası ile çevrilidir. Granülosa hücreleri, oosit parakrin sinyalleri aracılığıyla foliküler gelişim mediyatörleri olarak önemli bir rol oynamaktadır. Granülosa hücreler'lerinde eksprese edilen birçok genin hem maternal hem de oosit türevli sinyallerin kontrolü altında olduğu bildirilmiştir ve ekspresyonlarının oositlerin olgunlaşma yeterliliğini temsil ettiği ileri sürülmektedir (34).

2.3. MicroRNA

MicroRNA'lar (miRNA'lar), fonksiyonel formda tek sarmallı küçük 22 nükleotid içeren gen kodlaması yapmayan ribonükleik asit(RNA) molekülleridir. miRNA'lar protein kodlayan genlerin intronları ve eksonları içinde veya intergenik bölgelerde bulunur (35).Gen regülasyonu, hücre yapısı ve fonksiyonu üzerinde kontrol sağlar ve bir bitki veya insan olsun, bir organizmanın adaptasyon yeteneğine hücresel

büyüme, farklılaşma ve apoptozun temelidir. Bununla birlikte, yeni bir araştırma alanı, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde mikroRNA'ların (miRNA'lar) rolüne odaklanmaktadır. MicroRNA'lar, bitkilerden insanlara değişen organizmalarda transkripsiyon sonrası gen regülasyonunda rol oynayan kodlayıcı olmayan RNA'lardır. Bu RNA'lar düzenleyici özelliklerini ya hedef mRNA'yı parçalayarak ya da translasyonu baskılayarak iletir (36).

MicroRNA'lar ile ilgili over fonksiyon ve yapısı, infertilite yanısıra kanser araştırmaları, kardiyovasküler hastalıklar, kalp yetmezliği, inflamatuvar hastalıklar, otoimmün hastalıklar, dermatolojik hastalıklar, karaciğer hastalıkları, iskelet sistemi hastalıkları olmak üzere pek çok medikal durumlar hakkında çalışmalar mevcuttur (37).

2.3.1. MicroRNA ve Over İlişkisi

Çalışmalar gösteriyorki miRNA'ların patolojileri, doğurganlık ve over fonksiyonlarıyla ilişkilidir. miRNA moleküllerinin yumurtalıktaki genlerin düzenlenmesinde rol oynadıkları ileri sürülmektedir. Gen düzenleyicilerinin ana sınıflarından biri olarak bu miRNA moleküllerinin yumurtalıktaki genlerin düzenlenmesinde rol oynadıkları ileri sürülmektedir. Yumurtalıklardaki miRNA popülasyonu, mikrodiziler, yüksek verimli qPCR ve yeni nesil sekanslama teknikleri kullanılarak insan ve diğer türlerde tanımlanmıştır (38).

miR-21, miR-126, miR-125b, miR-143, miR-145, miR-99a, miR-199b yumurtalıktaki en sık bulunan miRNA popülasyonları olarak bulunmuştur (39).

miRNA'ların reproduktif dokularda muhtemel fonksiyonunu belirlemek için, over içinde çok sayıda miRNA'nın varlığını gösteren ekspresyon seviyeleri ölçülmüştür. Bununla birlikte, miRNA'nın fonksiyonel önemi ve mRNA hedeflerinin kimliği artık keşfedilmeye başlanmıştır.

2.3.2. MicroRNA ile Over Fonksiyon ve Patolojilerine Etkisi

MicroRNA overde gonadal gelişim, foliküler olgunlaşma, overde hormonal steroidogenez düzenlenmesi, overyan patolojilerin tespitinde biyobelirteç, granülosa

hücrelerin apoptozunun düzenlenmesi gibi overyan fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynamaktadır (40).

Polikistik over sendromu (PKOS) üreme çağındaki kadınlarının% 5-10'unu etkileyen en yaygın endokrinopatilerden biridir. Polikistik over sendromu ile ilgili tanı ve tedavideki tartışmalar devam etmektedir (41). microRNA ve PKOS ile ilgili yapılan bir çalışmada IVF uygulanan genç ve yaşlı kadınlardan elde edilen foliküler sıvıya dayanan MicroRNA profili, miR-21'in genç kadınların foliküler sıvısında daha fazla eksprese edildiği; miR-99b-3p, miR-134 ve miR-190b yaşlı kadınların foliküler sıvısında ekspresyonunun arttığı görülmüştür (42).

Çalışmalar miRNA'ların over fonksiyonlarını ve overde steroid hormon regülasyonunu kontrol edebildiğini gösterir (43).

Ayrıca spesifik miRNA'ların, çeşitli moleküler yollar üzerindeki etkileri yoluyla insan kanserlerinin başlaması ve / veya ilerlemesinde önemli rollere sahip olabileceği öne sürülmüştür. Kanserde miRNA ekspresyonunun daha iyi anlaşılması, yeni moleküler yolları veya bilinen yollar için yeni aktivasyon mekanizmalarını ortaya çıkarabilir. Over kanseri dokularında farklı şekilde eksprese edilen birkaç miRNA'nın olduğu ortaya koyulmuştur (44).

miRNA ve inferilite üzerine yapılan bir çalışmada PKOS'lu kadınlardan alınan FS örneklerinde, Gonadotropin tedavisine ve yumurtalık cevabına göre FS örneklerinde miRNA ekspresyon düzey farklılıkları araştırılmıştır ve anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (45). MiR-17-5p ve let7b eksikliği olan farelerde yapılan bir çalışmada korpus luteum yetmezliği ve infertilite ile sonuçlandığı ve bu farelere miR-17-5p ve let7b'nin yumurtalıklara enjekte edilmesi ile kısmen tersine döndüğü saptanmıştır (40).

3. MATERYAL ve METOD

Mevcut araştırma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi (SDÜTF) Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı işbirliği ile Mart 2019 ve Mart 2020 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Tez projesi için gerekli “etik kurul onayı” SDÜTF Etik Kurul Başkanlığı’ndan alınmış ve ayrıca hastalara araştırma hakkında ayrıntılı bilgi veren “bilgilendirme ve onam formları” okutularak, bilgi sahibi olmaları sağlanmıştır. Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından TTU-2020-7497 proje numarası ile desteklenmiştir.

3.1. Materyal

Çalışmaya dahil edilen hastalar için gerekli anamnezler alınacak, klinik ve biyokimyasal parametreler açısından değerlendirilerek ve antral folikül sayımı, antimüllerian hormon, FSH, TSH, primer veya seconder infertilite türleri, gravida, parite, erkek kaynaklı sperm faktörü, HSG sonucu, VKİ, yaş, sigara içimi, ovulasyon indüksiyonu sonra 10mm üzeri folikül sayısı değerleri kayıt altına alınacaktır. IVF siklusuna dahil olan hastalarda oosit pick up (OPU) işlemi ile toplanan folikül sıvısı ve granülosa hücre örnekleri de kullanılmıştır. Folikül sıvısı, içinde oosit ya da oositler ile bir miktar kan içeren bir örnektir. Rutin prosedür gereği OPU işlemi sırasında bu sıvıdan hızlı bir şekilde oosit ya da oositlerin uzaklaştırılması ve farklı bir kültür ortamına aktarılması istenmektedir. Aktarmayı takiben ise bu sıvı atılmaktadır. Granülosa hücreleri de rutin IVF prosedürü gereği oositler etrafından uzaklaştırılarak hem işlemin sağlığı hem de döllenmenin gözlenmesi için mekanik ya da enzimatik olarak uzaklaştırılarak atılmaktadır. Çalışma için bu sıvı ve granülosa hücreleri atılmayarak -80°C’de miRNA ekspresyon düzeylerini belirlemek üzere iki farklı laboratuvar da yedeklenerek saklanmıştır.

3.2. Metod

Çalışmaya Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları Doğum Anabilim Dalı Tüp Bebek Ünitesi'ne başvuran toplam 52 hasta dahil edilmiştir. Çalışmaya kadın kaynaklı ve erkek kaynaklı organik patoloji saptanmamış takip edilen 26 hasta ve herhangi bir kadın kaynaklı organik faktör bulunmayan erkek kaynaklı infertilite tanısıyla takip edilen 26 hasta dahil edilmiştir. Tüp bebek ünitesine tedavi almak üzere başvuran hastalardan çalışma kriterlerini sağlayan gönüllüler çalışmaya kabul edilmiştir. Her iki çifte ait infertilite etyolojisi olan çiftler ya da herhangi başka bir endikasyon (PKOS, endometriozis, tubal faktör, düşük over rezervi) ile tedavi planlanan vakalar çalışma dışı bırakılmıştır. Çalışmaya dahil edilecek olan tüm kişilerden araştırma hakkında sözlü ve yazılı olarak ayrıntılı bilgilendirildi ve çalışmayı kabul edenlerden “bilgilendirilmiş gönüllü olur” alındı.

3.2.1. Hastaların Seçimi

Hastaların fizik muayene ve jinekolojik muayeneleri yapılmasını takiben tüm hastalardan mensin 3. günü hormon profili (bazal FSH, LH, progesteron, estradiol, prolaktin) bakıldı. Tüm hastalara adet 7-10. günleri arasında HSG çekildi. Üroloji bölümünden konsültasyon istenerek eşlerinden 3 gün cinsel perhizden sonra sperm analizi yapıldı. Beş folikül'den az düşük over yanıtı, 5-15 folikül arası normal ve 15 folikül ve üstü polikistik benzeri over olarak değerlendirildi (46). Çalışmaya alınan 52 infertil hasta 2 gruba ayrıldı; ilk grupta erkek kaynaklı infertil çiftlerden kadın kaynaklı bir patolojisi olmayan infertil çiftler, ikinci grupta ise erkek ve kadın kaynaklı patolojisi saptanamayan infertil çiftler bulunmaktaydı. Çalışma gruplarında yapılan TV USG'de antral folikül sayısı (AFS) ve ovulasyon indüksiyonu sonrası 10 mm ve üzeri gelişen folikül sayısı da kaydedildi. Bunun için Logio 200 marka USG cihazı ve 6,5 MHz'lik vaginal prob kullanıldı.

Tüm hastaların yaş, meslek, infertilite süresi, sigara, alkol kullanımı, ek hastalık varlığına göre demografik özellikleri kaydedildi. Anestezi doktoruna konsülte edilerek preoperatif değerlendirilmesi sağlandı, tüm hastalar için preoperatif sakınca olmadığı bilgisi alındı.

Açıklanamayan infertilite spermiogram, ovulasyon, HSG ve eğer gerekli ise overyan rezerv testleri ve laparoskopi incelemeleri normal olan hastalar açıklanamayan infertil grubu olarak kabul edildi (47). Bu gruptaki hastalar en az 1 yıl süre ile infertil olan, 21-35 gün arası değişen düzenli menstrual sikluslara sahip, ovulasyon kanıtı olan (midluteal serum PG>5 ng/ml), siklusun 2. günü FSH<10-15 IU/L değerine sahip, HSG ile normal tubal patens izlenen ve normal sperm parametreleri olan hastalardı.

Erkek faktörü grubu ise; kadında infertiliteyi ekarte ettiğimiz ve erkekte çeşitli faktörlere (hipotalamohipofizer, testiküler, post-testiküler vb) bağlı olarak semen analizi sonuçları WHO 2010 kriterlerine (sperm göre oligospermi sayısının normalin altında olması konsantrasyon <15milyon), azospermi (semende hiç sperm bulunmaması), treatozoospermi (< %4 normal form sperm), astenospermi (motil sperm yüzdesinin düşük olması <%32 progresif motil), oligoastenospermi (sperm sayı ve motilitesinin normalin altında olması, konsantrasyon< 15 milyon ve <%32 progresif motil) olarak değerlendirilen İCSİ işlemi için mastürbasyon ve ya TESE yapılarak sperm elde edilen hastalardan oluşmaktaydı (48).

