T.C.
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

PATERNAL METOTREKSAT MARUZİYETİ SONRASI GEBELİK SONUÇLARI:

SİSTEMATİK DERLEME VE META-ANALİZ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Nusret Uysal

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Barış Karadaş

Prof. Dr. Yusuf Cem Kaplan

İZMİR

Eylül-2022

T.C.
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

PATERNAL METOTREKSAT MARUZİYETİ SONRASI GEBELİK SONUÇLARI:

SİSTEMATİK DERLEME VE META-ANALİZ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Nusret Uysal

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Barış Karadaş

Prof. Dr. Yusuf Cem Kaplan

İZMİR

Eylül-2022

TEZ ONAY SAYFASI

TEŞEKKÜR

Eğitim sürecimde kılavuzum, yol göstericim, yerine göre abi, yerine göre hocam olan mentorum Prof. Dr. Yusuf Cem Kaplan'a,

Eğitim sürecimde desteğini akademi ile birlikte günlük yaşamda da hissettiğim danışmanım Doç. Dr. Barış Karadaş'a,

Profesyonellikleri ile bilgi ve görgülerini her daim büyük bir sabır ile aktaran hocalarım Prof. Dr. Tijen Kaya-Temiz ve Doç. Dr. İsmail Yılmaz'a,

Samimiyetleri ve yardımseverlikleriyle kendilerinden çok şey öğrendiğim değerli Uzm. Dr. Elif Keskin-Arslan ve Uzm. Dr. Hilal Erol'a,

Birlikte çalışma fırsatı yakaladığım, bilgi, dostluk ve tecrübelerinden istifade edip beraber anılar biriktirdiğim, kısa sürede içinde enerji ve samimiyetleriyle bende ayrı bir yer edinen arkadaşlarım Dr. Hüseyin Yılmaz, Dr. Mesut Güngör, Dr. Ozan Öztürk, Dr. Işık Cem Özok, Dr. Ersan Horoz, Dr. Osman Karakulak ve Ecz. Selin Acar'a,

Varlıkları ve her zaman arkamda hissettiğim destekleriyle bugünkü ben olmamı sağlayan anne ve babama,

Bu inişli çıkışlı hayat yolunda her şeye beraber göğüs gerdiğimiz, uydusu olarak takipte olduğum güneşim, sevgili eşim Dr. Ayça Aydın Uysal'a teşekkürü borç bilirim.

Dr. Nusret UYSAL

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER VE KISALTMALAR

aOR/aRR /aHR	: Maternal kafa karıştırıcı faktörlerin hesaba katıldığı veriler
AKRT	: Aminoimidazol karboksamid ribonükleotid transformilaz
DMARD	: Disease-modifying antirheumatic drugs
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
EUROCAT	: European Registration of Congenital Anomalies and Twins
GRADE	: Grading of Recommendations, Assessment, Development and Evaluations
HR	: Tehlike farkı
ICD	: International Classification of Diseases
NOS	: Newcastle-Ottawa Skale
OR	: Odds oranı
PRISMA	: Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses
PROSPERO	: The International Prospective Register of Systematic Reviews
QUOROM	: Quality of Reporting of Meta-analyses
ROBINS-I	: Risk of bias tool to assess non-randomized studies of interventions
RD	: Risk farkı
RevMan	: Review Manager Version 5.3. Copenhagen: The Nordic Cochrane Centre, The Cochrane Collaboration, 2014
RR	: Risk oranı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

1. GİRİŞ

Son yıllarda gebelik döneminde ilaç kullanımı açısından farkındalık giderek artmaktadır. Teratojen ajanlar başta olmak üzere, maternal ilaç maruziyetinin anne ve bebek üzerine etkileri gözlemsel çalışmalar ile araştırılmaktadır. Vaka-kontrol, kohort çalışmaları, vaka serileri ve vaka raporları bu konuda kanıta dayalı bilgilerin toplanmasında önemli yer tutmaktadır (1).

Annenin teratojenlere maruziyeti detaylı olarak irdelenirken babanın maruziyetine ilişkin bilimsel veri daha kısıtlıdır. Yenidoğanlarda bildirilen konjenital anomalilerin %65-70 civarının etiyolojisinin belli olmadığı bildirilmiştir (2). Bu büyük oran göz önüne alınarak babanın maruziyetinin etiyolojide rol oynayabileceği önerilmiştir (1).

Özellikle gebelik sürecinde maruz kalındığında bebeğe zararlı olduğu bilinen ajanların paternal maruziyeti ile ilgili artan bir endişe söz konusudur (3). Bu durum bebek planlayan kronik hastalıklara sahip erkeklerin tedavi yönetiminde güçlüklere yol açmaktadır (3). Potansiyel baba adaylarının farmakoterapisinde reprodüktif açıdan iki temel nokta öne çıkmaktadır: ilacın fertiliteyi etkileme ihtimali ve advers gebelik sonuçları ortaya çıkarma ihtimali (3).

Metotreksat; çeşitli romatizmal hastalıklar, maligniteler ve gebelik terminasyonunda kullanılan folik asit antagonisti, sitotoksik bir ajandır (4). Maternal maruziyeti sonrası spesifik bir embriyopatiye neden olabilen, bilinen bir teratojendir (4). Metotreksata intrauterin maruziyet kraniofasial anomaliler ve ekstremite anomalileri ile ilişkilendirilmiştir (5). Metotreksat embriyopatisinin 10 mg/hafta ve daha yüksek dozlarda, postkonsepsiyonel 6-8. haftalar arasında maruziyet ile gözlendiği bildirilmiştir (6).

Metotreksat dihidrofolat redüktaz enzimi inhibisyonu ile timidin ve DNA sentezini bloke etmektedir (6). Metrotreksatın sperm üzerine potansiyel genotoksik etkisi ve teorik olarak seminal sıvı aracılığıyla vajinal mukozadan emilip anne sistemik dolaşımına geçmesi riski ilaç hakkındaki endişeleri arttırmaktadır (7).

Hem erkekler hem kadınlar için planlanan gebelikten en az üç ay önce metotreksatın kesilmesi önerilmektedir (8). Bu uyarının nedeni yapılan çalışmalarda vücuttan atılma süresinin bireysel değişkenlik gösterebilmesi nedeniyledir. Verilen

dozun % 5-35'inin hepatosit ve eritrositlerde aylarca depolanabildiği ve bazı bireylerde vücuttan atılma süresinin haftalar ya da aylara kadar uzayabildiği gösterilmiştir (9).

Paternal metotreksat maruziyeti sonrası konjenital malformasyonlar ile ilgili varolan çalışmaları sistematik bir şekilde inceleyip, havuzlayan ve verilerin kanıt değerini yükselten bir meta-analiz yoktur. Literatürde metotreksat kullanmakta olup bebek planlayan erkeklerin medikal yönetimi ile ilgili önerilerin açık olmadığı ifade edilmiştir (3).

Bu çalışmanın amacı, paternal metotreksat maruziyeti sonrası major konjenital malformasyon ve diğer advers gebelik sonuçları arasında bir ilişki olup olmadığını literatürün sistematik incelenmesi ve meta-analiz ile ortaya koymaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Teratolojide Kavramlar ve Paternal maruziyet

Teratolojik kavramları anlamak ve teratojenik risk değerlendirmesi yapmak için gözden geçirilmesi gereken kavramlardan başlıcası embriyogenezdir. Sağlıklı bir risk değerlendirmesi için embriyolojinin farmakoloji ile harmanlanması gerekmektedir. İlaca maruziyetin gebeliğin hangi döneminde olduğu teratojen ajanlara duyarlılık açısından önemlidir. Döllenmeden sonraki 3-8. haftalar arası teratojenlere en duyarlı olunan dönemdir. "Ya hep ya hiç dönemi" olarak ifade edilen ilk iki haftalık süreçte ise zigot etkilendiyse gebelik düşük ile sonuçlanırken, etkilenme yok ise gebelik normal bir şekilde devam etmektedir. Genel olarak; organogenezi içeren ilk trimesterde maruziyet ile major malformasyonlar meydana gelirken, büyüme ve gelişmeyi içeren iki ve üçüncü trimesterlerde maruziyet genellikle minör malformasyonlar meydana getirmektedir (10). Bu ifadeler maternal maruziyet için geçerli olup paternal maruziyette farklı mekanizmalar mevcuttur.

Paternal maruziyetin bebeğin babasının eşin gebeliği öncesinde ve gebelik sürecinde maruz kaldığı her şeyi ifade ettiği bildirilmiştir. Bu maruziyete reçeteli/reçetesiz ilaçlar, tütün ürünleri, alkol, radyasyon ve iş yeri maruziyetleri dahildir (11). Paternal maruziyet prekonsepsiyonel, perikonsepsiyonel ve postkonsepsiyonel olabilir.

Paternal ilaç maruziyetinin gebeliği çeşitli mekanizmalarla etkileyebileceği bildirilmiştir: Spermatosite genetik veya kromozomal bir hasar, ilaç ve metabolitlerinin sperm matürasyonu üzerine etkisi, seminal sıvıdaki ilaç ve metabolitlerinin direkt etkisi ve vajinal mukozadan absorbsiyon sonrası kadın üzerinde indirekt sistemik etkileri (12).

Literatürde potansiyel baba adayı tarafından alınan ilaçların gelişimsel bozukluklarda major bir rol oynamayacağı önerilmiştir. Ancak bazı deneysel çalışmalarda çeşitli bozukluklara yol açabileceği ifade edilmiştir (13). Aşağıda paternal ilaç maruziyeti ile gebeliği etkileyebilecek muhtemel mekanizmalar üzerinden literatür incelenmiştir.

Metadon, trimetoprim, sulfametoksazol, fenitoin ve valproik asit dahil olmak üzere bir çok kimyasalın seminal sıvıda tespit edildiği bildirilmiştir (13). Başka bir çalışmada kokainin insan spermatozoasına yüksek afinitesi olduğu ancak spermatozoa aracılığıyla ovuma gelip gelmediğinin ispatlanmadığı ifade edilmiştir (14). Yine tetrasiklin ve talidomidin spermatozoaya absorbe edildiği ancak bu yol ile teratojenik etki göstermediği bildirilmiştir (13). Kimyasalların vajinal absorbsiyonu iyi dökümante edilmiştir ancak genellikle sistemik etkilerinin olmadığı ifade edilmiştir (15). Partneri kanser kemoterapisi alan kadınlarda lokal bir etki olarak vajinal inflamasyon rapor edilmiştir. Totalde; preimplantasyon kaybı ve sperm morfolojisi ve motilitesi üzerine etkiler gösterilmesine rağmen seminal sıvıdan transfer ile konjenital malformasyon rapor edilmediği bildirilmiştir (13).

Kimyasalların sperm üretimi inhibisyonu ile erkek infertilitesi gerçekleşebilmektedir (13). Bazı fitalat esterlerinin sertoli hücreleri üzerine etkileri buna örnek olarak verilebilir. Bununla birlikte bu mekanizma ile embriyo üzerine etki rapor edilmemiştir (16). Germ hücrelerinin kaybı erkek infertilitesi ile sonuçlanabilmektedir. Germ hücre kaybına iyi çalışılmış örnekler olarak radyasyon maruziyeti ve antineoplastik ajan ile tedavi verilmiştir (13). 10 raddan daha az radyasyona maruz kalan gönüllülerde semen analizi, gonadotropin düzeyleri ve testiküler biyopsilerinde anormallikler gözlenmemiştir. 15-50 rad arasında 9-18 ayda düzelen, 100 rad ve üzerinde ise 5 yıla kadar devam edebilen sperm konsantrasyonlarında düşme bildirilmiştir (13). Paternal radyasyon maruziyeti Nagasaki ve Hiroshima sağkalanları üzerinden de çalışılmış ve malformasyon, fetal ölüm oranlarında artırıcı advers etki bildirilmemiştir (17).

Radyasyon maruziyetinin aksine, erkeklerin çalıştığı bir çok meslek dalının spontan abortus, doğum defekti ve çocukluk çağı kanserleri için risk artışıyla ilişkilendirildiği bildirilmiştir (18). İncelenen tüm mesleklerde erkeklerin rutin olarak çeşitli kimyasallara maruz kaldığı ifade edilmiştir (18). Bu mesleklerin ressamları, çiftçileri, tamircileri, metal ve kimya sanayi çalışanları, elektrikçileri ve itfaiyecileri içerdiği belirtilmiştir. Bu kişilerin solventlere, ağır metallere, polisiklik aromatik hidrokarbonlara, pestisitlere ve radyasyona maruz kalmış olabileceği ifade edilmiştir (18).