Çalışmaya dahil edilme kriterleri aşağıdaki şekildedir:

1. Ek hastalık olmaması (hipotirodi, hipertirodi, hiperprolaktinemi, diabetes mellitus)
2. IVF siklusuna dahil olmuş olmak
3. 20-38 yaş arası infertil çiftler
4. Erkek kaynaklı infertil çiftlerden kadın kaynaklı bir patolojisi olmayan infertil çiftler (kontrol grubu için)
5. Herhangi bir kadın ve erkek kaynaklı organik faktör bulunmayan açıklanamayan infertilite tanısıyla takip edilen çiftler (çalışma grubu için)

Çalışmadan çıkarılma kriterleri ise aşağıdakilerden oluşmaktaydı:

1. Çalışma süresince takipten çıkmış olma
2. Tedavi sürecini etkileyecek başka sistem hastalığının varlığı
3. Tetkik ve tedaviyi kabul etmeyenler

4. IVF sikluslarında oosit elde edilememesi veya fertilasyon yöntemlerinde fertilizasyonun gerçekleşmemesi

5. Bilinen kadın kaynaklı organik bir patolojisi olan infertil çiftler (örneğin PKOS, endometriozis, düşük over rezervi ve diğerleri)

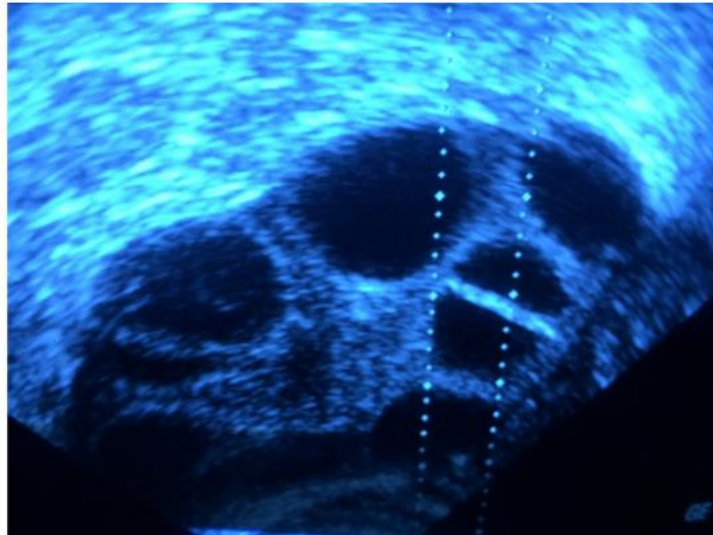
3.2.2. Kontrollü overyan hiperstimülasyon

Çalışmamıza katılan infertil kadınların ilk değerlendirilmeleri sonrası rekombinant FSH başlangıç düzeyleri, yaş, antral folikül sayısı, kilo, bazal FSH değerleri, daha önceki stimülasyon rejimine olan cevabı göz önüne alınarak bireysel olarak hesaplandı. Folikül gelişiminin takibi amacıyla gonadotropin tedavisinin 5. gününde ultrasonografi sonucuna göre gonadotropin doz ayarlaması yapıldı ve seri yapılan ultrasonografi takibi ile folikül gelişimi takibi yapıldı. Gonadotropin stimülasyonu başlanmadan önce siklusun 3. gününde overyan foliküler aktivite ve 10 mm'yi geçen büyük folikül kisti açısından transvaginal ultrasonografi ile değerlendirildi çalışmaya katılan kadınlarda bu tip bir patolojiye rastlanılmadı. Kontrollü overyan hiperstimülasyon protokollerinden uzun protokol GnRH agonisti veya kısa protokol GnRH antagonist başlandı. Uzun protokol GnRH agonisti uygulanan kadınlara önceki siklusun mid-luteal fazında (21. gün) 0.5 mg/gün leuprolide asetat (Lucrin flakon 1mg Abbott, Türkiye) veya 0,1 mg triptorelin asetat (Decapeptyl enjektabl 0,1 mg Ferring, Türkiye) başlandı. Uygun dozda gonadotropin ile stimülasyon siklusun 3.gününde başladıktan sonra leuprolide asetat veya triptorelin asetat dozu yarıya düşürülerek gonadotropin tedavisi boyunca aynı dozdan devam edildi. Kısa protokolle GnRH antagonist uygulanan kadınlar menstrüal siklusun 3. günü hormonal ve sonografik olarak değerlendirildi. Sonografik olarak foliküler veya korpus luteum kisti saptanmayan ve hormon düzeyleri normal sınırlarda olan hastalara siklusun 3. gününde uygun dozda gonadotropin stimülasyonuna başlandı. En büyük folikül 13 mm çapa ulaştığında ya da E2 > 800 pg/ml olduğunda cetrotreliks 0,25 mg/gün subkutan (sc) (Cetrotide flakon 0,25 mg, Merck Serono, İstanbul, Türkiye) veya ganireliks 0,25mg/gün sc (Orgalutran kullanıma hazır enjektör 0,25 mg, Schering Plough, İstanbul, Türkiye) başlanarak hCG gününe kadar gonadotropinlerle birlikte kullanıldı. Stimülasyonda rekombinant FSH (Gonal-F RFF Pen -folitropin alfa injection, Merck Serono, İstanbul, Türkiye; Puregon Schering-

Plough, İstanbul, Türkiye) veya üriner FSH (Menogon 75 U ampul, Ferring, İstanbul, Türkiye) kullanıldı. Dört IVF sertifikası olan araştırmacı tarafından bu protokoller yürütüldü.

3.2.3. Oosit Pick-up İşlemi ve folikül sıvısı granüloza toplanması

Seri yapılan ultrasonografiler sonucunda iki veya daha fazla folikül >17 mm ulaştığında rekombinant hCG (Ovitrelle PreFilled Syringe choriogonadotropin alfa injection, 250 mikrogram, Merck Serono, İstanbul, Türkiye) uygulandı. Hasta takip formlarına her kontrolde ultrasonografiyle folikül sayısı ve endometrium kalınlığı kaydedildi. Hastalar rekombinant hCG (Ovitrelle PreFilled Syringe choriogonadotropin alfa injection, 250 mikrogram, Merck Serono, İstanbul, Türkiye) uygulamasından yaklaşık 36 saat sonra genel anestezi altında jinekolojik masada uygun litotomi pozisyonunda hazırlanarak OPU işlemine alındı. OPU işlemi sırasında hasta litotomi pozisyonunda steril koşullarda hazırlandı. Vaginal spekulum yerleştirildikten sonra vagen steril serum fizyolojik ile yıkandı. Çift lümeni bulunan 17 mm ve 30 cm ebatlarında oosit aspirasyon iğnesi kullanılarak transvajinal yoldan oosit toplama işlemi uygulandı. Bu işlem sırasında folikül sıvıları ve granüloza hücreleri toplandı (Şekil 1).



Şekil 1. Oosit pick-up işlemi sırasında overin ultrasonografik görünümü

3.2.4. Folikül Sıvılarının ve Granülosa Hücrelerinin Elde Edilmesi ve Hazırlanması

OPU işlemi esnasında aspire edilen folikül sıvı (FS) örneklerinden embriyolog tarafından oositler ayrıştırıldı. Granülosa hücrelerinin izolasyonunda oosit toplama işlemi yapılan bu hastalardan her bir oosit etrafındaki korona radiata tabakasının mekanik ve enzimatik olarak ayrılması ile granülosa hücreleri elde edildi, enzimatik ayırma işlemi için ticari olarak hazırlanan (HYASE-10X™, Vitrolife AB Box 9080, 400 92 Göteborg, Sweden) hiyaluronidaz enzimi kullanıldı.

Sarı berrak renkli olan folikül sıvıları ve granülosa hücreleri eppendorf tüplere konuldu.

Çalışmaya dahil edilen hastalardan OPU işlemiyle alınan materyal oosit ayırma işlemi sonrası folikül sıvısı ve granülosa hücreleri ayrıştırıldı, 1500 rpm devirde eppendorf tüplerinde 15 dakika santrifuj edilerek serum elde edildi (Şekil 2).



Şekil 2. Granülosa hücrelerinin izolasyon aşamaları (SDÜ Tıp Fakültesi IVF Ünitesi)

3.2.5. Folikül ve Granülosa Hücrelerinin Tüpe Alınması ve Saklanması

Granülosa hücreleri ve FS örnekleri miRNA düzeylerinin tayinine kadar eppendorf tüplerine iki porsiyona ayrılarak -80°C’de saklandı.

3.2.6. İCSI İşlemi, Embriyo Değerlendirilmesi ve Transferi

OPU günü hastanın eşinden mastürbasyon veya testicular sperm extraction (TESE) yoluyla elde edilen spermelerin likefaksiyon sonrası sayı ve motilitesi değerlendirildi. Her hastada eşinin spermleri kullanıldı. Alınan spermler swim-up veya

gradient yöntemlerinden geçirildikten sonra modifiye insan tubal sıvı medyumunu (PureSperm 40/80 Nidacon international Mölndal Sweden) ile yıkanarak hazırlandı. Oositler, petri kabında %7 sentetik serum ilave edilmiş modifiye insan tubal sıvı medyumuyla (Vitrolife G-TL Europe Sweden AB) 37⁰ C'de ve %5 CO₂ ortamında inkube edildi. Alınan MII oositler, içinde 5 µl' lik HEPES tamponlu damlaların olduğu petri kabına yerleştirildi ve İCSI işlemi uygulandı. **Fertilizasyon** İCSI prosedurundan bir gün sonra değerlendirildi ve 2 pronukleus gözlenen oositler fertilize olarak kabul edildi (Şekil 3).



Şekil 3. İki polar cismi de içeren fertilize oosit

Embriyolar 1. 3. ve 5. günde değerlendirildi. Embriyolar Tip A (mükemmel) kalite ve Tip B (iyi) kalite olarak sınıflandırıldı. 1. gün embriyoların İCSI'den 16-18 saat sonra fertilizasyon kontrolleri yapıldı. 2 pronükleus görülmüş olması oositin fertilize olduğu lehine yorumlandı. Fertilize olan embriyolara 3. gün klivaj kontrolü yapıldı. Tip A (mükemmel) embriyolar, nükleer fragman içermeyen Tip B (kaliteli) embriyolar, anükleaz fragmanları ile doldurulmuş embriyo hacminin maksimum% 20'sine sahiptir, C tipi embriyolarda, anükleaz fragmanları embriyo hacminin% 21 ila% 50'sini temsil edenler, olarak değerlendirildi. A, B ve C tipi embriyolar transfer için uygun olarak değerlendirildi. Çalışmaya katılan hastaların hepsi Tip A ve Tip B embriyo kalitesine sahipti. 5. gün değerlendirmesinde embriyolar gelişim aşamaları, iç hücre kitlesi ve trofoektoderm hücrelerinin yapısına göre değerlendirildi.

Embriyolar Wallace kateteri (Sure View embriyo replacement catheter Wallace Ltd., made in Mexico, Smiths medical) ile TV-USG eşliğinde transfer edildi. Hastanın yaşı ve elde edilen embriyoların sayısı ve kalitesi göz önüne alınarak 1 embriyo transfer (ET) edildi. Tüm hastalara luteal destek sağlamak amacıyla OPU

gününden 1 gün sonra başlayarak intravaginal progesteron jel (Crinone %8 jel, Merck Serono) uygulandı. Embriyo transferinden 12 gün sonra kanda bakılan hCG'nin pozitif olması implantasyon olarak kabul edildi. Embriyo transferinden 5 hafta sonra TV-USG'de uterin kavitede gestasyonel kese izlenmesi klinik gebelik olarak kabul edildi. Viabl canlı bebek doğurmak (500 gram üzeri ve/veya 24. gebelik haftasından sonra doğum yapmak) eve bebek götürme, 500 gram altı ve/veya 20. gebelik haftasından önce olan gebelik kaybı ise abort olarak değerlendirildi.

3.2.7. Folikül Sıvısı ve Granülosa Hücrelerinde Araştırılan Parametrelerin Tayini

Granülosa ve folikül sıvılarından birer tane örnek alınarak miRNA izolasyonu yapıldı (mir-17-5p, mir-21, mir-126). Nanodrop ölçümleri istenen miktarlarda idi. Syber Green kullanılarak örneklerin optimizasyon çalışması yapıldı. RT-PCR koşulları ayarlanarak run verildi ve bir okuma sonucu elde edilen CT mean değerleri aşağıda verildiği şekilde bulundu.

3.2.8. Genetik Çalışma

Plazmadan total RNA izole edildi. İzole edilen total RNA'ların nanodrop spektrofotometre cihazıyla ölçümleri yapıldı. A260/280 oranı 1.8'in altındaki veya A260/230 oranı 2.0'ın altında olan örnekler çalışmaya dahil edildi. Elde edilen total RNA çalışmaya kadar -80 C'de saklandı. Saklanan total RNA örneklerinden miRNA izolasyonu yapıldı.

3.2.8.1. miRNA izolasyon protokolü

1) 200µL serum+500µL RiboEx pipetaj yaparak eklenecek ve 5dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

2) 1,5ml lik tüp üzerine 100µl kloroform eklenecek ve alt üst yapılarak 2 dk oda ısısında bekletildi.

3) 12.000g'de 1 dk santrifüj yapılarak sulu faz başka ependorfa aktarılacak ve üzerine %50 etanol eklenerek başka bir kolona aktarılacak. 11.000rpm'de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi.

4) Altta kalan toplama kabında kalan hacim kadar %100 etanol eklenecek ve pipetaj yapıldı.

5) Karışım başka bir kolona aktarılacak. 11.000 rpm'de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi.

6) Collection tüp değiştirilerek 500µL Buffer eklenecek, 11.000 rpm'de 1 dk oda ısısında santrifüj edilecek. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.

7) Daha sonra membranın tam merkezine gelecek şekilde 50µL RNase-free su eklenecek ve 2dk oda sıcaklığında bekletildi.

8) 11,000rpm de 2 dk santrifüj edilecek ve elde edilen örnek -20°C' ye kaldırıldı.

3.2.8.2. cDNA izolasyon protokolü:

miRNA ekspresyon miktarının tayini için, elde edilen total miRNA'lardan çalışılacak her bir miRNA için ayrı ayrı stem loop primeriyle cDNA elde edildi. Bunun için; 10X Reaction Buffer, Stem-loop primer, 20X dNTP mix, miRNA, WizScript™ RTase, RNase Inhibitor, RNase free Water ürünleri toplam 10µl' ye tamamlanarak PCR striplerine koyularak thermal cycler'a yerleştirildi. Thermal cycler döngü protokolü 25°C'de 10 dk, 37°C'de 120 dk, 85°C'de 5 dk şeklinde programlandı.

3.2.8.3. RT-PCR Protokolü:

Çalışmaya başlamadan önce plate dizaynı yapılacak ve cDNA hariç PCR miksi hazırlanmış(2X Syber Green Master mix, Forward primer, Reverse Primer, ROX, cDNA, Su). cDNA örneği her bir kuyuya eşit miktarda eklendi (örneğin; 16ul mix+4ul cDNA). Plate kapatılarak RT-PCR cihazına yerleştirildi. RT-PCR koşulları; 95°C'de 10 dk, 95°C'de 15 sn, 60°C'de 1 dk 40 döngü olacak şekilde programlandı.

3.2.8.4. Verilerin Değerlendirilmesi:

Rölatif kantitasyon analizi “ $2^{-\Delta\Delta CT}$ Yöntemi” metodu kullanılarak tanımlandı. Bunun için; miRNA ekspresyon kantifikasyonu küçük nüklear ribonükleoprotein olan U6 snRNA referans olarak kullanılıp kontrol grubuna göre normalize edildi.

- Her bir örneğe ait, her bir genin Ct değerleri, o örneğin housekeeping Ct (U6 CT) değerinden çıkartılacak delta siklus eşiği (ΔCt) değerleri hesaplandı

- Daha sonra her bir hastanın ΔCt değerleri kontrol grubunun ortalama Ct değerinden çıkartılacak deltadelta siklus eşiği ($\Delta\Delta Ct$) değerleri hesaplandı

- Son olarak; her bir miRNA'nın ne kadar eksprese olduğu hesaplamak için, son değerin başlangıca olan oranı alınarak (fold change) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri belirlendi.

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri 2'nin üzerindeyse artış, 1'in altındaysa ekspresyonda azalma olmuştur şeklinde yorumlandı.

3.2.9. İstatistiksel Analiz

Araştırmada nominal ve ordinal verilerin tanımlanmasında frekans analizi, ölçüm değerlerinin tanımlanmasında ortalama ve standart sapma değerleri kullanıldı. Nominal ve ordinal verilerin fark analizinde Ki-Kare Testi ve Ki-Kare Benzerlik Oranı (Likelihood Ratio) kullanıldı. Ölçüm verilerinin fark analizinden önce, verilerin dağılımının normallik testi için Kolmogorov Smirnov testi kullanıldı. Test sonucu normal dağılıma uyan parametrelerin iki grup arasındaki farkı için Bağımsız örneklem T-Testi, normal dağılıma uymayan parametrelerin ikili grup farkı için Mann Whitney U testi kullanıldı. Korelasyon analizi için Spearman's rho analizi kullanıldı. Tüm analizler %95 güven aralığında ve 0.05 anlamlılık düzeyinde gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

Çalışmamıza infertilite nedeniyle başvuran IVF tedavisi alan 52 kadın hasta dahil edildi. Çalışmaya katılan hastalarımızı açıklanamayan infertilite nedeniyle infertil kabul edilen hastaların oluşturduğu grup (n=26) ve erkek faktör nedeniyle infertil kabul edilen hastaların oluşturduğu grup (n=26) olmak üzere iki gruba ayrıldı ve miRNA ekspresyon düzeylerinin analizi yapıldı.

4.1 Erkek kaynaklı infertil grupta bulunan kadınlar ile açıklanamayan infertil grupta bulunan kadınların bazı demografik özelliklerinin karşılaştırılması

Erkek kaynaklı infertil grupta bulunan kadınlar ile açıklanamayan infertil grupta yer alan kadınlara ilişkin bazı demografik özellikler Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. Erkek kaynaklı infertil grupta bulunan kadınlar ile açıklanamayan infertil grupta bulunan kadınlar’a ilişkin bazı demografik özellikleri

	Erkek kaynaklı infertil grup (n=26)	Açıklanamayan infertil grup (n=26)	Toplam (n=52)	p
Yaş, Ortalama±SS	28.96±5.21	28.27±3.99	28.62±4.61	0.593 ^a
BMI, Ortalama±SS	26.04±3.81	25.19±4.52	25.62±4.16	0.469 ^a
Süre, Ortalama±SS	4.62±3.06	4.54±2.63	4.58±2.82	0.810 ^b
Sigara, n (%)				
Yok	20 (76.9)	13 (50.0)	33 (63.5)	0.044 ^c
Var	6 (23.1)	13 (50.0)	19 36.5)	

a. Bağımsız Örneklem T-Testi, b. Mann Whitney U Testi, c. Ki-Kare Testi.

Erkek kaynaklı infertil gruptaki kadınların yaş ortalaması açıklanamayan infertil gruptaki kadınların yaş ortalamalarından daha büyük olduğu görüldü, fakat

gruplar arasındaki yaş farkları arası anlamlı istatistiksel sonuç bulunmamıştır($p>0.05$). VKİ değeri erkek kaynaklı infertil grupta bulunan kadınlarda daha yüksek olsa da, iki grup arasındaki farklar anlamlı değildi ($p>0.05$). Yine süre ortalaması erkek kaynaklı infertil grubunda daha yüksek olsa da, bu farkın da istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$). Sigara kullanımı erkek kaynaklı infertil grubunda %23.1 iken, açıklanamayan infertil grubunda ise %50.0 olarak bulundu ve gruplar arasındaki sigara kullanımı farkı istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edildi ($p<0.05$).

4.2 Erkek kaynaklı infertil grupta bulunan kadınlar ile açıklanamayan infertil grupta bulunan kadınların bazal hormon değerlerine göre karşılaştırılması

Olgu gruplarının hormon değerlerinin ortalama değerleri ile fark analizi sonuçları Tablo 4.5’de verilmiştir.

Tablo 5. Erkek kaynaklı infertil grupta bulunan kadınlar ile açıklanamayan infertil grupta bulunan kadınların bazal hormon değerleri ile fark analizi sonuçları

	Erkek kaynaklı infertil grup (n=26)	Açıklanamayan infertil grup (n=26)	Toplam (n=52)	P
AMH	3.64±2.06	3.90±3.21	3.77±2.67	0.729 ^a
FSH	6.86±2.41	7.82±3.99	7.34±3.30	0.299 ^a
TSH	1.99±1.17	2.02±1.89	2.01±1.56	0.833 ^b

a. Bağımsız Örneklem T-Testi, b. Mann Whitney U Testi.

AMH, FSH ve TSH seviyeleri açıklanamayan infertil grup grubunda daha yüksekti. Fark analizi sonuçlarına bakıldığında, her iki gruplar arasında bu farkların istatistiksel olarak anlamlı sonuçların olmadığı belirlendi ($p>0.05$).

4.3 Erkek kaynaklı infertil grupta bulunan kadınlar ile açıklanamayan infertil grupta bulunan kadınların folikül ve granülosa hücrelerinde miR-21, miR-17-5P miR-126 ekspresyon düzeylerine göre fark analizleri

Tablo 6. Erkek kaynaklı infertil grupta bulunan kadınlar ile açıklanamayan infertil grupta bulunan kadınların folikül ve granülosa hücrelerinde miR-21, miR-17-5P miR-126 ekspresyon düzeyi ortalama değerleri ile fark analizi sonuçları

	Erkek kaynaklı infertil grup (n=26)	Açıklanamayan infertil grup (n=26)	Toplam (n=52)	p
Δ Ct miR-17-5p folikül	-4.87 $\pm$ 1.88	-5.72 $\pm$ 2.18	-5.29 $\pm$ 2.06	0.138
Δ Ct miR-21 folikül	5.16 $\pm$ 1.30	4.51 $\pm$ 1.59	4.83 $\pm$ 1.47	0.116
Δ Ct miR-126 folikül	-4.58$\pm$2.27	-3.19 $\pm$ 2.07	-3.89 $\pm$ 2.26	0.025
Δ Ct miR-17-5p granülosa	-5.78 $\pm$ 1.46	-7.09$\pm$1.09	-6.44 $\pm$ 1.44	0.001
Δ Ct miR-21 granülosa	4.34$\pm$1.55	3.30 $\pm$ 1.27	3.82 $\pm$ 1.50	0.011
Δ Ct miR-126 granülosa	-5.46$\pm$1.64	-4.43 $\pm$ 1.27	-4.94 $\pm$ 1.54	0.014

Tablo 6'daki verilere göre folikül sıvısındaki miR-17-5p ve miR-21 ekspresyon düzeylerinin her iki grup arasında fark analizi sonuçları istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Folikül sıvılarındaki miR-126, granülosa hücrelerindeki miR-17-5p, miR-21 ve miR-126 ekspresyon düzeyi farkları ise istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). miRNA değerlerinin Δ CT, -yani değişim değerleri alındığından, mutlak değeri büyük olanlarda değişim daha yüksekti. Buna göre folikül sıvılarındaki miR-126, granülosa hücrelerindeki miR-21 ve miR-126 değişim ortalamaları erkek kaynaklı infertil grubunda, granülosa hücrelerindeki miR-17-5p değişim ortalaması ise açıklanamayan infertil grubunda daha yüksek düzeydeydi.