Literatürde paternal maruziyetle doğum defekti ilişkisinin hipotetik bir boyutta olduğu ve ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (18). Mevcut çalışmaların düşük örneklem boyutu, kafa karıştırıcı faktörlerin çeşitliliği, maruziyet sınıflandırmasındaki zorlukların ciddi kısıtlayıcı faktörler olduğu ifade edilmiştir (18).

Çoğu zaman hatalı bir şekilde birbiri yerine kullanılabilen teratoloji terimleri, konunun anlaşılması açısından önem arz eden bir başka konudur. Anomali; uygun referans bir popülasyondan önemli bir sapmayı ifade eden anatomik (mikroskopik ve makroskopik) bir fenotiptir. Anomali fizyolojik ya da fonksiyonel anormallikleri içerebilir ve genel bir kavramdır. Anomali; malformasyon, deformasyon, displazi gibi terimleri de kapsar. Major ve minor anomali olarak ikiye ayrılır. Major anomali sağlık veya görünüm üzerine önemli etkisi olan, minor anomali sağlık üzerine minimal etkisi olan ya da hiç olmayan, görünüme ise ılımlı düzeyde bir etkisi olan anomalilerdir. Malformasyon ise bir teratojen kaynaklı intrensek gelişim süreçlerindeki değişikliklere bağlı olarak tek bir organ ya da vücut kısmının ilerleyici olmayan konjenital morfolojik bir anomalisidir (19).

2.2 Metotreksat

2.2.1 Metrotreksat Tarihçesi

1940 lı yıllarda karaciğerden folik asit izolasyonu ve sentezlenmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Boston's Children's Hospital araştırmacıları tarafından folik asit antagonistlerinin çocukluk çağı lösemisi üzerine etkili olabileceği öngörülünce Subbarow ve ark. tarafından antimetabolit grubunun prototipi olan aminopterin geliştirilmiştir. 1950 li yıllarda ise yerini ametopterine bırakmıştır. Ametopterin bilinen adıyla metotreksattır (20).

2.2.2 Metotreksat Farmakokinetik Özellikleri

Metotreksat oral uygulama sonrası ortalama %70 absorbe edilir. Aktif olarak proksimal jejenumdan absorbe edilir. Klinik çalışmalarda bireyler arasında ciddi varyasyonlar bildirilmiştir (%64-90 arası) (21). Oral uygulama sonrası 0.75-2 saat içinde maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşır ve 24 saat içinde tespit edilemez düzeye gelir (21). Yiyecek ile alımında maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşma süresinin değişebileceği ancak absorbsiyon miktarının etkilenmediği bildirilmiştir.

Uygulanan metotreksatın %35-50 si albümine bağlanır (20). Kararlı durumda dağılım hacmi yaklaşık 1L/kg dır. Doku ve hücrelere dağılan metotreksat hızla poliglutamatlarına dönüştürülür (21). Metotreksat hidrofilik yapıdadır ve oral alım sonrası ilk geçiş etkisine uğramaktadır (22). Metotreksat ve metabolitlerinin ekskresyonunda ana yol ürinerdir. Ancak karaciğerde hidroksilasyona uğradıktan sonra %30 a kadar safra yolu ile ekskrese edildiği de bildirilmiştir (20).

2.2.3 Metotreksat Farmakodinamik Özellikleri

Metotreksat dihidrofolat redüktazın yarışmalı inhibitörüdür. Yapıca folik aside benzer. Dihidrofolatın tetrahidrofolata dönüşümünü engelleyerek hücresel replikasyona etki eder. Hücre bölünmesinin S fazına etkilidir (20).

Metotreksatın farmakolojik etkisinde primer olarak dihidrofolat redüktaz, timidilat sentaz ve aminoimidazol karboksamid ribonükleotid transformilaz (AKRT) gibi enzimleri inhibe etmesi sorumludur (21).

Metotreksat poliglutamatlarının AKRT aktivasyonunu çok daha kuvvetli inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu durum metotreksat poliglutamatlarının, metotreksatın biyolojik olarak aktif formu olduğuna işaret etmektedir (23).

2.2.4 Metotreksat Klinik Endikasyonları

Metotreksat ilaç kullanım hataları ölüme yol açabilen dikkatle kullanılması gereken bir ajandır (24). Şiddetli psöriasiste, ilk basamak tedaviye yanıtsız şiddetli romatoid artritte, mesane kanserinde ve primer santral sinir sistemi lenfomasında subkutan yol ile uygulanmaktadır. Akut lenfoid lösemi, ektopik gebelik, gestasyonel trofoblastik neoplazi,mikozis fungoides, şiddetli psöriasis ve gebelik terminasyonunda intramuskuler yol ile uygulanmaktadır. Meningeal lösemide intratekal kullanımı bulunmaktadır. Akut lenfoid lösemide, meme kanserinde, graft versus host hastalığı profilaksisinde, baş-boyun kanserlerinde, osteosarkomda, şiddetli psöriasiste ve ürotelyal karsinomda intravenöz yol ile uygulanmaktadır. Akut lenfoid lösemi, mikozis fungoides, non-hodgkin lenfomada, şiddetli psöriasiste, romatoid artrit ve sarkoidoziste ise oral yol ile kullanılmaktadır (25).

2.2.5 Metotreksat Advers Etkileri

Antifolatların primer toksisitesi kemik iliği ve intestinal epitel üzerinedir. Sık karşılaşılan advers etkiler arasında gastrointestinal sistem problemleri, stomatit, karaciğer fonksiyonlarında bozulma, ekstremitelerde maküler döküntü, alopesi, ateş bildirilmiştir. Ciddi advers etkiler ise hepatotoksisite, nefrotoksisite, kemik iliği supresyonu, lenfoproliferatif hastalıklar olarak bildirilmiştir (26).

2.2.6 1

Bir ilacın etkileri başka bir ilaç, bitkisel ürün, yiyecek, içecek veya diğer çevresel kimyasal ajanlarla birlikte kullanıldığında değişir ise etkileşimin meydana geldiği belirtilmiştir. İlaç etkileşimi herhangi bir maddenin bir ilacın etkisinde ölçülebilir bir değişime neden olması olarak da tanımlanabilir. Bu madde reçeteli veya reçetesiz bir ilaç, besin, alkol, sigara ya da tanı amaçlı verilen bir ilaç da olabilir. İlaçla birlikte, belli bir süre önce veya sonra uygulanmış olabilir. Ölçülebilir değişimden kasıt ilacın etki gücünde ya da etki süresinde meydana gelen bir değişimdir (27).

İlaç etkileşimleri kompleks terapötik ajanların sayısının artışı, polifarmasi gibi nedenlerden dolayı advers ilaç reaksiyonlarının önemli bir nedeni haline gelmiştir.

Metotreksat-besin etkileşimi açısından kola ile beraber alımının metotreksatın serum düzeylerini ve toksisite riskini artırdığı bildirilmiştir (25).

Genel itibari ile canlı aşıların metotreksat ile kullanımı kontrendikedir (25). Metotreksat ile bildirilen major etkileşimler aşağıda listelenmiştir. Kolay tespit edilebilmesi adına alfabetik sıra ile listelenmiştir.

Tablo 1. Metotreksat-Major İlaç Etkileşimleri (25)

A	Aseklofenak, Asemetazin, Asetazolamid, Asetilsalisilikum asidum, Adenovirüs aşısı, Amoksisilin, Amtolmetin guasil, Asparajinaz, Aspirin
B	Bacillus Calmette-Guerin aşısı, Bentiromid, Bromfenak, Bufeksamak
Ç	Çiçek aşısı
D	Dantrolen, Darolutamid, Dengue tetravalan aşı, Deksibuprofen, Deksketoprofen, Dekslansoprazol, Diklofenak, Dikloksasilin, Diflunisal, Dipiron, Doksifluridin, Doksisiklin, Droksikam

E	Enasidenib, Esomeprazol, Etodolak, Etofenamat
F	Felbinak, Fenbufen, Fenoprofen, Fepradinol, Feprazon, Floktafenin, Floksasilin, Flufenamik asit, Fluorourasil, Flurbiprofen, Foskarnet, Fosfenitoin, Fenilbutazon, Fenitoin
G	Gümüş sülfadiazin
H	Hidroklorotiazid
İ	İbuprofen, İndometazin, İnfluenza aşısı
K	Kırmızı pancar kökü, Kalsiyum propiyonat, Kapesitabin, Kapmatinib, Kloral hidrat, Kolera aşısı, Kolin salisilat, Kloniksin, Ketoprofen, Ketorolak
L	Lasmiditan, Leflunomid, Levetirasetam, Lornoksikam, Loksoprofen, Lumirakoksib
M	Magnezyum salisilat, Meklofenamat, Mefenamik asit, Meloksikam, Mezlosilin, Midostaurin, Morniflumat
N	Nabumeton, Naproksen, Nepafenak, Niflumik asit, Nimesulid, Nitröz oksit
O	Omeprazol, Oksaprosin, Oksifenbutazon
P	Pantoprazol, Parekoksib, Penisilin G, Penisilin V, Peksidartinib, Piketoprofen, Piroksikam, Pirprofen, Polio virüs aşısı, Potasyum propiyonat, Pranoprofen, Pristinamisin, Probenesid, Proglumetazin, Proguanil, Propionik asit, Propifenazon, Prokuazon, Primetamin
R	Rabeprazol
S	Selekoksib, Salisilat, Sapropterin, Simeprevir, Sodyum propiyonat, Sodyum salisilat, Sülfasetamid, Sülfasitin, Sülfadiazin, Sülfametizol, Sülfametoksazol, Sülfapiridin, Sülfisoksazol, Sülsosalisilik asit, Sulindak, Sarı humma aşısı
T	Tafamidis, Tamoksifen, Tegafur, Tenaksikam, Teriflunomid, Tiaprofenik asit, Tikarsilin, Tolfenaik asit, Tolmetin, Triamteren, Trimetoprim, Tifo aşısı
V	Valdekoksib, Varfarin
Z	Zonisamid

2.2.7 Metotreksat ve Teratojenite

Metotreksat dihidrofolat redüktaz inhibitörüdür ve dihidrofolatın tetrahidrofolata dönüşümünü engeller. Tetrahidrofolatın pürin ve timidilat sentezi için kritik öneme sahip olduğu bildirilmiştir. Metotreksat hücresel replikasyon ve DNA sentezinde bozulmalara yol açmaktadır (28). Hücresel proliferasyonun yüksek olduğu kanser hücreleri, fetal dokular gibi dokuların metotreksatın etkilerine daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (29).

Metotreksatın teratojenik etkileri 1960'lı yıllardan itibaren tanımlanmaya başlamıştır (28). Fetal maruziyeti sonrası konjenital malformasyon ile sonuçlanan vaka raporları bildirilmeye başlanmıştır. Rapor edilen malformasyonlar ile fetal metotreksat sendromu diğer adıyla metotreksat embriyopatisi ortaya çıkmıştır. Bu sendromun gelişme geriliği, mikrosefali, kraniosinositozis, fasyal dismorfik özellikler ve ekstremite defektlerini içerdiği bildirilmiştir (6). Bununla birlikte hangi malformasyonların fetal metotreksat sendromunun bir parçası olduğunun tam olarak tespit edilmesinin zor olduğu ifade edilmiştir. Erken doğum gibi faktörlerin (örn. erken doğum-inguinal herni ilişkisi), ailevi edinsel özelliklerin (örn. klinodaktili vb.) ve bir çok vakada bulunan multipl ilaç kullanımının rapor edilen malformasyonlara katkıda bulunmuş olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (28). Ek olarak metotreksat doz miktarının, uygulama zamanının farklılıkları gibi faktörlerin de sendroma ait malformasyonların tanımlanmasında güçlüklere yol açtığı bildirilmiştir. Örneğin ektopik gebelik için uygulanan dozların romatizmal hastalıkların geleneksel tedavisindeki dozlarından yüksek olduğu literatürde yer almaktadır (6).

Antimetabolit grubunun prototipi aminopterin, metotreksatın teratojenik etkilerinin ortaya çıkma yolculuğunda önemli bir yer tutmuştur. Folik asit antagonistlerinin gebelikte kullanımı ile ilk malformasyon vakaları aminopterin ile gelmiştir (6). 1950'li yıllarda aminopterin günümüzde metotreksatın kullanımına benzer olarak elektif terminasyon amacıyla kullanılmaktaydı. Nitekim 1952 yılında aminopterin ile terminasyon başarısızlığı sonrası cerrahi olarak tahliye edilen fetüslerde hidrosefali, meningomiyelosel, yarık damak ve dudak gözlenmiştir (30). Bu rapor sonrası yıllar içerisinde gelen vaka raporları ile aminopterin malformasyonları spesifize edilmeye başlanmıştır (6).

Konuya metotreksat bağlamında devam edildiğinde hayvan çalışmalarına da değinmek gerekir; metotreksat maruziyeti sonrası tavuklarda, farelerde, ratlarda ve tavşanlarda gelişimsel anomalilere rastlanmıştır. Ancak bu anomaliler köpek ve maymunlarda yapılan deneylerde meydana gelmemiştir (31). Hayvan çalışmalarını direkt insana uyarlamak mümkün olmasa da, metotreksat deneysel hayvan çalışmalarında da teratojenik etkiler göstermiştir (31).

Metotreksatın insan embriyosu ve trofoblastik dokulara toksisitesi ektopik gebeliklerin terminasyonu ve elektif terminasyonlarda kullanımı sonrası gösterilmiştir (31). Bununla birlikte erken teşhis edilmemiş gebelikler ve başarısız abort girişimleri sonrası da fetal anormalikler gözlenmiştir. Bu gözlemler vaka raporlarına dayandığından nedensellik illişkisi kurulması açısından zorluklar ortaya çıkmıştır (31). Metotreksat ve aminopterin için karakteristik malformasyonun büyük kafa, düşük kulaklar, geniş burun köprüsü ve çıkık gözleri içeren "cloverleaf" yonca yaprağı şeklinde kafatası olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte ilk trimester maruziyeti ile normal, sağlıklı olarak sonuçlanan gebelikleri içeren vaka raporları olduğu da ifade edilmiştir (31).

Vaka raporlarının bir derlemesinde gelişimsel anomalilerle ilişkilendirilen maternal metotreksat dozunun haftada 10 mg üzeri olduğu, maruziyet için kritik zamanın ise konsepsiyon sonrası ilk 6-8 hafta olduğu bildirilmiştir (32). Ancak kritik zaman ve güvenli bir eşik değer açısından belirsizlikler, tereddütler olduğu ifade edilmiştir (31). 2014 yılında bir teratojenite bilgi servisinde gerçekleştirilen prospektif gözlemsel çalışmada, gebelik öncesi 3 ayda metotreksat maruziyeti olan 135 gebelik ve konsepsiyon sonrası metotreksat maruziyeti olan 182 gebelik incelenmiştir. Romatolojik hastalığı olan ve olmayanlar olarak iki ayrı kontrol grubu kullanılmıştır. Metotreksat maruziyeti olan grupta %37.5 spontan abortus gerçekleşmiştir ve bu her iki kontrol grubuna kıyasla yüksek bir orandır. Malformasyon riski metotreksata maruz kalan grupta %6.6 iken, romatolojik hastalığı olan kontrol grubunda %3.6, sağlıklı kontrol grubunda ise %2.9 olarak belirtilmiştir. Malformasyon riskinin istatistiksel olarak sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek olduğu, ancak romatolojik hastalığa sahip kontrol grubu ile istatistiksel farklılık göstermediği ifade edilmiştir (33).

Metotreksatın maternal maruziyeti sonrası teratojenik etkilerine dair veriler 1960'lı yıllardan günümüze literatürde birikmeye devam etmektedir. Metotreksatın maternal maruziyeti ile anne ve bebek üzerine advers etkileri, paternal maruziyeti hakkında da soru işaretleri oluşturmuş, potansiyel baba adaylarında endişeye yol açmıştır. Bu durum konu hakkında bu meta-analizin gerçekleştirilmesinde itici bir güç olmuştur.

2.2.8 Metotreksat Reprodüktif Etkiler

Romatoid artrit nedeniyle haftalık 12.5 mg metotreksat alan üç erkekte impotans rapor edilmiştir, ilaç kesildiğinde seksüel disfonksiyonun gerilediği bildirilmiştir (34). Metotreksatın gonadal fonksiyonlar üzerine erkeklerde oligospermi/azospermi kadınlarda amenore gibi toksik etkilerini bildiren raporlar bulunmaktadır. Bu etkiler metotreksatın kanser terapisinde diğer ajanlarla birlikte kullanıldığı raporlardan bildirilmiştir(31) Metotreksat içeren tedavi rejimleri altında sağlıklı vakaları bildiren raporlar bulunmaktadır (31).

2.3 Sistematik Derleme ve Meta-analiz

Sistematik derlemeler; sağlık otoritelerinin erişilebilir, güncel ve yüksek kalitede veri ihtiyacına yöneliktir. Spesifik bir araştırma sorusunu yanıtlamak adına önceden belirlenmiş uygunluk kriterlerine uyan tüm ampirik kanıtlar toplanmaya çalışılır. Sistematik derlemeler, metot açısından tecrübeli ve ilgili alanda uzman bir takım tarafından yapılmalıdır. Başarılı bir sistematik derleme için veri yönetimi, proje yönetimi ve kalite değerlendirme mekanizmaları kritiktir (35).

Sistematik derlemeye ek olarak mümkünse meta-analiz yapılmalıdır. Meta-analizler kısaca iki ya da daha fazla çalışmanın sonuçlarının istatistiksel olarak kombinasyonudur. Meta-analizlerin çeşitli avantajlarından bahsetmek gerekirse (36);

1. Bir çok çalışma tek başına yeterli kanıt düzeyini sunmak için küçüktür. Daha yüksek örneklem boyutu ve veri ile daha hassas bir öngörüde bulunulabilir.
2. Primer çalışmalar genellikle spesifik bir gönüllü popülasyonu ve belirli müdahaleleri içerir. Çalışmaların popülasyon ve müdahalelerinde varyasyonlar olabilir. Meta-analizler ile daha geniş bir yelpazede, bu varyasyonlar eşliğinde etkinin tutarlılığı araştırılabilir.

3. Meta-analizler literatürde çelişkili bulgular mevcut ise tartışmayı çözmek ve yeni hipotezler oluşturmak için kullanılabilir. Bulguların istatistiksel olarak sentezi literatürdeki farklı sonuçların araştırılması ve açıklanmasında rol oynar.

Meta-analizler kanıt piramidinin en üst basamağında yer alan, kanıt değeri en yüksek çalışmalardır. Örneklem boyutunu ve kanıt düzeyini arttırarak klinik karar verme aşamasında önemli yer tutarlar. Planlanması ve yürütülmesinin standardize protokoller ile sağlanması kritiktir. 1999 yılında yayımlanan "the QUOROM statement" bu konudaki ilk kontrol listesi ve akış diyagramını ortaya koymuştur (37). Sonrasında geliştirilerek 2009 yılında PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses) oluşturulmuş ve en son 2020 yılında güncel halini almıştır (EK-1) (38).

Çalışmanın konusu olan gebeler etik açıdan hassas popülasyon olduğundan konuya dair araştırmalar kohort veya vaka-kontrol türü gözlemsel çalışmaları içermektedir. Bu yüzden kohort ve vaka-kontrol havuzlanmasına yönelik bir meta-analizin gerçekleştirilmesi aşağıda basamaklar halinde anlatılmıştır.

Şekil 1. Kanıt Piramidi

2.3.1 Kapsam ve araştırma sorusu belirlenmesi

Bir meta-analiz sistematik derlemeden bağımsız düşünülemez. Meta-analizin öncesinde, araştırma sorusuna dair bir sistematik derleme gerçekleştirilmelidir. Sistematik derleme ve meta-analizler, cevaplanabilir soruları ele almalı ve literatürdeki önemli bir bilgi boşluğunu doldurmalıdır. Araştırma soruları geniş veya daha dar bir alana odaklanabilir. Sahadan, ilgili paydaşlardan görüş almak doğru sorunun ele alınmasına katkıda bulunabilir (39).

Araştırma sorusu geliştirilirken kullanılması için FINER kriterleri önerilmiştir. Bu kriterler çalışma başlangıcında göz önünde bulundurulmalıdır (39).

Tablo 2. FINER kriterleri

F- Feasible	Uygulanabilir
I- Interesting	İlgi çekici
N- Novel	Yeni
E- Ethical	Etik
R- Relevant	Amaca uygun

Hem araştırma sorusu, hem de dahil etme/dışlama kriterlerini belirlerken faydalanılabilen PICO kriterleri vardır (39).

Tablo 3. PICO kriterleri

P-Population	Hasta grubu
I- Intervention	Müdahale
C- Comparison	Karşılaştırma
O- Outcome	Sonuç

2.3.2 Literatür taraması ve çalışma seçimi

FINER ve PICO kriterlerine de dayanarak araştırma sorusu belirlendikten sonra ilgili veritabanlarında literatür taraması yapılmalıdır. Mümkün olduğu kadar çok veritabanı taranmalıdır. Raporlar, tezler, konferans özetleri vb. içeren gri literatür de

yanlılıktan kaçınmak adına taranmalıdır. Konuya ilişkin derlemelerin, dahil edilen çalışmaların referansları elle taranmalıdır. Literatür taraması mümkün olduğu kadar güncel olmalıdır (40).

Arama terimlerinin aralarına gerekli "OR" , "AND" uygun bir biçimde yerleştirilerek literatür taraması gerçekleştirilmelidir. Konuya ilişkin önceki derlemeler göz önünde bulundurularak anahtar kelimelerin hangi kombinasyonlarda kulllanıldığı kontrol edilmeli ve arama terimleri çeşitlendirilmelidir.

Çalışma seçimi noktasında araştırma sorusunun, hasta popülasyonunun ve müdahalenin önemi artmaktadır. Örneğin gebelik gibi özel bir popülasyonda çalışırken etik kurallar gereği gözlemsel çalışmalar yapılmaktadır. Bu durumda çalışma seçerken vaka-kontrol, kohort gibi kontrol grubu içeren gözlemsel çalışmalar seçilmesi gerekmektedir.

Cochrane kılavuzuna göre; taramalar makul bir kesinlik (precision) içerirken maksimum duyarlılık (sensitivity) hedeflenmelidir. Daha iyi anlamak adına aşağıda tablo incelenebilir (40).

Tablo 4. Duyarlılık ve Kesinlik

	Toplanan Raporlar	Toplanmayan Raporlar
İlişkili Çalışmalar	A	B
İlişkisiz Çalışmalar	C	D
Duyarlılık: A/(A+B), Kesinlik A/(A+C)		

2.3.3 Veri toplama

Veri çekme, sağlıklı bir meta-analiz gerçekleştirilmesi için hayati öneme sahiptir ve titizlikle yapılmalıdır. Başarılı veri çekmenin anahtarı yapılandırılmış, kullanımı kolay taslak formların hazır olmasıdır. Analiz edilecek veya dönüştürülmesi gerekecek veriler belirlenmeli, gerektiğinde paylaşıma hazır olacak şekilde toplanmalı ve arşivlenmelidir (41).

Veri çekmede göz önünde bulundurulması gereken belli başlı kriterler bulunmaktadır. Veri toplanılan formun aşağıdaki tabloda listenen başlıkları içermesi önerilmektedir (41).

Tablo 5. Veri çekme formunda bulunması önerilen başlıklar

Veri çekimine ilişkin bilgi	Veri çeken araştırmacıların ismi, veri çekme tarihi
Uygunluk kriterleri	Çalışmanın derlemeye uygunluğunun kontrolü, dışlanacak ise nedeni
Çalışma metodu	Çalışma dizaynı, istatistiksel analiz
Katılımcılar	Veri toplanan ülke, bölge, veritabanı, katılımcı karakteristikleri
Müdahale	Müdahale ve kontrol grubuna dair detaylar (maruziyet süresi, doz, ek kontrol grubu vb.)
Sonuçlar	Her bir grup için dikotom veri, müdahalenin etkisini sayısal olarak ifade eden odds oranı, risk oranı ve subgrup analizi yapıldıysa onun için de benzer veri ekstraksiyonu
Ek yorum	Çalışma yazarlarından anahtar sonuçlar, sorumlu yazardan ek bilgi almak gerekip gerekmediği, konu ile ilişkili diğer çalışmalara referans

2.3.4 Çalışmaların yanlılığının değerlendirilmesi ve kalitelerinin skorlanması

Sistematik derleme ve meta-analiz yazarları, dahil edilen çalışmaları çalışma özelinde ve çalışmalar arası yanlılık açısından açık bir biçimde değerlendirmelidir. Cochrane grubu yanlılık değerlendirmesinde "ROBINS-I tool" kullanımını önermektedir (EK-2). ROBINS-I aracının randomize ve non-randomize çalışmalar için versiyonları bulunmaktadır. Ayrıca dahil edilen çalışmaların kalite skorlamaları

da yapılmalıdır. “Newcastle-Ottawa Skale” (NOS)” bu amaçla kullanılan bir skaladır (EK-3). Bu değerlendirmeler birbirinden bağımsız iki araştırmacı tarafından kör olarak yapılmalı, gereğinde üçüncü bir araştırmacıya danışılmalıdır (42).