Erkek kaynaklı infertil grup ile folikül sıvısı ve granülosa hücrelerinde miRNA ekspresyon düzeyi parametreleri arasındaki ilişki için yapılan Spearman's rho korelasyon analizi sonuçları Tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 7. Erkek kaynaklı infertil grup ile Açıklanmayan infertil kadınların folikül sıvısı ve granülosa hücrelerinde miRNA ekspresyon düzeyi parametreleri arasındaki ilişki için yapılan Spearman's rho korelasyon analizi sonuçları

	r	p
Δ Ct miR-17-5p folikül	-0.161	0.253
Δ Ct miR-21 folikül	-0.274*	0.049
Δ Ct miR-126 folikül	0.325*	0.019
Δ Ct miR-17-5p granülosa	-0.441**	0.001
Δ Ct miR-21 granülosa	-0.325*	0.019
Δ Ct miR-126 granülosa	0.374**	0.006

*p<0.05 **p<0.01

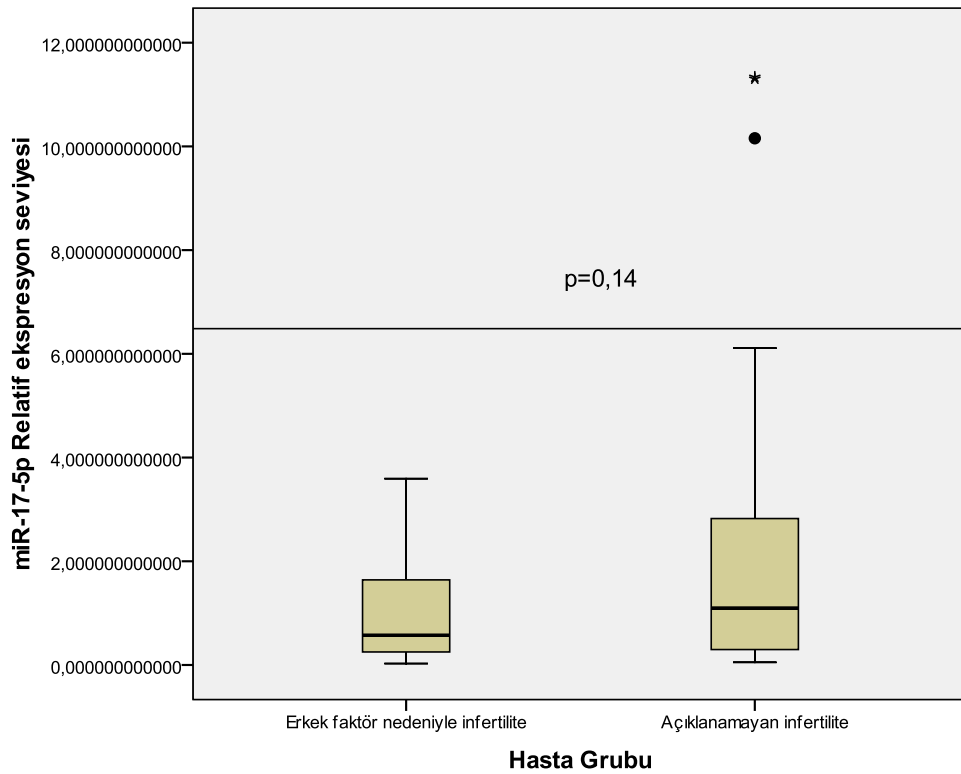
Korelasyon analizi sonuçlarına göre erkek kaynaklı infertil grup ile folikül sıvılarında bakılan miR-21 ($r=-0.274$; $p<0.05$), miR-126 ($r=-0.274$; $p<0.05$), granülosa hücrelerinde bakılan miR-17-5p ($r=-0.441$; $p<0.01$) ve miR-126 ($r=-0.374$; $p<0.01$) arasında istatistiksel olarak anlamlı ve negatif yönde ilişki vardı. Erkek kaynaklı infertil grupta folikül sıvılarında bakılan miR-126 değerleri ($r=0.325$; $p<0.01$) arasında ise istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yönde ilişki vardı.

Araştırmada iki grup arasında anlamlı çıkan miRNA parametreleri ve sigara kullanımının, açıklanamayan infertilitenin bağımlı değişken olduğu lojistik regresyon analizi sonuçları Tablo 4.8'de verilmiştir.

Tablo 8. miRNA parametreleri ve sigara kullanımının, açıklanamayan infertilitenin bağımlı değişken olduğu lojistik regresyon analizi sonuçları

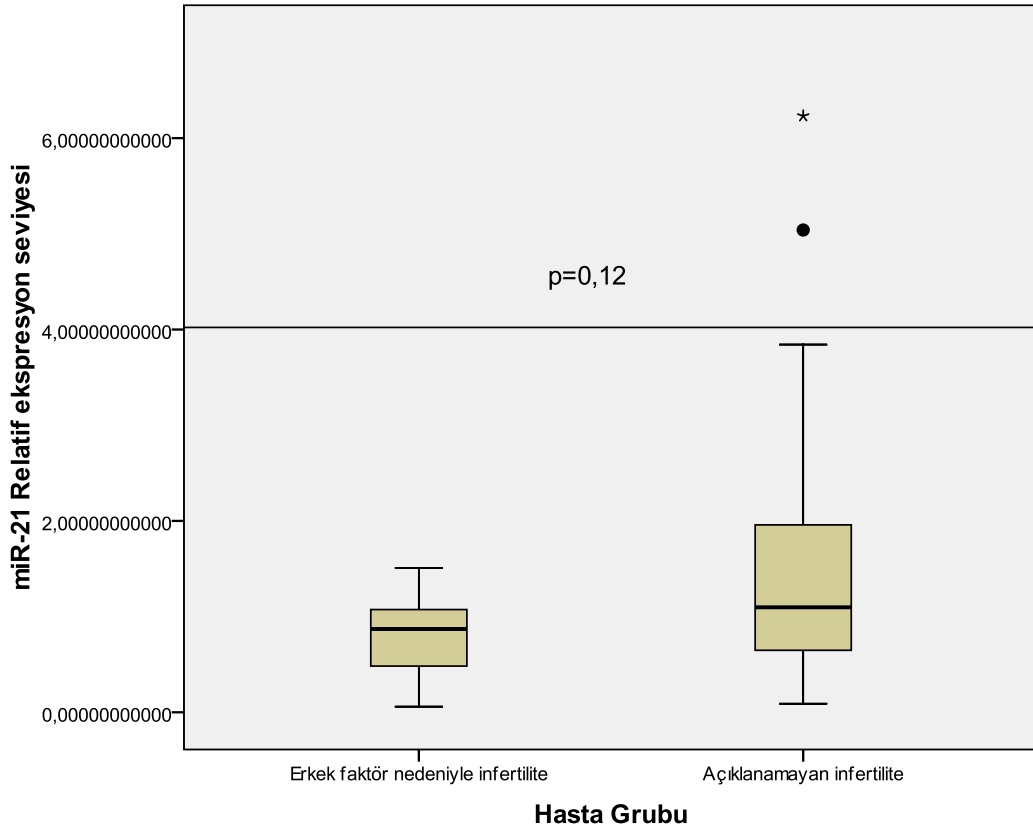
	B	S.E.	Wald	p	OR
Sigara(1)	-1.900	1.153	2.717	0.099	0.150
Δ Ct miR-126 folikül	0.010	0.230	0.002	0.966	1.010
Δ Ct miR-17-5p granülosa	-1.535	0.493	9.694	0.002*	0.216
Δ Ct miR-21granülosa	-0.759	0.398	3.631	0.057	0.468
Δ Ct miR-126 granülosa	1.488	0.433	11.806	0.001*	4.428
Sabit	1.566	3.463	0.204	0.651	4.786

Regresyon analizi sonuçlarına göre açıklanamayan infertil grup ile granülosa hücrelerinde bakılan miR-17-5p ve miR-126 arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki vardı ($p < 0.05$).



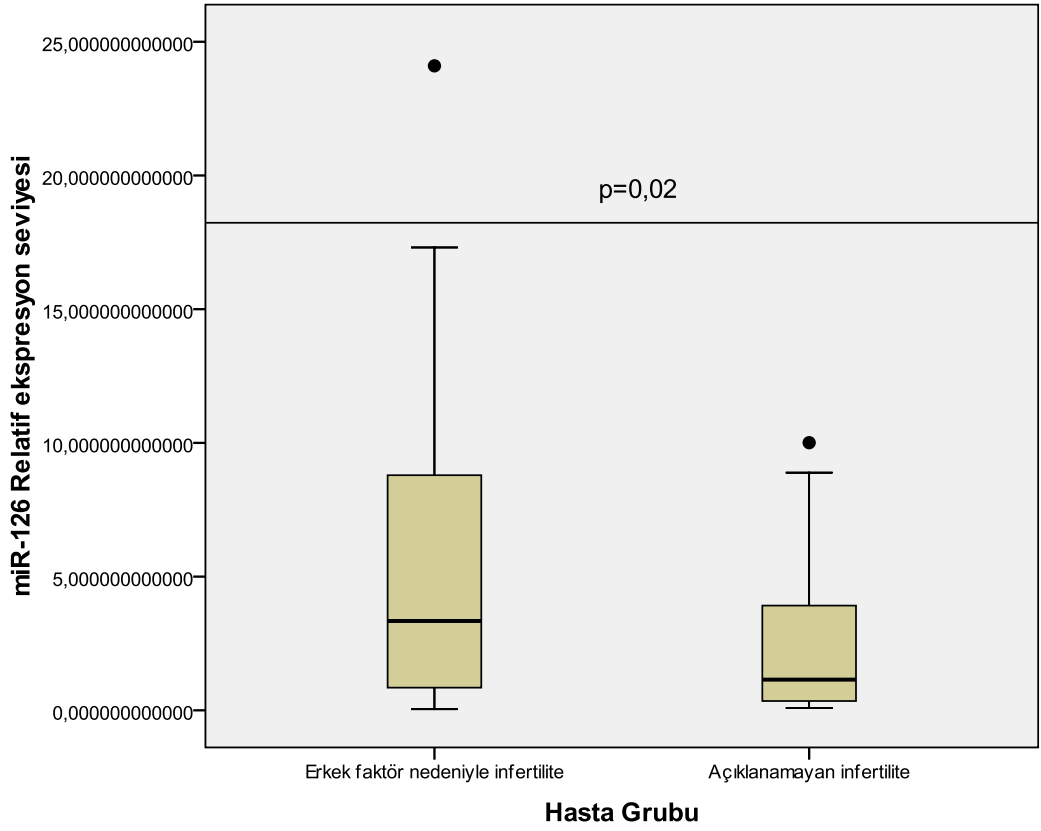
Şekil 4. Folikül sıvısı miR-17-5p relatif ekspresyon seviyesinin fertilité gruplarına göre farkı

Şekil 4'te de görüldüğü üzere, erkek faktör olan grubun folikül sıvılarında miR-17-5p ortalaması daha düşüktü. Değişim aralığı da erkek faktör grupta, açıklanamayan infertilite grubuna göre daha düşüktü. Açıklanamayan infertilite grubunda hem değişim aralığı yüksekti, hem de iki hastada folikül sıvılarında miR-17-5p değişim aralığının dışında uç değer almıştı.