Tablo 6. ROBINS-I aracı tarafından sorgulanan yanlılık kaynakları

Müdahale öncesi	Karıştırıcı faktörler dolayısıyla yanlılık
	Çalışmaya katılımcıların seçilmesinde yanlılık
Müdahale	Müdahalenin sınıflandırılması kaynaklı yanlılık
Müdahale sonrası	Müdahaledeki deviasyonlar kaynaklı yanlılık
	Kayıp veri dolayısıyla yanlılık
	Sonuçların ölçümü kaynaklı yanlılık
	Rapor edilen sonuçların seçimi kaynaklı yanlılık

Havuzlanan çalışmalar arası yanlılık riskini özetlemek için yazarlar belli bir kılavuza göre hareket etmelidirler. Bunun için kanıtların kalitesi ve kesinliğinin değerlendirildiği GRADE aracı kullanılabilir (42).

Totalde bu skala ve araçlar ortaya çıkan verinin kalitesi, kesinliği ve yapılması muhtemel subgrup analizlerinde ne gibi farklılıkların oluştuğunun ortaya konması bakımından önemlidir.

2.3.5 Analitik süreç

Analitik sürece geçmeden, dahil edilmesi planlanan çalışmalar ve duyarlılık analizinde kullanılacak çalışmalardan etki büyüklükleri ve %95 güven aralıklarının yukarıda tablo 5 te özetlenen veri çekme formuna toplanması gerekmektedir. Etki büyüklüğü çalışmalarda odds oranı (OR), risk oranı (RR), tehlike farkı (HR) ve risk farkı (RD) gibi farklı şekillerde verilebilir. Çalışmamızda havuzlanması planlanan vaka-kontrol çalışmalarında daha çok odds oranı, kohort çalışmalarında ise risk oranı ile etki büyüküğü ifade edilir. Çalışma çıktısının prevalansı %10’dan düşük bir değer ise odds oranı ve risk oranı birbiri yerine kullanılabilmekte ve neredeyse eşit oldukları varsayılmaktadır (43).

Toplanan etki büyüklükleri, ilgili çıktıya yönelik tek bir etki büyüklüğü elde etmek amacıyla meta-analiz programlarında havuzlanır. Bu meta-analitik analiz programlarına RevMan 5 (Cochrane Collaboration, Oxford, U.K.), Stata (StataCorp, College Station, TX, USA) ve R (www.r-project.org) örnek olarak verilebilir (44). Veri havuzlamada kullanılan iki temel etki modeli bulunmaktadır: Sabit etki modeli ve Rastgele etki modeli. Sabit etki modelinde çalışmaların homojen olduğu, havuzlanan tüm çalışmaların benzer bir etki büyüklüğüne sahip olduğu varsayımı ile yola çıkılır. Buna karşın; rastgele etki modeli, çalışmalardaki gerçek etki büyüklüklerinin dağılımının olmasına izin verir. Sabit etki modelinin kullanımını anlamak için ilacının etkisini araştıran bir ilaç firması düşünebiliriz. Bunun için firmada aynı araştırmacılar ile, benzer bir yol ile, benzer dozlar ile çalışmalar yapıldığını varsayalım. Birbirinin aynısı bu çalışmaları havuzlarken sabit etki modeli kullanılabilir. Ancak bir çok meta-analiz için sabit etki modeli kullanmak mantıksızdır. Rastgele etki modelinde olduğu gibi çalışmalar arasındaki etki büyüklüklerinin farklı olması gerçek dünya verisi ile daha çok örtüşmektedir. Sabit etki modeli çalışmalardaki heterojenliği yeterince hesaba katmamaktadır (45).

2.3.6 Heterojenitenin değerlendirilmesi

Sistematik bir derlemede çalışmalar arasındaki her türlü değişkenlik heterojenite olarak tanımlanabilir. Farklı heterojenite türlerini birbirinden ayırmak konuyu daha iyi anlama adına faydalı olabilir (36).

Tablo.7 Heterojenite türleri

Klinik heterojenite	Katılımcılar, müdahale ve çalışılan sonuçlarda değişkenlik
Metodolojik heterojenite	Çalışma dizaynı, sonuç ölçüm araçları ve yanlılık riski açısından değişkenlik
İstatistiksel heterojenite	Farklı çalışmalarda değerlendirilen müdahale etkilerindeki değişkenlik

İstatistiksel heterojenitenin; çalışmalar arasındaki kinik veya metodolojik değişkenliklerin bir veya her ikisinin sonucu olduğu bildirilmiştir (36).

Cochrane derlemelerinde orman grafiğine Chi^2 (ki-kare) testi dahil edilir ve heterojeniteyi değerlendirir. Ancak küçük örneklem boyutu olduğunda bu testin düşük bir güce sahip olduğu bildirilmiştir. Bir diğer heterojenite testi olan I^2 daha çok tercih edilir ve daha tutarlı sonuçlar vermektedir. Higgins ve ark. ile Cochrane, I^2 istatistiğini farklı yorumlamışlardır (tablo 8) (36,46)

Heterojenite varlığında veri kontrol edilmeli, yüksek heterojenite varlığında meta-analiz yapılması tercih edilmemelidir. Heterojenite araştırılmalıdır. Bunun için meta-regresyon veya subgrup analizleri yapılabilir. Çalışmalar arasındaki heterojeniteyi değerlendirmek için rastgele etki modeli ile analiz yapılabilir. Ancak bunun kapsamlı bir heterojenite araştırmasının yerini tutmayacağı ifade edilmiştir. Heterojenite varlığının bazen meta-analizdeki bir ya da iki çalışmadan kaynaklanabileceği bildirilmiştir, bu durumda çalışmaları dışlayarak heterojenite kaynağı bulunmaya çalışılabilir(36).

Tablo 8. I^2 testi yorum farkı (46)

Higgins ve ark.	I^2 <%25 heterojenite yok %25< I^2<%50 düşük heterojenite %50<I^2<%75 orta heterojenite %75<I^2 yüksek heterojenite
Cochrane	I^2 <%40 önemli bir heterojenite yok %30< I^2<%60 orta heterojenite %50<I^2<90 önemli miktarda heterojenite %75<I^2<100 dikkate değer bir heterojenite

2.3.7 PROSPERO kaydı

PROSPERO sistematik derlemelerin kayıt edildiği uluslararası bir veritabanıdır. Amaç, sistematik derlemeleri başlangıçta kaydedip çalışmaların duplikasyonundan kaçınılması ve başlangıçta planlanan protokole göre derlemenin tamamlanması ile yanlılık riskinin azaltılmasıdır. PROSPERO kaydı, planlanan çalışmanın dizaynı ve düzenlenmesine dair anahtar bilgileri içerir. PROSPERO kayıtlı her derlemeye benzersiz bir kayıt numarası verir. Bu numaraya yayın ve raporlarda atıfta bulunulabilir (47).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına dair izin "0084" nolu karar ile İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

3.1 Araştırma Sorusu

Araştırma sorusu literatürdeki eksiklik ve klinik olarak cevaplanma ihtiyacına istinaden aşağıdaki cümle olarak belirlenmiştir:

"Paternal metotreksat maruziyeti ile major konjenital malformasyon ve diğer advers gebelik sonuçları arasında bir ilişki var mıdır?"

Konuya dair devam etmekte olan meta-analiz olup olmaması ve duplikasyon açısından PROSPERO veritabanı kontrol edilmiştir. Çalışma CRD42022336216 kayıt numarası ile PROSPERO veritabanına kaydedilmiş, online olarak ulaşılabilmektedir.

3.2 Literatür Taraması

15 Nisan 2022 tarihine kadar aşağıda belirtilen arama terimleri ile belirtilen şekillerde literatür taraması yapılmıştır. Pubmed, Web of Science ve Reprotox veritabanları taranmıştır.

Arama terimi kombinasyonları: (men OR man OR male OR father OR paternal) AND Methotrexate AND (pregnancy OR birth defects OR congenital abnormalities OR congenital malformations).

Herhangi bir dil kısıtlaması uygulanmamıştır. Ek olarak, potansiyel dahil edilme kriterlerine uyan çalışmaları bulmak için konuya dair derlemelerin referanslarında manuel bir tarama da yapılmıştır.

Veritabanlarından toplanan çalışmalar Mendeley referans yönetim programında birleştirilip duplikasyonları elenmiştir. Duplikasyonları elenen çalışmalar Rayyan sistematik derleme aracında taranmıştır.

3.3 Dahil Edilme Kriterleri

- Prekonsepsiyonel ve konsepsiyonel dönemde paternal metotreksat maruziyetini araştıran kohort veya vaka-kontrol çalışmaları,

- Yayınlanmamış veriler de dahil edilmek üzere tam metin veya özet halinde makaleler,
- Paternal metotreksat maruziyeti bulunmayan kontrol grubu içeren çalışmalar,
- Dahil edilmesi planlanan bir diğer çalışma ile duplike veri içermemesi
- Dil kısıtlaması ise bulunmamaktadır.

3.4 Dışlama Kriterleri

- Vaka raporları, vaka serileri, editöre mektuplar, derlemeler, randomize kontrollü çalışmalar, hayvan çalışmaları, in vitro çalışmalar, ilişkisiz çalışmalar
- Duplike veri içeren vaka kontrol ve kohort çalışmalarından kalite skoru düşük olanlar

3.5 Çalışma Çıktılarının Belirlenmesi

Çalışmanın birincil çıktısı olarak prekonsepsiyonel ve konsepsiyonel dönemde paternal metotreksat maruziyeti sonrası major konjenital malformasyonlar belirlenmiştir.

Çalışmanın ikincil çıktısı olarak diğer advers gebelik sonuçları (kardiyak malformasyonlar, spontan abortus, canlı doğum, elektif terminasyon, ölü doğum ve erken doğum) belirlenmiştir.

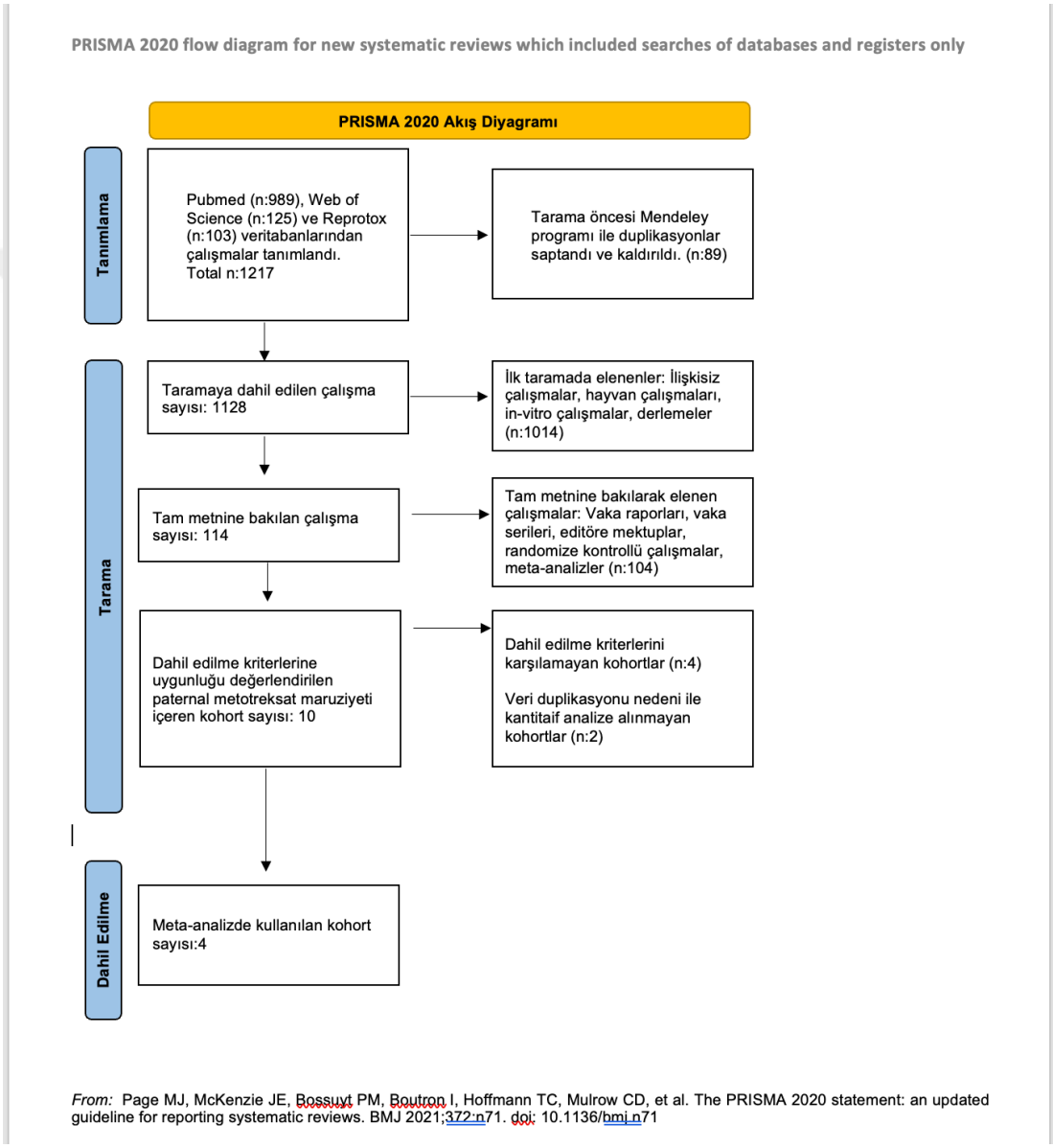
3.6 PRISMA Akış Diyagramının Oluşturulması

Duplikasyonları elenip Rayyan sistematik derleme aracına atılan çalışmalar, dahil edilme ve dışlama kriterleri göz önünde bulundurularak aşamalı bir elemeye tabii tutulmuştur. İlk aşamada ilişkisiz çalışmalar, hayvan çalışmaları, in vitro çalışmalar, derlemeler elenmiştir. Devamında çalışma başlık veya özetinde "gebelik, malformasyon, metotreksat, paternal" gibi anahtar arama terimleri bulunan çalışmaların tam metni değerlendirilmiştir.