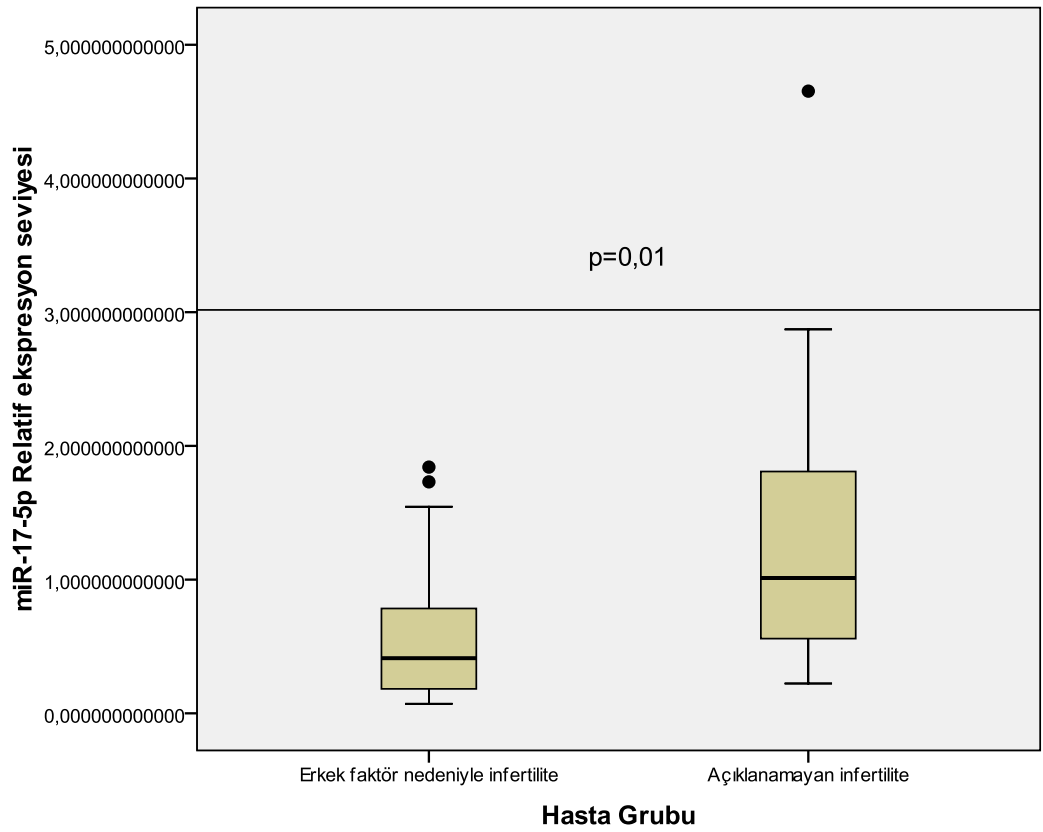
Şekil 5. Folikül sıvısı miR-21 relatif ekspresyon seviyesinin fertilite gruplarına göre farkı

Şekil 5'de de görüldüğü üzere, erkek faktör olan grubun folikül sıvısında miR-21 ortalaması daha düşüktü. Değişim aralığı da erkek faktör grupta, açıklanamayan infertilite grubuna göre daha düşüktü. Açıklanamayan infertilite grubunda hem değişim aralığı yüksekti, hem de iki hastada folikül sıvısında miR-21 değişim aralığının dışında uç değer almıştı.



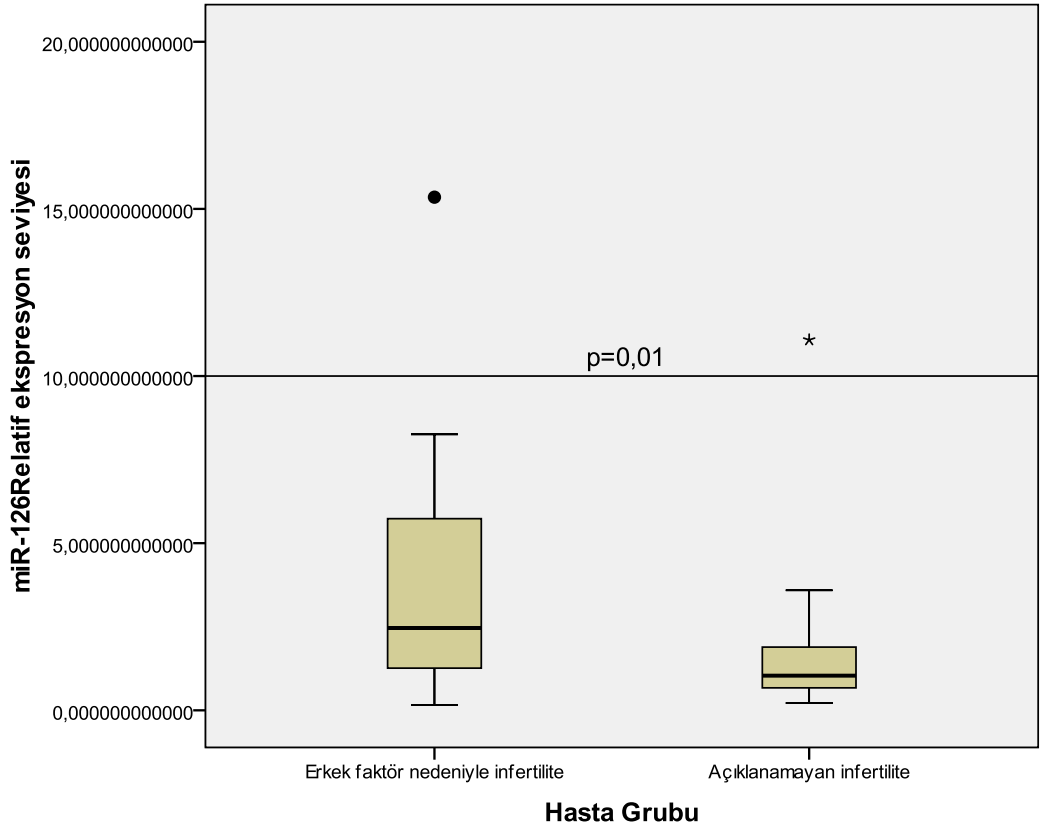
Şekil 6. Folikül sıvısı miR-126 relatif ekspresyon seviyesinin fertilite gruplarına göre farkı

Erkek faktör olan grubun folikül sıvısında miR-126 ortalaması daha yüksekti (Şekil 6). Değişim aralığı da erkek faktör grupta, açıklanamayan infertilite grubuna göre daha yüksekti. Açıklanamayan infertilite grubunda hem değişim aralığı düşüktü, hem de bir hastada folikül sıvısında miR-126 değişim aralığının dışında uç değer almıştı.



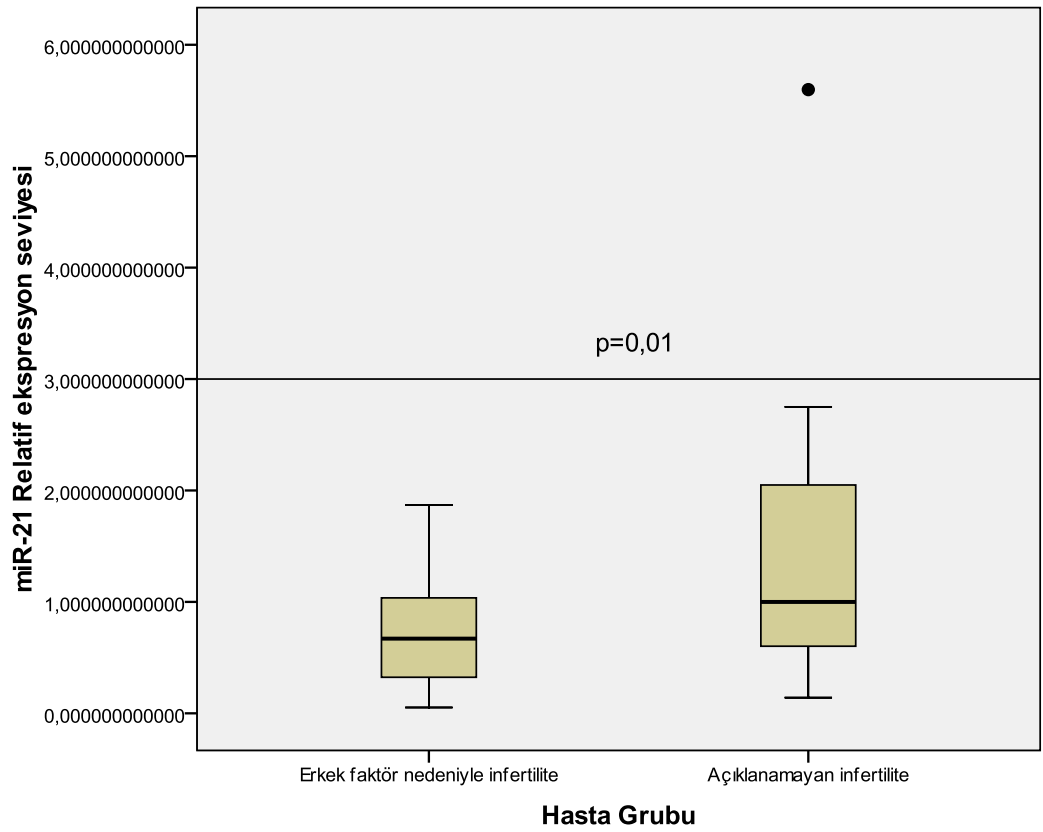
Şekil 7. Granülosa hücrelerinde miR-17-5p relatif ekspresyon seviyesinin fertilitte gruplarına göre farkı

Şekilde 7’de de görüldüğü üzere, erkek faktör olan grubun granülosa hücrelerinde miR-17-5p ortalaması daha düşüktü. Değişim aralığı da erkek faktör grupta, açıklanamayan infertilite infertilite grubuna göre daha düşüktü. Açıklanamayan infertilite grubunda hem değişim aralığı yüksekti, hem de iki hastada granülosa hücrelerinde miR-17-5p değişim aralığının dışında uç değer almıştı



Şekil 8. Granülosa hücrelerinde miR-126 relatif ekspresyon seviyesinin fertilité gruplarına göre farkı

Erkek faktör olan grubun granülosa hücrelerinde miR-126 ortalaması daha düşüktü (Şekil 8). Değişim aralığı da erkek faktör grupta, açıklanamayan infertilite grubuna göre daha düşüktü. Açıklanamayan infertilite grubunda hem değişim aralığı yüksekti, hem de iki hastada granülosa hücrelerinde miR-126 değişim aralığının dışında uç değeri almıştı



Şekil 9. Granülosa hücrelerinde miR-21 relatif ekspresyon seviyesinin fertilitte gruplarına göre farkı

Şekil 9’da da görüleceği gibi, erkek faktör olan grubun granülosa hücrelerinde miR-21 ortalaması daha düşüktü. Değişim aralığı da erkek faktör grupta, açıklanamayan infertilite grubuna göre daha düşüktü. Açıklanamayan infertilite grubunda hem değişim aralığı yüksekti, hem de iki hastada granülosa hücrelerinde miR-21 değişim aralığının dışında uç değer almıştı

4.4 Erkek kaynaklı infertil grupta bulunan kadınlar ile açıklanamayan infertil grupta bulunan kadınların IVF başarı kriterlerimize göre fark analizleri

İnfertil gruplarının gebelik sonucu, canlı doğum ve embriyo kalitesi dağılımları ve fark analizi sonuçları Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9. Erkek kaynaklı infertil grupta bulunan kadınlar ile açıklanamayan infertil grupta yer alan kadınlar’ın gebelik sonucu, canlı doğum ve embriyo kalitesi dağılımları ve fark analizi sonuçları

	Erkek kaynaklı infertil grup (n=26)	Açıklanamayan infertil grup (n=26)	Toplam (n=52)	p
C. Doğum, n (%)				
Yok	19 (73.1)	19 (73.1)	38 (73.1)	>0.05
Var	7 (26.9)	7 (26.9)	14 (26.9)	
Gebelik, n (%)				
Yok	18 (69.2)	19 (73.1)	37 (71.2)	0.760 ^a
Var	8 (30.8)	7 (26.9)	15 (28.8)	
Embriyo kalitesi, n (%)				
1	4 (15.4)	4 (15.4)	8 (15.4)	>0.05
2	22 (84.6)	22 (84.6)	44 (84.6)	

a. Ki-Kare Testi, b. Ki-kare Testi.

Erkek kaynaklı infertil grubunda gebelik oranı %30.8 iken, açıklanamayan infertil grupta %26.9’du, ancak gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Canlı doğum her iki grupta da %26.9 olup, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$). İki grup arası embriyo

kalitesine göre fark analizi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$).

4.5. Çalışmaya katılan kadınların sigara içme alışkanlıklarına göre miRNA ekspresyon düzeyi arasındaki farklar

Sigara içme durumuna göre miRNA sonuçları arasındaki farklar Tablo 4.10'da verilmiştir.

Tablo 10. Sigara içme durumuna göre miRNA sonuçları arasındaki farklar

	Sigara var (n=33)	Sigara yok (n=19)	p
Δ Ct miR-17-5p folikül	-5.42 $\pm$ 2.18	-5.07 $\pm$ 1.86	0.567
Δ Ct miR-21 folikül	4.72 $\pm$ 1.37	5.04 $\pm$ 1.67	0.461
Δ Ct miR-126 folikül	-4.27 $\pm$ 2.33	-3.21 $\pm$ 2.03	0.105
Δ Ct miR-17-5p granülosa	-6.33 $\pm$ 1.35	-6.62 $\pm$ 1.59	0.484
Δ Ct miR-21 granülosa	3.88 $\pm$ 1.55	3.71 $\pm$ 1.43	0.695
Δ Ct miR-126 granülosa	-4.97 $\pm$ 1.57	-4.89 $\pm$ 1.54	0.847

Sigara içen kadınlar ve sigara içmeyen kadınlar olarak iki grupta miRNA ekspresyon düzeyi incelendiğinde incelediğimiz üç miRNA'nın da ekspresyon düzeyi farklarının tamamı istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

4.6. Çalışmaya katılan kadınların yaşlarına göre miRNA ekspresyon düzeyleri değerlendirilmesi

4.6.1 Çalışmaya katılan kadınların 35 yaş üzeri ve 35 yaş altı olarak iki gruba ayrıldığında çalıştığımız miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin arasındaki değerlendirme

Yaşa göre miRNA sonuçları arasındaki farklar Tablo 4.9'da verilmiştir.

Tablo 11. Yaşa göre miRNA sonuçları arasındaki farklar

	<35 (n=47)	≥35 (n=5)	p
ΔCt miR-17-5p folikül	-5,39±2,06	-4,40±2,01	0.311
ΔCt miR-21 folikül	4,74±1,45	5,74±1,53	0.151
ΔCt miR-126 folikül	-3,96±2,26	-3,16±2,40	0.457
ΔCt miR-17-5p granülosa	-6,49±1,36	-5,95±2,13	0.428
ΔCt miR-21 granülosa	3,80±1,54	3,96±1,20	0.819
ΔCt miR-126 granülosa	-4,92±1,59	-5,14±1,10	0.763

Yaşı 35 ve altında olan grup ile 35'in üzerinde olan grubun folikül sıvısı ve granülosa hücrelerinde miRNA ekspresyon düzeyi farklarının tamamı istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

4.6.2 Çalışmaya katılan kadınların yaş ortalamasına göre yaş ortalamasının altında kalanlar ve üzerinde olanlarda miRNA ekspresyon düzeyi farkları

Çalışmaya dahil ettiğimiz infertile kadınların yaş ortalamasına göre yaş ortalamasının altında kalanlar ve üzerinde olanlarda miRNA ekspresyon düzeyi sonuçları arasındaki farklar Tablo 4.10’de verilmiştir.

Tablo 12. Yaş ortalamasına göre miRNA sonuçları arasındaki farklar

	<28 (n=20)	≥28 (n=32)	p
ΔCt miR-17-5p folikül	-5.82±1.84	-4.96±2.15	0.144
ΔCt miR-21 folikül	4.19±1.20	5.24±1.51*	0.012
ΔCt miR-126 folikül	-4.53±1.96	-3.49±2.37	0.107
ΔCt miR-17-5p granülosa	-6.71±1.08	-6.27±1.61	0.286
ΔCt miR-21 granülosa	3.52±0.82	4.00±1.79	0.191
ΔCt miR-126 granülosa	-5.52±1.64	-4.58±1.39*	0.031

Yaşı ortalamanın altında olan (<28) ve ortalamanın üzerinde olan grubun folikül sıvılarında miR-21 ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak anlamlıydı, granülosa hücrelerinde miR-126’nın ekspresyon düzeyi de istatistiksel olarak anlamlıydı.

4.7. Çalışmaya katılan kadınların VKİ değerine göre miRNA ekspresyon düzeyi değerlendirmesi

VKİ gruplarına göre miRNA sonuçları arasındaki farklar Tablo 4.11’de verilmiştir.

Tablo 13. VKİ değerine göre miRNA sonuçları arasındaki farklar

	<25 (n=19)	≥25 (n=33)	p
ΔCt miR-17-5p folikül	-5.77±2.01	-5.02±2.07	0.211
ΔCt miR-21 folikül	4.47±1.52	5.04±1.43	0.182
ΔCt miR-126 folikül	-4.29±2.18	-3.65±2.31	0.331
ΔCt miR-17-5p granülosa	-6.47±1.59	-6.42±1.36	0.890
ΔCt miR-21 granülosa	3.48±1.61	4.01±1.42	0.229
ΔCt miR-126 granülosa	-5.07±1.50	-4.87±1.59	0.656

VKİ 25’in altında olan ve olmayan grupların miRNA farklarının tamamı istatistiksel olarak anlamlılığı olmadığı görüldü ($p>0.05$).

4.8. Çalışmamıza katılan kadınlar arasında IVF başarı kriterlerine göre olumlu sonuçlanan parametlerin miRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırması

Hastaların gebelik, canlı doğum ve embriyo kalitesi ile miRNA folikül ve granülosa parametreleri arasındaki ilişki için yapılan Spearman's rho korelasyon analizi sonuçları Tablo 4.14'de verilmiştir.

Tablo 14. İnfertil kadınlarda klinik gebelik, canlı doğum ve embriyo kalitesi ile folikül sıvısı ve granülosa hücrelerinde miRNA ekspresyon düzeyi parametreleri arasındaki ilişki için yapılan Spearman's rho korelasyon analizi sonuçları

	Gebelik		Canlı doğum		Embriyo kalitesi	
	R	p	r	p	r	p
Δ Ct miR-17-5p folikül	-0.180	0.203	-0.208	0.139	-0.021	0.881
Δ C miR-21 folikül	-0.222	0.114	-0.298*	0.032	0.099	0.483
Δ Ct miR-126 folikül	-0.281*	0.043	-0.292*	0.036	-0.131	0.353
Δ Ct miR-17-5p granülosa	0.253	0.070	0.205	0.145	-0.224	0.111
Δ Ct miR-21 granülosa	-0.109	0.442	-0.173	0.219	0.131	0.353
Δ Ct miR-126 granülosa	-0.047	0.743	-0.064	0.654	-0.178	0.208

Klinik gebelik ile folikül sıvılarında bakılan miR-126 arasında istatistiksel olarak anlamlı ve negatif yönde ilişki vardı ($r=-0.281$; $p<0.05$). Canlı doğum ile folikül sıvılarında bakılan miR-21 ($r=-0.298$; $p<0.05$) ve miR-126 ($r=-0.292$; $p<0.05$) arasında istatistiksel olarak anlamlı ve negatif yönde ilişki vardı.

5. TARTIŞMA

MiRNA overde gonadal gelişimi, foliküler olgunlaşma, overde hormonal steroidogenesis düzenlenmesi, overyan patolojilerin tespitinde biyobelirteç olarak ve granülosa hücrelerin apoptozunun düzenlenmesi gibi overyan fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynamaktadır (40, 49).

İnfertil hastalarda miRNA'nın yeri ve önemi yapılan çalışmalarda giderek artmakta ve gelişmekte. Folikül sıvısı ve granülosa hücrelerinden alınan örneklerle yapılan çalışmalarda folikül gelişimi, oosit maturasyonu, toplanan oosit sayısı, embriyo kalitesi, kontrollü ovulasyon indüksiyonunda uygulanan ilaç dozu, yaş, VKİ gibi klinik parametrelerle miRNA ekspresyon düzeyi arasındaki ilişkileri araştırılmıştır (50-52).

Son yıllarda miRNA ve infertilite üzerine yapılan çalışmaların popüleritesi artmakta ve IVF sikluslarının başarısını belirlemede potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği öngörüsü güçlenmektedir. Bu yönde yapılan çalışmalar içinde PKOS olan kadınlarda, düşük overyan rezervli kadınlarda, ovulasyon indüksiyonuna düşük yanıt veren kadınlarda yapılan çalışmalar mevcuttur (50, 53).

Bu çalışmada IVF tedavisi uygulanan açıklanamayan infertil ve erkek faktör sebebiyle IVF tedavisi alan kadınlar üzerinde miRNA ekspresyon düzeyi hakkında araştırma yaptık. Çalışmamıza dahil ettiğimiz açıklanamayan infertil ve erkek faktör sebebiyle infertil hastalarımızın miRNA ekspresyon düzeylerini değerlendirdik. IVF başarısını etkileyen ve infertiliteyi öngörmek için kullanılan klinik ve laboratuvar parametreleriyle açıklanamayan infertil hastalarla yine bu parametrelerle açıklanamayan fakat erkek faktör sebebiyle infertil kabul edilen hastaları dahil ederek miR-17-5p, miR-21, miR-126 ekspresyon düzeyleri bu parametrelere ve IVF başarısına etkisi inceledik. Folikül sıvılarındaki miR-126, granülosa hücrelerindeki miR- 17-5p, miR-21 ve miR-126 ekspresyon düzeyi farkları ise istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). miRNA değerlerinin ΔCT , -yani değişim değerleri alındığından, mutlak değeri büyük olanlarda değişim daha yüksektir. Buna göre folikül sıvılarındaki miR-126, granülosa hücrelerindeki miR-21 ve miR-126 değişim ortalamaları erkek kaynaklı infertil grubunda, granülosa hücrelerindeki miR-17-5p değişim ortalaması ise açıklanamayan infertilite grubunda daha yüksek düzeydeydi. MiRNA ve infertilite üzerine yapılan

çalışmalarda; açıklanmayan infertilite sebebiyle IVF tedavisi alan ve erkek faktör sebebiyle IVF tedavisi alan grupları arası miRNA ekspresyon düzeyi farklılıkları araştırılarak yapılan bir çalışmaya rastlamadık.

Karakaya ve arkadaşlarının yaptığı IVF sikluslarında zayıf over yanıtının olduğu kadınlarda granülosa hücrelerinde farklı microRNA ekspresyon ilişkilerini incelediği bir çalışmada kontrollü ovulasyon indüksiyonuna zayıf over yanıtı veren kadınlarla, zayıf yanıt vermeyen kadınların granülosa hücrelerindeki örneklerde microRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında özellikle miR-21'in zayıf over yanıtı veren kadınların granülosa hücrelerinde ekspresyonunun anlamlı düzeyde arttığı görülmüş, mi-RNA-21'in yaş ile ilişkisi araştırılmış anlamlı sonuç elde edilememiştir (50).

Kim ve arkadaşlarının yaptığı 10 açıklanmayan infertilite nedeniyle IVF yapılan hastada ovulasyon indüksiyonu sonrası granülosa hücrelerinde ve folikül sıvısında miRNA ekspresyon düzeylerinin araştırıldığı, oosit maturasyonun durumuna göre iki gruba ayrılan çalışmada; IVF sikluslarında oosit maturasyonuna göre miRNA ekspresyon düzeyi değişip değişmediği araştırılmıştır. Let-7b'nin granülosa hücrelerinde ekspresyon düzeylerinin oosit maturasyonuna göre anlamlı olarak farklı eksprese edildiği görülmüştür (54).