İkinci taramada tam metni incelenen çalışmalardan vaka raporu, vaka serisi, editöre mektup, derleme, randomize kontrollü çalışmalar ve meta-analizler elenmiştir.

Dahil edilme kriterlerini karşılayan kohort ve vaka-kontrol çalışmaları meta-analize dahil edilmiştir.

Meta-analize dahil edilen çalışmalar belirlendikten sonra PRISMA akış diyagramı oluşturulmuştur (Şekil 2). Bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde PRISMA 2020 yılı güncel kontrol listesi gözetilmiştir (EK-1) (38)



Şekil 2. Akış Diyagramı

3.7 Çalışmaların Kalite Skorlaması ve Yanlılık Değerlendirmesi

Paternal metotreksat maruziyeti içeren kohort ve vaka-kontrol çalışmaları birbirinden bağımsız üç araştırmacı tarafından Newcastle-Ottawa skalası ile değerlendirilmiştir ve değerlendirme farklılıkları dördüncü bir araştırmacı tarafından çözülmüştür (tablo 9). Duplikasyon içeren çalışmalardan Newcastle-Ottawa kalite skoru yüksek olanın dahil edilmesi planlanmıştır.

Paternal metotreksat maruziyeti içeren kohort ve vaka-kontrol çalışmaları birbirinden bağımsız üç araştırmacı tarafından ROBINS-I tool ile yanlılık değerlendirmesi yapılmıştır (tablo 9). Değerlendirme farklılıkları dördüncü bir araştırmacı tarafından çözülmüştür. ROBINS-I tool detaylı değerlendirmesi EK-4'te verilmiştir.

Ek olarak meta-analizi yapılan çalışma çıktılarının kalitesi ve kesinliği GRADEpro aracı ile değerlendirilmiştir. Detaylı değerlendirme EK-5 ve EK-6 da verilmiştir.

3.8 Meta-Analitik Yöntem

Dahil edilen çalışmalardan, ilgili her bir çıktı için, mevcut ise OR, RR veya RD %95 güven aralıkları ile çekilmiştir, mevcut değil ise ham veri kullanılmıştır. Elde edilen dikotom veriler için OR, RR, RD ile %95 güven aralıkları Mantel-Haenzsel metodu kullanılarak hesaplanmıştır. Review Manager (RevMan, Computer program. Version 5.4. The Cochrane Collaboration, 2020) meta-analiz programında rastgele etki modeli kullanılarak logaritmik odds oranları (log OR) ve logaritmik standard hatalar (log SE) havuzlanmıştır.

3.9 Heterojenite Değerlendirilmesi

Heterojenite I^2 istatiği ile değerlendirilmiştir. I^2<%25 heterojenite yok, %25< I^2<%50 düşük heterojenite, %50< I^2<%75 orta heterojenite, %75< I^2 yüksek heterojenite olarak kabul edilmiştir (46).

4. BULGULAR

Dahil edilme kriterlerini karşılayan altı kohort çalışması elde edildi (4,5,12,48–50). Eck ve ark., Winter ve ark. ve Egeberg ve ark. tarafından Danimarka'da gerçekleştirilen çalışmalarda duplikasyon tespit edildi (5,48,50). Bu üç çalışmanın NOS skorları aynı olmakla birlikte Eck ve ark. major konjenital malformasyon araştırırken Winter ve ark. ile Egeberg ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda konjenital malformasyon ("any congenital malformation") araştırılmaktaydı. Bu nedenle major konjenital malformasyon analizine Eck ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışma dahil edildi. Winter ve ark. tarafından yürütülen çalışma ile Eck ve ark. tarafından yürütülen çalışma değiştirilerek bir konjenital malformasyon duyarlılık analizi gerçekleştirildi (Şekil 6).

Weber ve ark. ile Wallenius ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda düşük doz paternal metotreksat maruziyeti bulunmakta iken diğer çalışmalarda doz spesifik olarak belirtilmemişti (4,49). Maruziyet zamanı olarak çalışmalarda konsepsiyon öncesi üç ay belirlenmişti. Detaylar Tablo 9 da verilmiştir.

Konjenital malformasyon tanısında Weber ve ark., Merks ve ark. ile Rasmussen ve ark. çalışmalarını baz alarak klasifikasyon yapmıştı (4,51,52). Major doğum defektleri metotreksat embriyopatisine işaret eden malformasyonlara özel olarak dikkat edilerek tıbbi, cerrahi veya kozmetik önemi olan yapısal anormallikler olarak tanımlanmıştı. Diğer çalışmalarda ICD kodları ve EUROCAT baz alınarak klasifikasyon yapılmıştı (5,12,48–50).

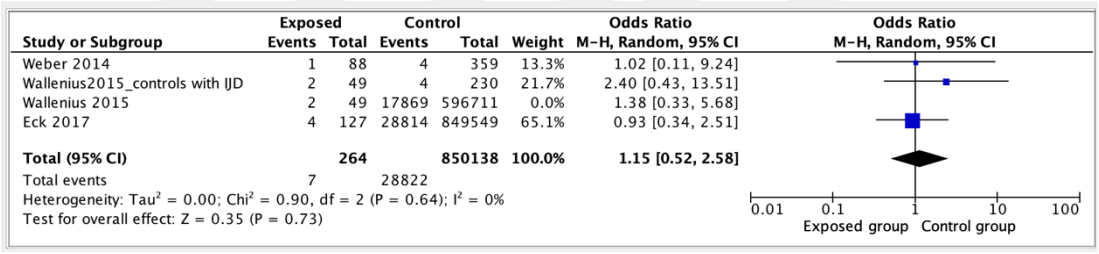
4.1 Dahil Edilen Çalışmaların Meta-analizi

Dahil edilen çalışmalardan çekilen veriler major konjenital malformasyon, ölü doğum ve erken doğum analizlerine izin vermiştir ve bu çalışma çıktılarının meta-analizi gerçekleştirilmiştir. Meta-analiz sonuçlarının kalitesi ve kesinliği GRADEpro aracı ile değerlendirilmiştir ve EK-5 ve EK-6'da sunulmuştur.

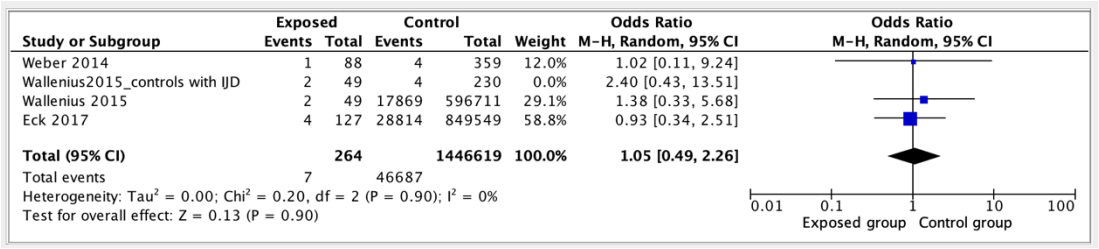
4.1.1 Major Konjenital Malformasyonların Meta-analizi

Ana Analizler

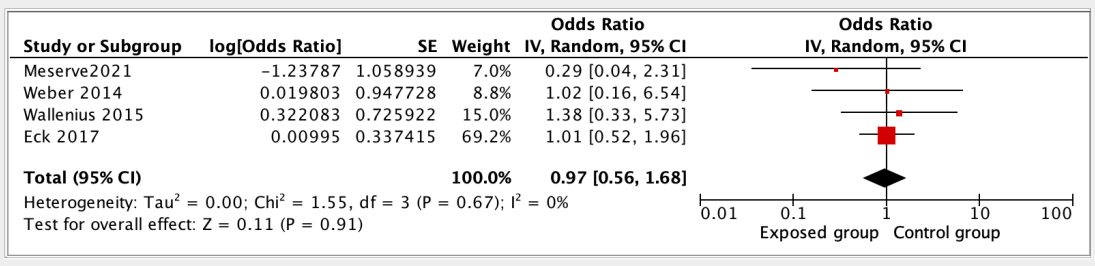
Ham veriler ile yapılan major konjenital malformasyon analizine üç çalışma dahil edildi ve iki ayrı analiz yapıldı (4,48,49). İlk analizde Wallenius ve ark. çalışmasında inflamatuar eklem hastalığı bulunan hastalar kontrol grubu olarak kullanıldı (Şekil 3). İkinci analizde Wallenius ve ark. çalışmasından konsepsiyon öncesi üç ay içerisinde paternal metotreksat maruziyeti bulunmayanları içeren kontrol grubu çekildi ve kullanıldı (Şekil 4). Wallenius ve ark. çalışmasından çekilen inflamatuar eklem hastalıklı kontrol grubu ve sağlıklı kontrol grubu ile yapılan ayrı ayrı analizler bu hastalık grubunun sonuçlar üzerindeki etkisinin üstesinden gelebilmek, istatistiksel olarak fark oluşturup oluşturmadığını gözlemek amacıyla gerçekleştirildi. Kafa karıştırıcı faktörlerin üstesinden gelebilmek ve daha net sonuçlar ortaya koyabilmek adına çalışmalarda bildirilen aOR'lar ile yapılan major konjenital malformasyon üçüncül analizine dört çalışma dahil edildi (Şekil 5) (4,12,48,49).



Şekil 3. Ham veriler ile yapılan major konjenital malformasyon birincil analizi



Şekil 4. Ham veriler ile yapılan major konjenital malformasyon ikincil analizi



Şekil 5. aOR'ler ile yapılan major konjenital malformasyon üçüncül analiz

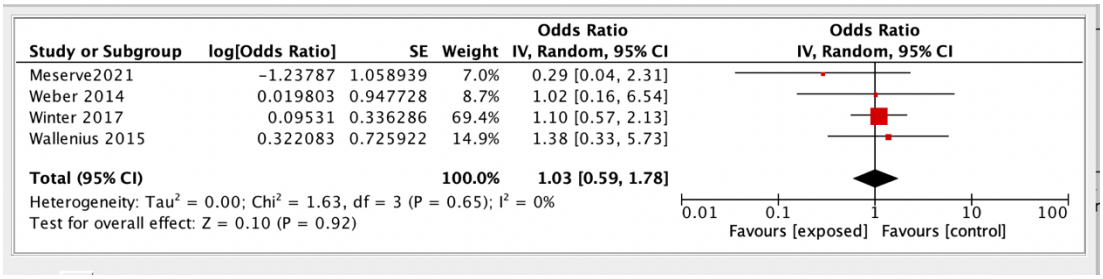
Ham veriler ile yapılan major konjenital malformasyon birincil analizinde 264 maruziyet grubu, 850138 kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Birincil analizde paternal metotreksat maruziyeti sonrası major konjenital malformasyon riskinde anlamlı bir artış gözlenmedi (OR 1.15; [%95CI 0.52, 2.58]) (I^2=%0, P=0.64) (Şekil 3).

Ham veriler ile yapılan major konjenital malformasyon ikincil analizinde 264 maruziyet grubu, 1446619 kontrol grubu ile karşılaştırıldı. İkincil analizde paternal metotreksat maruziyeti sonrası major konjenital malformasyon riskinde yine anlamlı bir artış gözlenmedi (OR 1.05; [%95CI 0.49, 2.26]) (I^2=%0, P=0.90) (Şekil 4).

Kafa karıştırıcı faktörler göz önünde bulundurularak bildirilen aOR'ler ile yapılan üçüncül analizde paternal metotreksat maruziyeti sonrası major konjenital malformasyon riskinde anlamlı bir artış gözlenmedi (OR 0.97; [%95CI 0.56, 1.68]) (I^2=%0, P=0.67) (Şekil 5).

Duyarlılık Analizi

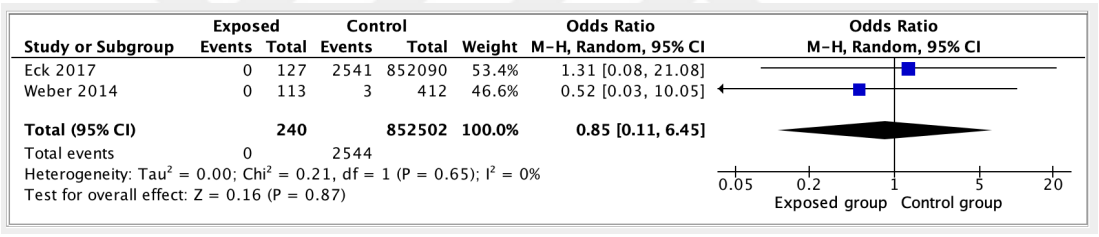
Duyarlılık analizinde aralarında duplikasyon bulunan Eck ve ark. çalışması ile Winter ve ark. çalışması değiştirildi. Duplike olan iki çalışma yer değiştirilerek sonuçlar üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olup olmadığı kontrol edildi. Kafa karıştırıcı faktörler göz önünde bulundurularak bildirilen aOR'lar ile yapılan konjenital malformasyon duyarlılık analizine 4 çalışma dahil edildi. Duyarlılık analizinde paternal metotreksat maruziyeti sonrası konjenital malformasyon riskinde yine anlamlı bir artış gözlenmedi (OR 1.03; [%95CI 0.59, 1.78]) (I^2=%0, P=0.65) (Şekil 6).



Şekil 6. aOR'ler ile yapılan konjenital malformasyon duyarlılık analizi

4.1.2 Ölü Doğumların Meta-analizi

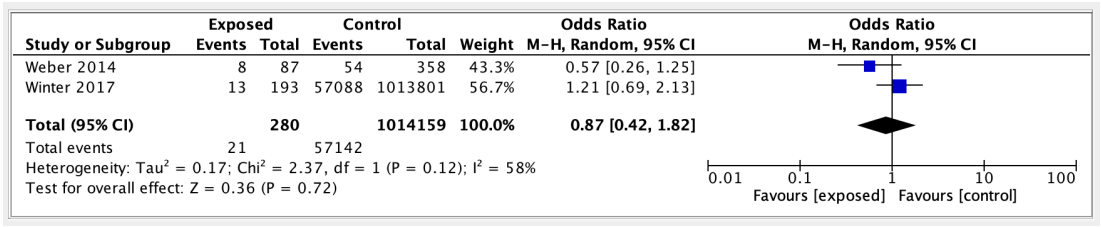
Ham veriler ile yapılan ölü doğum analizine iki çalışma dahil edildi (4,48). 240 kişilik maruziyet grubu, 852502 kişilik kontrol grubu ile kıyaslandı. Paternal metotreksat maruziyeti sonrası ölü doğum riskinde anlamlı bir artış gözlenmedi (OR 0.85; [%95CI 0.11, 6.45]) (I^2=%0, P=0.65) (Şekil 7). Çalışmalardan bu çıktıya dair aOR çekilemediğinden sadece ham veri analizi gerçekleştirildi.



Şekil 7. Ham veriler ile yapılan ölü doğum analizi

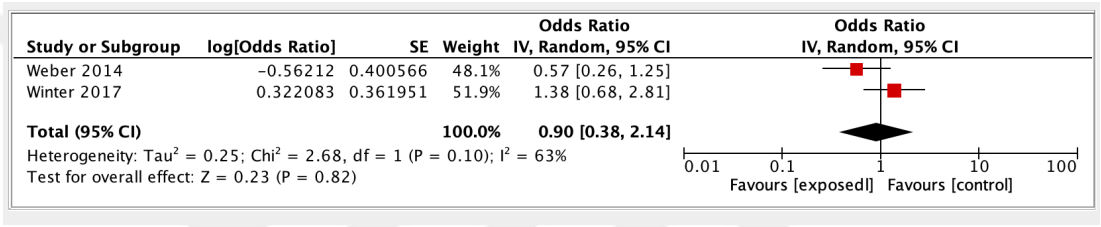
4.1.3 Erken Doğum Meta-analizi

Erken doğum meta-analizine dahil edilme kriterlerini sağlayan çalışmalardan iki çalışma dahil edildi ve iki ayrı analiz yapıldı (4,5). Birincil analizde ham veriler ile 280 kişilik kontrol grubu, 1014159 kişilik kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Birincil analiz ile paternal metotreksat maruziyeti sonrası erken doğum riskinde anlamlı bir artış gözlenmedi (OR 0.87; [%95CI 0.42, 1.82]) (I^2=%58, P=0.12) (Şekil 8). I^2=%58 ile analizde orta düzey bir heterojenite saptandı.



Şekil 8. Ham veriler ile yapılan erken doğum analizi

Winter ve ark. çalışmasından sağlanan aOR ile ikincil analiz gerçekleştirildi (5). İkincil analiz ile paternal metotreksat maruziyeti sonrası erken doğum riskinde yine anlamlı bir artış gözlenmedi (OR 0.90; [%95CI 0.38, 2.14]) (I^2=%63, P=0.10) (Şekil 9). I^2=%63 ile analizde orta düzey bir heterojenite saptandı.



Şekil 9. aOR'ler ile yapılan erken doğum analizi

Tablo 9. Meta-analiz çıktılarını araştıran kohortların karakteristik özellikleri*

	Weber 2014	Lasse-Karlsen-Eck 2017	Meserve 2021	Winter 2017	Wallenius 2015	Egeberg 2017
Ülke	Almanya	Danimarka	Amerika Birleşik Devletleri	Danimarka	Norveç	Danimarka
Çalışma Dizaynı	Prospektif gözlemsel kohort	Gözlemsel kohort	Retrospektif kohort	Kayıt tabanlı kohort	Gözlemsel kohort	Popülasyon tabanlı kohort
Veri Tabanı	Teratojenite Bilgi Servisi	Danimarka Ulusal Hastane Kayıtları	OptumLabs Veri Deposu	Danimarka ulusal hasta kayıtları, Danimarka tıbbi doğum kayıtları, Danimarka merkezi kişisel kayıt sistemi, Danimarka Ulusal Reçete Veri Sistemi	Norveç tıbbi doğum kayıtları, Norveç modifiye edici antiromatizmal ajan kayıtları	Danimarka tıbbi doğum kayıtları, Danimarka tıbbi ürün istatistiği kayıtları
Çalışma Periyodu	1995-2012	1997-2011	2005-2018	1997-2013	2001-2011	2004-2010

Maruziyet	Düşük doz (≤30 mg/hafta) paternal metotreksat maruziyeti	Paternal metotreksat maruziyeti	Paternal metotreksat maruziyeti	Paternal metotreksat maruziyeti	12.5-20 mg/hafta dozunda paternal metotreksat maruziyeti	Paternal metotreksat maruziyeti
Maruziyet Grubu	Eşleri konsepsiyon esnasında veya konsepsiyondan önceki 3 ay içerisinde düşük doz metotreksata maruz kalmış gebeler (n:113)	Eşleri konsepsiyondan önceki 3 ay içerisinde metotreksata maruz kalmış gebeler (n:127)	20-55 yaş arası, en az 2 defa immun aracılı inflamatuar hastalık medikal kodlaması yapılan ve en az 1 yenidoğanla ilişkilendirilen erkekler, Term bebekler için doğumdan 38-60 hafta öncesi, preterm bebekler için 34-58 hafta öncesinde paternal metotreksat maruziyeti (n:171)	Konsepsiyon öncesi 3 ay içerisinde babasına metotreksat reçetesi yazılmış tekiz doğan çocuklar (n:193)	Konsepsiyon öncesi 3 ay içerisinde inflamatuar eklem hastalığı tanısı bulunan 18-60 yaş arası metotreksat maruziyeti bulunan erkek hastalar (n:49)	1.Konsepsiyon öncesi 3 ay içerisinde ve konsepsiyon sonrası 3 ay içerisinde ek metotreksat reçete edilen babalardan doğan çocuklar (n:81) 2.Konsepsiyon öncesi herhangi bir zamanda metotreksat reçete edilen babalardan doğan çocuklar (n:864)
Kontrol Grubu	Eşleri konsepsiyon esnasında veya konsepsiyondan önceki 3 ay içerisinde herhangi bir	Eşleri konsepsiyondan önceki 3 ay içerisinde metotreksata maruz	İmmun aracılı inflamatuar hastalık tanılı, term bebekler için doğumdan 38-60 hafta	Konsepsiyon öncesi 3 ay içerisinde babasına metotreksat reçetesi	1. Konsepsiyon öncesi 3 ay içerisinde metotreksat maruziyeti bulunmayan inflamatuar eklem	1.Konsepsiyon öncesi 3 ay içerisinde ve konsepsiyon sonrası 3 ay içerisinde metotreksat

	teratojen ajana maruz kalmamış gebeler (n:412)	kalmamış gebeler (n:849549)	öncesi ve preterm bebekler için 34-58 hafta öncesinde, herhangi bir ilaca maruz kalmayan erkekler (n: 5607)	yazılmamış tekiz doğan çocuklar (n:1013801)	hastalıklı erkek hastalar (n:230), 2.Konsepsiyon öncesi 3 ay içerisinde metotreksat maruziyeti bulunmayan erkekler (n:596711)	reçete edilmemiş babalardan doğan çocuklar (n:417553) 2.Konsepsiyon öncesi herhangi bir zamanda metotreksat reçete edilmemiş babalardan doğan çocuklar (n:416770)
Maruziyet Zamanı	Konsepsiyon esnasında veya konsepsiyondan önceki 3 ay içerisinde maruziyet	Konsepsiyondan önceki 3 ay içerisinde maruziyet	Term bebekler için doğumdan 38-60 hafta öncesi ve preterm bebekler için 34-58 hafta öncesinde maruziyet	Konsepsiyondan önceki 3 ay içerisinde maruziyet	Konsepsiyondan önceki 3 ay içerisinde maruziyet	1.Konsepsiyon öncesi 3 ay içerisinde ve konsepsiyon sonrası 3 ay içerisinde ek reçete edilen metotreksat maruziyeti 2.Konsepsiyon öncesi herhangi bir zamanda metotreksat maruziyeti