Martinez (2018) ve arkadaşlarının yaptığı folikül sıvısındaki saptanan ekstraselüler microRNA'ların fertilizasyon ve embriyo kalitesi arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada; fertilizasyon olan 93 kadının folikül sıvısındaki miRNA'lar ile fertilizasyon gerçekleşmeyen 33 kadının folikül sıvısındaki miRNA'lar karşılaştırıldığında 12 miRNA'nın farklı düzeyde eksprese edildiği 11'nin ekspresyonunun arttığı (miR-210, miR-192 , miR-98 , miR-130-b , miR-92-a , miR-503, miR-31-3p , let-7-c, miR-22, miR-542, miR-29) saptanmış. Çoklu logistik regresyon analizi yapıldığında (yaş, vücut kitle indeksi, fertilizasyon yöntemi sperm sayısı), araştırılan 192 miRNA'dan 9'u (let-7-c, miR-10b-3p, miR-26b, miR-30-d, miR-92-a, miR-130-b, miR-181-a, miR-652, miR-1290) fertilizasyonla ilişkili bulunmuştur. Embriyo kalitesine göre kaliteli ve kaliteli olmayan embriyolar arası folikül sıvısındaki saptanan ekstraselüler microRNA'ların değerlendirilmesi yapıldığında kaliteli olmayan embriyolarda miR-888'in ekspresyonunun arttığı, miR-214, miR-454 ve miR-

145 ekspresyonlarının düşük olduğu görülmüştür (33). miRNA ve embriyo kalitesiyle ilgili başka bir çalışmada Feng ve arkadaşlarının yaptığı IVF yapılan kadınların folikül sıvısındaki miRNA'ların embriyo kalitesi (iyi kalite embriyo ve iyi kalite olmayan embriyo grupları) üzerine etkisi incelenmiş miR-320 ve miR-197'nin iyi kalite embriyo olan grupta anlamlı düzeyde ekspresyon düzeylerinin arttığı görülmüştür, 15 miRNA'nın (miR-222, miR-320, miR-24, miR-132, let-7b, miR-106a, miR-19b, miR-16, miR-186, miR-339-3p, miR-17, miR-323-3p, miR-197, miR-20a, ve miR-382) ekspresyon düzeyinin anlamlı düzeyde olmadan azaldığı görülmüştür (55).Yine microRNA'ların embriyo kalitesi arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada Machtinger ve arkadaşlarının yaptığı IVF sikluslarında folikül sıvısındaki saptanan microRNA'ların embriyo kalitesi ile ilişkisini incelenmiştir ve embriyo kalitesine göre 4 miRNA'nın (miR-766, miR-663, miR-132-3p, miR-16-5p) farklı eksprese edildiği gözlemlenmiştir (56).Bu çalışmalarda folikül sıvısındaki saptanan hücre dışı microRNA'ların fertilizasyon ve embriyo kalitesine göre farklı ekspresyon düzeylerinde bize bilgi verebileceğini saptadık. Bizim çalışmamızda klinik gebelik sonuçları ile miR-126 folikül arasında istatistiksel olarak anlamlı ve negatif yönde ilişki vardı . Çalışmada canlı doğum sınırına ulaşan, IVF sonuçları başarılı olan kadınlarda folikül sıvılarında miR-21 ve miR-126 folikül arasında istatistiksel olarak anlamlı ve negatif yönde ilişki vardı.Embriyo kalitesi üzerine anlamı istatistiksel bir değer saptamadık.

Scalici ve arkadaşlarının yaptığı IVF yapılan PKOS'lu ve PKOS'lu olmayan kadınlardan alınan folikül sıvısı örneklerinden beş miRNA'nın (let-7b, miR-29a, miR-30a, miR-140 ve miR-320a) ekspresyon profilleri karşılaştırılmıştır. MiR-30a'nın PKOS'lu hastalarda ekspresyonunun arttığı miR-140 ve let-7b'nin ekspresyonunun azaldığı, matür oosit sayısına göre miRNA ekspresyonları karşılaştırıldığında ise miR-320a'nın daha düşük eksprese edildiği görülmüş. Scalici ve ark.'larının yaptığı bu çalışmada normal over rezervine sahip grupta folikül sıvısındaki bu beş miRNA'nın IVF sonucu oluşan klinik gebelik sonuçlarına bakıldığında folikül sıvısındaki miR-29a'nın anlamlı sonuç verdiği görülmüştür (45).

Martinez (2019) ve arkadaşlarının yaptığı IVF sikluslarında folikül sıvısındaki saptanan miRNA'ların bu sikluslara katılan kadınların vücut kitle indeksi ile ilişkisini inceleyen çalışmaya 133 kadın dahil edilmiş ve miR-328'in istatistiksel olarak anlamlı

olduğu bulunmuştur (57). Biz de çalışmamızda IVF sikluslarında folikül sıvısındaki ve granülosa hücrelerinde miR-17-5p, miR-21, miR-126'ların bu sikluslara katılan kadınların vücut kitle indeksi ile ilişkisini inceledik BMI 25'in altında olan ve olmayan grupların miRNA farklarının tamamı istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

Moreno ve arkadaşlarının yaptığı IVF sikluslarında folikül sıvısındaki saptanan microRNA'ların IVF sikluslarındaki kadınların yaşı ve oosit matürasyonları ile ilişkisini inceleyen çalışmada ise IVF sikluslarındaki kadınların yaşı ile değişen 1 miRNA (miR-424) tespit edilmiştir (58). Bizim de çalışmamızda yaşı ortalamanın altında olan (<28 yıl) ve ortalamanın üzerinde olan grubun folikül sıvılarında miR-17-5p'nin ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak anlamlıydı, granülosa hücrelerinde miR-126'nın ekspresyon düzeyi de istatistiksel olarak anlamlıydı. Yaşı 35 ve altında olan grup ile 35'in üzerinde olan grubun folikül sıvısı ve granülosa hücrelerinde baktığımız miRNA ekspresyon düzeyi farklarının tamamı istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

IVF sikluslarının sayısı her geçen gün artmaktadır. Buna rağmen YÜT ile oluşan gebelik oranları hala arzu edilen seviyeye gelmemiştir. IVF sikluslarının gebelikle sonuçlanma oranının %30'a yakın olduğu görülmüştür (59). İnfertil çiftlerin yaklaşık %17'sinin açıklanmayan infertilite nedeniyle olduğu tahmin edilmektedir (2). Mevcut laboratuvar ve klinik araştırmalar sonucu açıklanmayan infertil olarak kabul edilen bu hasta grubuna yönelik son yıllarda infertilite ve infertilite başarı üzerine pek çok çalışma mevcuttur (33, 55, 56). Açıklanmayan infertilite nedeniyle IVF siklusuna alınan kadınlar ve erkek kaynaklı infertilite nedeniyle IVF siklusuna alınan kadınların, iki grup arası folikül sıvıları ve granülosa hücrelerinde miRNA'nın ekspresyon düzeyinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlamadık, bu durumu çalışmamızın güçlü yanı olarak gösterebiliriz. Çalışmaya aldığımız örnek sayısının artması halinde ve çalışmamızda araştırabildiğimiz 3 miRNA (miR-17-5p, miR-21, miR-126) çeşitliliğini arttırmamız halinde daha başarılı sonuçlar elde edilebileceğini düşünüyoruz ve bu faktörlerin çalışmamızın kısıtlılıkları olarak değerlendirilebilir.

6. SONUÇ

Sonuç olarak IVF tedavisi uygulanan açıklanamayan infertil ve erkek faktör sebebiyle IVF tedavisi alan kadınlar üzerinde miR-17-5p, miR-21, miR-126 ekspresyon düzeylerini IVF başarısına ve açıklanamayan infertil kadınlardaki ekspresyon farklılığını incelediğimiz çalışmamızda, folikül sıvılarındaki miR-126, granülosa hücrelerindeki miR-17-5p, miR-21 ve miR-126 ekspresyon düzeyi farkları istatistiksel olarak anlamlıydı. miRNA değerlerinin ΔCT , -yani değişim değerleri alındığından, mutlak değeri büyük olanlarda değişim daha yüksektir. Buna göre, folikül sıvılarındaki miR-126, granülosa hücrelerindeki miR-21 ve miR-126 değişim ortalamaları erkek kaynaklı infertil grubunda, granülosa hücrelerindeki miR-17-5p değişim ortalaması ise açıklanamayan infertil grubunda daha yüksek düzeydeydi.

Korelasyon analizi sonuçlarına göre erkek kaynaklı infertil grup ile folikül sıvılarında bakılan miR-21 ($r=-0.274$; $p<0.05$), miR-126 ($r=-0.274$; $p<0.05$), granülosa hücrelerinde bakılan miR-17-5p ($r=-0.441$; $p<0.01$) ve miR-126 ($r=-0.374$; $p<0.01$) arasında istatistiksel olarak anlamlı ve negatif yönde ilişki vardı. Erkek kaynaklı infertil grupta folikül sıvılarında bakılan miR-126 değerleri ($r=0.325$; $p<0.01$) arasında ise istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yönde ilişki vardı. Regresyon analizi sonuçlarına göre açıklanamayan infertil grup ile granülosa hücrelerinde bakılan miR-17-5p ve miR-126 arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki vardı ($p<0.05$).

Klinik gebelik ile folikül sıvılarında bakılan miR-126 arasında istatistiksel olarak anlamlı ve negatif yönde ilişki vardı ($r=-0.281$; $p<0.05$). Canlı doğum ile folikül sıvılarında bakılan miR-21 ($r=-0.298$; $p<0.05$) ve miR-126 ($r=-0.292$; $p<0.05$) arasında istatistiksel olarak anlamlı ve negatif yönde ilişki vardı.

ÖZET

IVF Sikluslarında Folikül Sıvısı ve Granülosa Hücrelerinde miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Mikro-ribonükleik asitler (miRNA) overde gonadal gelişim, foliküler olgunlaşma, hormonal steroidogenezin düzenlenmesi ile overyan patolojilerin tespitinde biyobelirteç ve granülosa hücrelerin apoptozunun düzenlenmesi gibi overyan işlevlerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Mevcut tez araştırmasında in vitro fertilizasyon (IVF) sikluslarında foliküler sıvı ve granülosa hücrelerinde miR-17-5p, miR-21 ve miR-126 seviyelerinin değerlendirilmesi ve infertilite nedenleri ile ilişkilendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmaya kadın veya erkek kaynaklı organik patoloji saptanmamış 26 infertil çift (açıklanamayan infertilite) ve herhangi bir kadın kaynaklı organik faktör bulunmayıp erkek kaynaklı infertilite tanısıyla takip edilen ve IVF tedavisi uygulanan 26 infertil çift dahil edilmiştir. Açıklanamayan ve erkek infertilitesi nedeni ile IVF uygulanan kadınlardaki miRNA ekspresyon düzeyleri, kadınların yaş gibi çeşitli demografik özelliklerine göre değerlendirilmiştir.

Açıklanamayan infertilite ve erkek kaynaklı infertilite arasında folikül sıvılarındaki miR-126, granülosa hücrelerindeki miR-17-5p, miR-21 ve miR-126 ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı oranda (tüm karşılaştırmalarda $p<0.05$) farklıydı. Folikül sıvısı miRNA-17-5p ve granülosa hücresi miRNA-126 ekspresyon düzeyleri, 28 yaş altı ve üstünde farklılık göstermekle beraber 35 yaş altı ve üstünde folikül sıvısı ve granülosa hücresi miRNA ekspresyon düzeyleri benzer bulundu (tüm karşılaştırmalarda $p>0.05$).

Sonuç olarak, açıklanamayan infertilite nedeni ile IVF siklusuna alınan kadınların folikül sıvısı ve granülosa hücresi miRNA ekspresyon düzeyleri, infertilite etyolojisi ve kadın yaşı ile farklılık gösterebilir. İnfertil kadınların araştırılması esnasında kullanılan laboratuvar ve klinik parametrelere miRNA düzeylerinin katkıda bulunabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Granülosa hücresi, folikül sıvısı İnfertilite, miRNA, IVF

SUMMARY

Determination of miRNA Expression Levels in the Follicular Fluid and Granulosa Cells in IVF Cycles

Micro-ribonucleic acids (miRNA) have a role in regulating ovarian function, such as gonadal development in the ovary, follicular maturation, regulation of hormonal ovarian steroidogenesis and act as biomarkers for detection of ovarian pathologies, as well as, regulation of granulosa cell apoptosis. The present residency thesis, aims to evaluate miRNA-17-5p, miR-21 and miR-126 levels in the follicular fluid during in vitro fertilization (IVF) cycles considering the cause of infertility.