Dahil edilme kriterleri	Eşleri son adet tarihinden sonraki 2 haftalık dönem veya gebelikten önceki 3 ay içinde romatizmal veya inflamatuar hastalıklar için düşük doz metotreksat (≤30 mg/hafta) ile tedavi edilen gebe kadınlar	Eşleri konsepsiyondan önceki 3 ay içerisinde metotreksata maruz kalmış gebeler	20-55 yaş arası, en az 2 defa immun aracılı inflamatuar hastalık medikal kodlaması yapılan ve en az 1 yenidoğanla ilişkilendirilen erkekler, Babaların doğumdan 18 ay öncesinde immun aracılı inflamatuar hastalık için kayıtlı olması ve en az 3 ay boyunca kayıtlarının devam etmesi	Konsepsiyon öncesi 3 ay içerisinde babasına metotreksat reçetesi yazılmış tekiz doğan çocuklar	18-60 yaş arası, konsepsiyondan önceki 3 ay içerisinde metotreksat maruziyeti bulunan erkek hastalar, Son muayene ve konsepsiyon arası dönemde metotreksatı bırakmış olduğuna dair veri olmaması	1.Eşleri konsepsiyon öncesi ve sonrası 3 ay içerisinde metotreksata maruz kalmış gebeler 2.Eşleri konsepsiyon öncesi herhangi bir zamanda metotreksata maruz kalmış gebeler
Dışlama Kriterleri	Maternal major teratojenlere ve fetotoksik ajanlara maruziyet, Anne veya babanın akut	Paternal Sperm Bağışı, Maternal Fertilizasyon Tedavisi, Paternal Verilerin Eksik Olması	Dahil edilme kriterlerine uymaması	Dahil edilme kriterlerine uymaması	Dahil edilme kriterlerine uymaması	Dahil edilme kriterlerine uymaması

	maligniteleri, Maternal antiepileptik tedavisi, Maternal romatizmal/otoimmün hastalıklar, Başarısız düşük girişimi					
Çalışma Çıktıları	Major konjenital malformasyon, Elektif terminasyon, Ölü doğum, Canlı doğum, Spontan abortus, Erken doğum	Major konjenital malformasyon, Kalp defekti, Ölü doğum, Erken doğum	Major konjenital malformasyon, Erken doğum, Düşük doğum ağırlığı	Konjenital Malformasyon, Erken doğum, Gestasyonel Yaşa göre Küçük Doğum	Major Konjenital Malformasyon, Erken Doğum, Düşük Doğum Ağırlığı, Gestasyonel Yaşa göre Küçük Doğum, Yenidoğan Yoğun Bakım İhtiyacı, Perinatal Ölüm, Post Perinatal Ölüm, Maternal Preeklampsi	Konjenital malformasyon, Düşük doğum ağırlığı, Erken doğum
Konjenital Malformasyon Tanısında Kullanılan Metot	Major doğum defektleri metotreksat embriyopatisine işaret eden malformasyonlara özel olarak dikkat edilerek tıbbi, cerrahi veya kozmetik önemi olan yapısal anormallikler olarak tanımlanmıştır. Merks 2003 ve	EUROCAT	ICD-9 ve ICD-10 ICD: (International Classification of Diseases)	ICD-8 ve ICD-10 ICD: (International Classification of Diseases)	ICD-10 ve EUROCAT ICD: (International Classification of Diseases)	ICD kodları ICD: (International Classification of Diseases)

	Rasmussen 2003 çalışmalarına göre klasifikasyon yapılmıştır.					
Ayarlama yapılan karıştırıcı faktörler	Kohort ve kontrol grubu eğilim skorlarına(propensity score) göre eşleştirilmiştir. Eğilim skorunda maternal yaş, parite sayısı, önceki spontan abortus sayısı, sigara ve alkol tüketimi göz önünde bulundurulmuştur.	Lojistik regresyon modeli kullanılmıştır. Ayarlama yapılan faktörler: Maternal Parite, Maternal Yaş, Hamilelik Sürecinde Sigara İçimi, Hane Geliri, Annenin Eğitim Süresi, Yenidoğanın Doğum Yılı	Babanın yaşı ve ırkı, maternal yaş, ırk, immun aracılı inflamatuar hastalık varlığı ve multiple gestasyon	Baba yaşı, maternal yaş, maternal parite, ilk trimesterde maternal sigara içimi	Çalışmada DMARD**** için karıştırıcı faktör ayarlaması yapılsa da metotreksat spesifiğinde ayarlama yapılmamıştır.	Lojistik regresyon modeli kullanılmıştır. Ayarlama yapılan faktörler: Maternal yaş, parite sayısı, maternal sigara içimi, bebek cinsiyeti
Meta-analize ilişkin sonuçlar	**Majör konjenital malformasyon:** OR (%95 CI) 1.02 (0.16, 6.57) **Spontan abort:** kohort 15/113, kontrol 40/412	**Majör konjenital malformasyon:** OR (%95 CI) 0.93 (0.34,2.51) aOR (%95 CI) 1.01 (0.73,2.74) **Kalp defekti**: aOR (%95 CI) 2.79 (0.89, 8.78)	**Majör konjenital malformasyon:** **Model 1: aRR (%95 CI) 0.67 (0.21,1.55) ***Model 2: aRR (%95 CI) 0.29 (0.02,1.27) **Erken doğum:**	**Konjenital malformasyon:** aOR (%95 CI) 1.10 (0.57,2.13) **Erken doğum:** aOR (%95 CI) 1.38(0.68,2.81)	**Majör konjenital malformasyon:** kohort 2/49, kontrol 17869/596711 kohort 2/49, inflamatuar eklem hastalıklı kontrol 4/230	**Konjenital malformasyon:** Maruziyet grubu-1, kontrol grubu-1: aOR (%95 CI) 0.85 (0.34,2.10) Maruziyet grubu-2, kontrol grubu-2: aOR (%95 CI) 1.12 (0.87,1.43)

	Elektif terminasyon: kohort 11/113, kontrol 21/412 **Ölü doğum:** kohort 0/113, kontrol 3/412 **Canlı doğum:** kohort 87/113, kontrol 349/412 **Erken doğum:** kohort 8/87, kontrol 54/358	**Ölü doğum:** kohort 0/127, kontrol 2541/852090 **Erken doğum:** aOR (%95 CI) 1.31 (0.66, 2.59)	**Model 1: aRR (%95 CI) 0.49 (0.2,0.98) ***Model 2: aRR (%95 CI) 0.32(0.05,0.99) **Düşük doğum ağırlığı:** **Model 1: aRR (%95 CI) 0.68(0.25,1.46) ***Model 2: aRR (%95 CI) 0.59 (0.10, 1.89)	**Gestasyonel Yaşa göre Küçük Doğum:** aOR (%95 CI) 0.98 (0.39,2.50)		**Erken doğum:** Maruziyet grubu-1, kontrol grubu-1: aOR (%95 CI) 1.13 (0.41,3.10) Maruziyet grubu-2, kontrol grubu-2: aOR (%95 CI) 1.02 (0.74, 1.42) **Düşük doğum ağırlığı:** Maruziyet grubu-1, kontrol grubu-1: aOR (%95 CI) 0.43 (0.11,1.77) Maruziyet grubu-2, kontrol grubu-2: aOR (%95 CI) 0.86 (0.62, 1.19)
Newcastle-Ottawa Skalası	****/**/*** **9**	****/**/*** **9**	****/**/*-* **8**	****/**/*** **9**	****/–/*** **7**	****/**/*** **9**

			(3 ay follow-up süresi ile eksik yıldız almıştır.)		(Karıştırıcı faktörler nedeni ile eksik yıldız almıştır.)	
ROBINS-I aracı (Genel yanlılık değerlendirmesi)	Düşük	Düşük	Düşük	Düşük	Orta	Düşük

*Kantitatif analize uygun olmayan, sadece kalitatif olarak değerlendirilen diğer kohortların detayları tablo 11 de verilmiştir.

** Model 1 ile "Babanın yaşı ve ırkı" karıştırıcı faktörleri ayarlanmıştır.

*** Model 2 ile "Babanın yaşı ve ırkı, Anne yaşı, ırkı, multiple gestasyon ve immun aracılı inflamatuar hastalık varlığı" karıştırıcı faktörleri ayarlanmıştır.

**** DMARD: hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaçlar

4.2 Kalitatif Derleme

Araştırma için yaptığımız literatür taramasında paternal metotreksat maruziyeti sonrası gebelik sonuçlarını içeren 7 vaka raporu, 4 vaka serisi, 10 kohort çalışması tespit edilmiştir (4,5,7,12,48–50,53–66).

7 vaka raporunda toplam 9 sağlıklı infant ve 1 spontan abortus bildirilmiştir (n:10). 4 vaka serisinde toplam 114 maruziyet bulunmaktadır. 114 maruziyet arasında 6 vakada elektif terminasyon, 3 vakada spontan abortus, 4 vakada doğum defekti bildirilmiştir. Vaka raporu ve vaka serilerinin detayları tablo 10'da verilmiştir. Tekrar eden bir malformasyon paterni gözlenmemiştir.

Tablo 10. Kalitatif olarak değerlendirilen vaka raporu ve vaka serileri

Yazar, Çalışma Yılı	**Çalışma Dizaynı**	**Maruziyet Sayısı**	**Sonuç ve Yorumlar**
Frank1968 (53)	Vaka raporu	n:2	Psöriasis tedavisi amacıyla metotreksat alan 2 erkek hasta mevcut. 2 sağlıklı infant ile sonuçlanmıştır.
Kroner1977 (54)	Vaka raporu	n:2	Akut lenfoblastik lösemi hastası 2 erkek. 1 sağlıklı infant, 1 spontan abort ile sonuçlanmıştır.
Matthews1980 (55)	Vaka raporu	n:1	Akut lösemi hastası erkek. 1 sağlıklı infant ile sonuçlanmıştır.
Perry1983 (56)	Vaka raporu	n:1	Reiter sendromu hastası 1 erkek. 1 sağlıklı infant ile sonuçlanmıştır.
Griggs2006 (57)	Vaka raporu	n:1	Crohn hastası erkek. 1 sağlıklı infant ile sonuçlanmıştır.
Østensen2007 (58)	Vaka serisi	n:11	Romatolojik hastalıkları bulunan 11 erkek hasta. 9 canlı doğum, 1 elektif terminasyon, 1 sonuç bilinmemektedir. 2 bebekte doğum defekti bulunmaktadır. (El atrofisi ve kulak

			altında küçük bir fistül, diğerinde ayak parmak anomalisi)
Hoeltzenbein2008 (59)	Vaka serisi	n:58	Bir vakada trizomi 16 tespit edilmiştir. Prenatal tanı sonrası elektif termine edilmiştir.
Lamboglia2009 (60)	Vaka raporu	n:1	Crohn hastası erkek. 1 sağlıklı infant ile sonuçlanmıştır.
Paschou2009 (61)	Vaka raporu	n:2	Ankilozan spondilit hastası 2 erkek. 2 sağlıklı infant ile sonuçlanmıştır.
Beghin2011 (7)	Vaka serisi	n:42	3 spontan abortus, 3 elektif terminasyon, 1 preterm doğum ile sonuçlanmıştır. Konjenital malformasyon bildirilmemiştir.
Saougou2013 (62)	Vaka serisi	n:3	2 sağlıklı infant ve hidrosefali nedeni ile 1 elektif terminasyon bildirilmiştir.

Paternal metotreksat maruziyeti sonrası gebelik sonuçlarını içeren 10 kohort çalışma elde edilmiştir. Bunlardan 6 tanesi dahil edilme kriterlerini karşılamakta idi. Dahil edilme kriterlerini karşılamayan 4 kohortun metotreksat maruziyetine ilişkin verileri tablo 11 de verilmiştir. Dahil edilme kriterlerini karşılayan 6 kohortun detaylar ise tablo 9 da verilmiştir. Çalışmalarda tekrar eden, sinyal oluşturan bir malformasyon paterni gözlenmemiştir ve paternal metotreksat maruziyeti ile konjenital malformasyon risk artışı ilişkilendirilmemiştir.

Tablo 11. Kalitatif olarak değerlendirilen kohort çalışmaları*

Yazar, Çalışma Yılı	**Çalışma Dizaynı**	**Maruziyet Sayısı**	**Sonuç ve Yorumlar**
Lee2010 (63)	Retrospektif kohort	n:7	7 canlı doğum bildirilmiş, malformasyon ise bildirilmemiştir.
Viktil2012 (64)	Retrospektif kohort	n:50	50 canlı doğum ve 2 çocukta orofasial malformasyon bildirilmiştir.
Friedman2017 (65)	Kohort	n:209	Konsepsiyon öncesi paternal metotreksat naruziyeti ile maligniteler, otizm, şizofreni ve

			dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu arasında ilişki kurulmamıştır. 209 çocuk arasında 15 erken doğum bildirilmiştir.
Drechsel2020 (66)	Prospektif kohort	n:9	Konsepsiyon dönemi paternal metotreksat maruziyeti olan 9 bebek bildirilmiştir. Konsepsiyon dönemi babası metotreksat, sertolizumab ve prednizon tedavisi alan bir bebekte korpus kallosum agenezisi bildirilmiştir.

*Kantitatif analiz için değerlendirilen, dahil edilme kriterlerini karşılayan kohortların karakteristikleri tablo 9 da verilmiştir.

5. TARTIŞMA

Bu meta-analizde paternal metotreksat maruziyeti ile major konjenital malformasyon ve diğer advers gebelik sonuçları arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Diğer advers gebelik sonuçları için çıktı olarak kardiyak malformasyonlar, spontan abortus, canlı doğum, elektif terminasyon, ölü doğum ve erken doğum olarak belirlenmiştir. Ancak dahil edilme kriterlerini karşılayan çalışmalardan çekilebilen veriler major konjenital malformasyon, erken doğum ve ölüm doğum çıktılarının kantitatif analizine izin vermiştir. Kaliteli bir meta-analizde havuzlanması uygun çalışma türleri ve verilerin farkında olunması sağlıklı sonuçlar için son derece önemlidir.