The study included 26 infertile couples with no organic pathology of female or male origin (unexplained infertility), and 26 couples with a diagnosis of male factor infertility without any organic factors of female origin. We investigated the difference in miRNA expressions in women undergoing IVF with unexplained and male factor infertility in association with different demographic characteristics of the women.

Follicular fluid miR-126 and granulosa cell miR 17-5p, miR-21 and miR-126 were statistically significant ($p < 0.05$ for all comparisons) between unexplained and male factor infertility groups. Although follicular fluid miRNA-17-5p and granulosa cell miRNA-126 expressions differed significantly between women below and above 28 years of age, follicular fluid and granulosa cell miRNA expressions were similar ($p > 0.05$ for all comparisons) in women younger and older than 35 years of age.

In conclusion, follicular fluid and granulosa cell miRNA expression levels of women undergoing IVF cycles may differ depending on the infertility etiology and the female couple's age. More research on the possible contribution of miRNA expression evaluations to the laboratory and clinical parameters used for the investigation of infertile women are warranted.

Keywords: Granulosa cell, follicular fluid, miRNA Infertility.

KAYNAKLAR

1. Zhang Y, McLain AC, Davis B, McDermott S. Fecundity and Infertility Among Women with Disabilities in the United States. *J Womens Health (Larchmt)*. 2019;28(7):934-40.
2. Lindsay TJ, Vitrikas KR. Evaluation and treatment of infertility. *Am Fam Physician*. 2015;91(5):308-14.
3. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, et al. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol*. 2012;62(2):324-32.
4. Bates GW, Garza DE, Garza MM. Clinical manifestations of hormonal changes in the menstrual cycle. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1990;17(2):299-310.
5. Emslie C, Grimshaw J, Templeton A. Do clinical guidelines improve general practice management and referral of infertile couples? *BMJ*. 1993;306(6894):1728-31.
6. Tolstrup JS, Kjaer SK, Holst C, Sharif H, Munk C, Osler M, et al. Alcohol use as predictor for infertility in a representative population of Danish women. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2003;82(8):744-9.
7. Kamel RM. Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010;8:21.
8. Loverro G, Nappi L, Vicino M, Carriero C, Vimercati A, Selvaggi L. Uterine cavity assessment in infertile women: comparison of transvaginal sonography and hysteroscopy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001;100(1):67-71.
9. Poncelet C, Aissaoui F. [Uterine malformations and reproduction]. *Gynecol Obstet Fertil*. 2007;35(9):821-5.
10. Naz T, Hassan L, Gulmeen, Nighat F, Sultan S. Laparoscopic evaluation in infertility. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2009;19(11):704-7.
11. Corson SL. Evaluation of the subfertile couple: the fine points. *International journal of fertility and women's medicine*. 2001;46(6):309-14.
12. Quagliarello J, Arny M. Inaccuracy of basal body temperature charts in predicting urinary luteinizing hormone surges. *Fertil Steril*. 1986;45(3):334-7.
13. Miller PB, Soules MR. The usefulness of a urinary LH kit for ovulation prediction during menstrual cycles of normal women. *Obstet Gynecol*. 1996;87(1):13-7.
14. Balasch J. Investigation of the infertile couple: investigation of the infertile couple in the era of assisted reproductive technology: a time for reappraisal. *Hum Reprod*. 2000;15(11):2251-7.

15. Crawford NM, Steiner AZ. Age-related infertility. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2015;42(1):15-25.
16. Evers JL, Slaats P, Land JA, Dumoulin JC, Dunselman GA. Elevated levels of basal estradiol-17 β predict poor response in patients with normal basal levels of follicle-stimulating hormone undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1998;69(6):1010-4.
17. Ashrafi M, Madani T, Tehranian AS, Malekzadeh F. Follicle stimulating hormone as a predictor of ovarian response in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF. *Int J Gynaecol Obstet.* 2005;91(1):53-7.
18. Hofmann GE, Danforth DR, Seifer DB. Inhibin-B: the physiologic basis of the clomiphene citrate challenge test for ovarian reserve screening. *Fertil Steril.* 1998;69(3):474-7.
19. de Carvalho BR, Rosa e Silva AC, Rosa e Silva JC, dos Reis RM, Ferriani RA, Silva de Sa MF. Ovarian reserve evaluation: state of the art. *J Assist Reprod Genet.* 2008;25(7):311-22.
20. Scheffer GJ, Broekmans FJ, Dorland M, Habbema JD, Looman CW, te Velde ER. Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertil Steril.* 1999;72(5):845-51.
21. Broer SL, Broekmans FJ, Laven JS, Fauser BC. Anti-Mullerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications. *Hum Reprod Update.* 2014;20(5):688-701.
22. Sinawat S, Pattamadilok J, Seejorn K. Tubal abnormalities in Thai infertile females. *J Med Assoc Thai.* 2005;88(6):723-7.
23. Taymor ML, Overstreet JW. Some thoughts on the postcoital test. *Fertil Steril.* 1988;50(5):702-3.
24. Gottardo F, Kliesch S, World Health O. [Semen analysis: spermiogram according to WHO 2010 criteria]. *Urologe A.* 2011;50(1):101-8.
25. Strauss JF. Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology. 6ND ed: Saunders Elsevier; 2009.
26. Hugues JN, Cedrin Durnerin IC. Revisiting gonadotrophin-releasing hormone agonist protocols and management of poor ovarian responses to gonadotrophins. *Hum Reprod Update.* 1998;4(1):83-101.
27. Carroll M. Clinical Reproductive Science: Wiley; 2018.
28. Al-Inany HG, Youssef MA, Ayeleke RO, Brown J, Lam WS, Broekmans FJ. Gonadotrophin-releasing hormone antagonists for assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;4:CD001750.
29. Humaidan P, Alsbjerg B. GnRHa trigger for final oocyte maturation: is HCG trigger history? *Reprod Biomed Online.* 2014;29(3):274-80.

30. Smith V, Osianlis T, Vollenhoven B. Prevention of Ovarian Hyperstimulation Syndrome: A Review. *Obstet Gynecol Int.* 2015;2015:514159.
31. Fauser BC, Devroey P. Reproductive biology and IVF: ovarian stimulation and luteal phase consequences. *Trends Endocrinol Metab.* 2003;14(5):236-42.
32. Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod.* 1994;50(2):225-32.
33. Martinez RM, Liang L, Racowsky C, Dioni L, Mansur A, Adir M, et al. Extracellular microRNAs profile in human follicular fluid and IVF outcomes. *Sci Rep.* 2018;8(1):17036.
34. Kim YJ, Ku S-Y, Kim YY, Liu HC, Chi SW, Kim SH, et al. MicroRNAs transfected into granulosa cells may regulate oocyte meiotic competence during in vitro maturation of mouse follicles. *Human Reproduction.* 2013;28(11):3050-61.
35. Slezak-Prochazka I, Durmus S, Kroesen BJ, van den Berg A. MicroRNAs, macrocontrol: regulation of miRNA processing. *RNA.* 2010;16(6):1087-95.
36. Wang Y, Stricker HM, Gou D, Liu L. MicroRNA: past and present. *Front Biosci.* 2007;12:2316-29.
37. Ardekani AM, Naeini MM. The Role of MicroRNAs in Human Diseases. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2010;2(4):161-79.
38. Gu Y, Zhang L, Chen X. Differential expression analysis of *Paralichthys olivaceus* microRNAs in adult ovary and testis by deep sequencing. *Gen Comp Endocrinol.* 2014;204:181-4.
39. Hossain MM, Sohel MM, Schellander K, Tesfaye D. Characterization and importance of microRNAs in mammalian gonadal functions. *Cell Tissue Res.* 2012;349(3):679-90.
40. Baley J, Li J. MicroRNAs and ovarian function. *J Ovarian Res.* 2012;5:8.
41. Thessaloniki EA-SPCWG. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2008;89(3):505-22.
42. Sorensen AE, Wissing ML, Salo S, Englund AL, Dalgaard LT. MicroRNAs Related to Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Genes (Basel).* 2014;5(3):684-708.
43. Sirotkin AV, Ovcharenko D, Grossmann R, Laukova M, Mlyncek M. Identification of microRNAs controlling human ovarian cell steroidogenesis via a genome-scale screen. *J Cell Physiol.* 2009;219(2):415-20.
44. Dahiya N, Sherman-Baust CA, Wang TL, Davidson B, Shih Ie M, Zhang Y, et al. MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer. *PLoS One.* 2008;3(6):e2436.

45. Scalici E, Traver S, Mullet T, Molinari N, Ferrieres A, Brunet C, et al. Circulating microRNAs in follicular fluid, powerful tools to explore in vitro fertilization process. *Sci Rep*. 2016;6:24976.
46. Chang MY, Chiang CH, Hsieh TT, Soong YK, Hsu KH. Use of the antral follicle count to predict the outcome of assisted reproductive technologies. *Fertil Steril*. 1998;69(3):505-10.
47. Gelbaya TA, Potdar N, Jeve YB, Nardo LG. Definition and epidemiology of unexplained infertility. *Obstet Gynecol Surv*. 2014;69(2):109-15.
48. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*. 2010;16(3):231-45.
49. Santonocito M, Vento M, Guglielmino MR, Battaglia R, Wahlgren J, Ragusa M, et al. Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid: bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation. *Fertil Steril*. 2014;102(6):1751-61 e1.
50. Karakaya C, Guzeloglu-Kayisli O, Uyar A, Kallen AN, Babayev E, Bozkurt N, et al. Poor ovarian response in women undergoing in vitro fertilization is associated with altered microRNA expression in cumulus cells. *Fertil Steril*. 2015;103(6):1469-76 e1-3.
51. Naji M, Aleyasin A, Nekoonam S, Arefian E, Mahdian R, Amidi F. Differential Expression of miR-93 and miR-21 in Granulosa Cells and Follicular Fluid of Polycystic Ovary Syndrome Associating with Different Phenotypes. *Sci Rep*. 2017;7(1):14671.
52. Diez-Fraile A, Lammens T, Tilleman K, Witkowski W, Verhasselt B, De Sutter P, et al. Age-associated differential microRNA levels in human follicular fluid reveal pathways potentially determining fertility and success of in vitro fertilization. *Hum Fertil (Camb)*. 2014;17(2):90-8.
53. Butler AE, Ramachandran V, Hayat S, Dargham SR, Cunningham TK, Benurwar M, et al. Expression of microRNA in follicular fluid in women with and without PCOS. *Sci Rep*. 2019;9(1):16306.
54. Kim YJ, Ku SY, Kim YY, Suh CS, Kim SH, Choi YM. MicroRNA Profile of Granulosa Cells after Ovarian Stimulation Differs According to Maturity of Retrieved Oocytes. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2016;76(6):704-8.
55. Feng R, Sang Q, Zhu Y, Fu W, Liu M, Xu Y, et al. MiRNA-320 in the human follicular fluid is associated with embryo quality in vivo and affects mouse embryonic development in vitro. *Sci Rep*. 2015;5:8689.
56. Machtinger R, Rodosthenous RS, Adir M, Mansour A, Racowsky C, Baccarelli AA, et al. Extracellular microRNAs in follicular fluid and their potential association with oocyte fertilization and embryo quality: an exploratory study. *J Assist Reprod Genet*. 2017;34(4):525-33.

57. Martinez RM, Baccarelli AA, Liang L, Dioni L, Mansur A, Adir M, et al. Body mass index in relation to extracellular vesicle-linked microRNAs in human follicular fluid. *Fertil Steril*. 2019;112(2):387-96 e3.
58. Moreno JM, Nunez MJ, Quinonero A, Martinez S, de la Orden M, Simon C, et al. Follicular fluid and mural granulosa cells microRNA profiles vary in in vitro fertilization patients depending on their age and oocyte maturation stage. *Fertil Steril*. 2015;104(4):1037-46 e1.
59. Adamson GD, de Mouzon J, Chambers GM, Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology: world report on assisted reproductive technology, 2011. *Fertil Steril*. 2018;110(6):1067-80.