Ham veriler ile yapılan iki major konjenital malformasyon analizinde paternal metotreksat maruziyeti ile risk artışı bulunmamıştır (OR 1.15; [%95CI 0.52, 2.58]) (I^2=%0, P=0.64), (OR 1.05; [%95CI 0.49, 2.26]) (I^2=%0, P=0.90) (Şekil 3 ve 4). Wallenius ve ark. çalışmasından inflamatuar eklem hastalığı bulunup paternal metotreksat maruziyeti bulunmayan hastalar kontrol grubu olarak alınarak ilk analiz, yine Wallenius ve ark. çalışmasından paternal metotreksat maruziyeti bulunmayanlar kontrol grubu alınarak diğer analiz gerçekleştirilmiştir. Mümkün olduğunca alternatif analizler yapılarak daha doğru sonuçlara erişilmesi amaçlanmıştır.

Kafa karıştırıcı faktörlerin göz önüne alındığı aOR'ler ile yapılan major konjenital malformasyon ana analizinde paternal metotreksat maruziyeti ile risk artışı bulunmamıştır (OR 0.97; [%95CI 0.56, 1.68]) (I^2=%0, P=0.67) (Şekil 5).

Duyarlılık analizi, analizde ağırlığı yüksek olan ve aralarında duplikasyon bulunan Eck ve ark. çalışması ile Winter ve ark. çalışması değiştirilerek yapılmıştır. Yine paternal metotreksat maruziyeti ile konjenital malformasyonlar için risk artışı bulunmamıştır (OR 1.03; [%95CI 0.59, 1.78]) (I^2=%0, P=0.65) (Şekil 6).

Ham veriler ile yapılan analize göre paternal metotreksat maruziyeti ile ölü doğum riskinde anlamlı bir artış önerilmemiştir (OR 0.85; [%95CI 0.11, 6.45]) (I^2=%0, P=0.65) (Şekil 7).

Ham veriler ile yapılan bir diğer analize göre paternal metotreksat maruziyeti ile erken doğum riskinde anlamlı bir artış önerilmemiştir (OR 0.87; [%95CI 0.42,

1.82]) (I^2=%58, P=0.12) (Şekil 8). I^2=%58 ile analizde orta düzey bir heterojenite saptanmıştır ve bu durum göz önünde bulundurulmalıdır. Winter ve ark. çalışmasından sağlanan aOR ile kafa karıştırıcı faktörlerin üstesinden gelmeye yönelik ikincil bir analiz yapılmıştır (5). Yine bu analiz ile paternal metotreksat maruziyeti ile erken doğum riskinde anlamlı bir artış önerilmemiştir (OR 0.90; [%95CI 0.38, 2.14]) (I^2=%63, P=0.10) (Şekil 9). I^2=%63 ile analizde orta düzey bir heterojenite de saptanmıştır.

Meta-analiz çıktılarının kanıt kesinliği GRADE aracı ile değerlendirilmiş olup detaylar Ek-5 ve Ek-6 da verilmiştir. Kanıtların kesinlik düzeyi medikal tedavilerin yönetimi ve paternal maruziyet sonrası izlenecek yol haritası açısından faydalı olacaktır. Konjenital malformasyon için yapılan ham veri analizlerinin her ikisi için kanıt kesinliği düşük düzey, konjenital malformasyon için aOR'ler ile yapılan ana analiz ve duyarlılık analizinin kanıt kesinliği ise orta düzey olarak değerlendirilmiştir. Ölü doğum ham veri analizinin kanıt kesinliği düşük olarak değerlendirilmiştir. Erken doğum analizinin ham veriler ile yapılan ve aOR'ler ile yapılan analizleri için kanıt kesinliği çok düşük düzey olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar yorumlanırken bu noktaların okuyucu tarafından göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Metotreksatın paternal maruziyeti ile ilgili bir takım endişeler bulunmaktadır (3). Bu duruma katkısı olan çeşitli faktörler bulunmaktadır. Bunlardan ilki metotreksatın maternal maruziyeti ile meydana gelen teratojenik etkileridir (28). Antimetabolit grubunun prototipi aminopterinin teratojenik etkileri 1950'li yıllarda, metotreksatın ise 1960 lı yıllarda tanımlanmaya başlamıştır. Yıllar içinde biriken veriler ile fetal metotreksat sendromu tanımlanmıştır (28). Sitotoksik bir ajan olan metotreksata dair bir diğer endişe verici faktör metotreksatın reprodüktif sistem üzerine etkileridir. Maruziyeti ile seksüel disfonksiyon gelişen vaka raporları ve oligospermi/azospermi bildirilen vakalar bulunmaktadır (31). Bununla birlikte metotreksatın fertiliteyi etkileme ihtimalinin bebek planlayan kronik hastalıklara sahip kişilerin tedavisinde zorluklara neden olduğu da ifade edilmiştir (3). Tetrahidrafolat oluşumunu engelleyen metotreksat, DNA'da bozulmalara yol açabilmektedir (28). Potansiyel getotoksik etkisi endişelere yol açan bir başka özelliğidir (7).

Bizim bilgimize göre literatürde paternal metotreksat maruziyetini araştıran bir meta-analiz bulunmamaktadır. Meta-analizin sonuçları paternal metotreksat maruziyeti ile major konjenital malformasyon riski artışı bulunmadığını önermiştir. Ek olarak, kalitatif değerlendirmede mevcut vaka raporları, vaka serileri ve kohortlar göz önüne alındığında tekrar eden bir malformasyon paterni gözlenmemiştir (Tablo 10 ve 11). Metotreksatın maternal maruziyeti ile geçmişten günümüze biriken literatür ile fetal metotreksat sendromu tanımlanmış olup paternal maruziyetine dair mevcut verilerde bu sendromu işaret eden bir sinyalin görünmemesi olumlu olarak yorumlanmıştır. 2019 yılında yayınlanan hastalık modifiye edici antiromatizmal ajanların paternal maruziyeti sonrası fertilite ve gebelik sonuçlarını inceleyen bir sistematik derlemede düşük doz metotreksatın paternal kullanım ile uyumlu olabileceğine dair verilerin biriktiği işaret edilmiştir (67). 2014 yılında yayınlanan ve Almanya'da gerçekleştirilen prospektif bir kohort çalışmasında düşük doz paternal metotreksat maruziyeti ile advers gebelik sonuçlarında bir artış bildirilmemiş ve konsepsiyon öncesi üç aylık metotreksat maruziyetsiz aralığın gerekliliğinin sorgulanması önerilmiştir (4). Yine 2021 yılında yayınlanan ve ABD'de gerçekleştirilen retrospektif bir kohort çalışmasında, metotreksatı da içeren immunsupresif ve biyolojik ajanlara paternal maruziyetin advers neonatal sonuçları artırmadığı bildirilmiştir (12). 2017 yılında yayınlanan ve Danimarka'da gerçekleştirilen üç kohort çalışma da benzer şekilde paternal metotreksat maruziyeti sonrası advers gebelik sonuçlarında risk artışı önermemiştir (5,48,50). 2015 yılında yayınlanan ve Norveç'te gerçekleştirilen kohort çalışması da diğer kontrollü gözlemsel çalışmalar ile uyumlu ve paternal metotreksat maruziyeti ile risk artışı bildirmemiştir (49). Çalışmanın bulguları daha önceki yayınlar ile uyumlu ve destekler niteliktedir.

Bu çalışmanın bulguları; paternal metotreksat maruziyetinin elektif terminasyon endikasyonu olmadığı şeklinde yorumlanmıştır ve metotreksat kullanmakta olup bebek planlayan erkeklerin medikal yönetimi için değerli veriler sunmaktadır. Literatürde, bu meta-analiz sonuçlarına paralel olarak, sitotoksik ve mutajenik ilaçlara paternal maruziyet sonrası primer kromozom analizi gerekliliğini veya elektif terminasyonu savunacak bir veri olmadığı ifade edilmiştir (68). Bu tarz bir tedavi konsepsiyon öncesi planlandığında iki spermatogenik siklus (yaklaşık 6 ay) beklenmesi teorik olarak önerilmiştir (68). Bununla birlikte daha net ve kesin

sonuçlara ulaşmak için katılımcı sayısı yüksek, standartize daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

İlaçlara paternal maruziyet sonrası gebelik sonuçları ihmal edilen bir konudur ve literatürde ciddi eksiklik vardır (12). Çalışma bu konuda farkındalığın artması açısından da bir öneme sahiptir.

5.1 Meta-analizin güçlü yanları

Meta-analizin kalitesini oluşturan en temel nokta dahil edilen çalışmaların kalitesidir. Meta-analize dahil edilen çalışmalar için Wallenius ve ark. çalışmasının NOS skoru 7 olup diğer çalışmaların skorları 8 ve 9'dur (49). Dolayısı ile yüksek kaliteli bir meta-analiz gerçekleştirilmiştir. Yine çalışmada yanlılık riski ROBINS-I aracı ile değerlendirilmiştir ve Wallenius ve ark. çalışması için orta, diğer dahil edilen çalışmalar için düşük yanlılık riski ortaya konmuştur (EK-4). Ayrıntılar Tablo 9'da verilmiştir.

Ham veriler ile yapılan ve kafa karıştıcı faktörler için ayarlama yapılmayan analizler hatalı sonuçlar ortaya koyabilirler. Meta-analizde mümkün olduğunca çalışmalardan çekilebilen kafa karıştırıcı faktörlerin ayarlandığı aOR'ler ile analizler yapılmıştır. Her bir çalışma için ayarlama yapılan karıştırıcı faktörler ve aOR'ler Tablo 9'da verilmiştir.

5.2 Meta-analizin kısıtlılıkları

Çalışmada dikkat çekilmesi gereken bazı kısıtlılıklar bulunmaktadır. Ana analizler ve duyarlılık analizi de dahil olmak üzere konjenital malformasyon analizlerinde, Eck ve ark. ve Winter ve ark. çalışmaları yüksek ağırlığa sahipti (5,48). Ancak her iki çalışmanın da NOS kalite skoru 9 ve yanlılık riski düşük olarak değerlendirilmiştir.

Bir diğer kısıtlılık, Weber ve ark. ile Wallenius ve ark. çalışmalarında düşük doz metotreksat maruziyeti (sırasıyla ≤30 mg/hafta ve 12.5-20 mg/hafta) bildirilirken diğer çalışmalarda doz spesifik olarak belirtilmemişti (4,49).

Yine bir diğer kısıtlılık konjenital malformasyon klasifikasyonu dolayısı ile tespit edilmiştir. Weber ve ark., Merks ve ark. ile Rasmussen ve ark. çalışmalarını baz

alarak klasifikasyon yapmış iken diğer çalışmalarda EUROCAT ve ICD kodları kullanılmıştır (4,51,52).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu meta-analizden elde edilen bulgular ile paternal metotreksat maruziyeti ile major konjenital malformasyon, ölü doğum ve erken doğum riskinde bir risk artış gözlenmemiştir. Daha net sonuçlara varabilmek için standardize, katılımcı sayısı yüksek, kontrollü gözlemsel çalışmalara ihtiyaç vardır.

Meta-analizlerin var olan veriyi harmanlayıp kanıt düzeyini artırmasından başka gelecek çalışmalara ışık tutması açısından da kritik önemi vardır. Paternal metotreksat maruziyeti konusunda standardize, belli başlı noktalara dikkat edilen çalışmalara ihtiyaç vardır. Bunlardan bahsetmek gerekirse;

- Standardize malformasyon sınıflandırması kullanılması,
- Endikasyon ve dozların net olarak verilmesi,
- Maternal ve paternal karakteristiklerin beraber, ayrıntılı ortaya konması,
- Karıştırıcı faktörler açısından mümkün olduğunca ayarlanmış OR,RR verilmesi,
- İlgili çıktıya yönelik yeterli takip periyodunun bulunması şeklinde tavsiyeler özetlenebilir.

7. ÖZET

PATERNAL METOTREKSAT MARUZİYETİ SONRASI GEBELİK SONUÇLARI: SİSTEMATİK DERLEME VE META-ANALİZ

TÜRKÇE ÖZET

Bu çalışmanın amacı, paternal metotreksat maruziyeti sonrası major konjenital malformasyon ve diğer advers gebelik sonuçları arasında bir ilişki olup olmadığını literatürün sistematik incelenmesi ve meta-analiz ile ortaya koymaktır.

PubMed, Web of Science ve Reprotox veritabanları Nisan 2022 tarihine kadar ilgili arama terimleri kullanılarak taranmıştır. Dahil edilme kriterlerini sağlayan kohort ve vaka-kontrol çalışmalarının analizi yapılmıştır.

Dört kohort çalışmanın analizinde paternal metotreksat maruziyeti sonrası major konjenital malformasyon riskinde anlamlı bir artış gözlenmedi (OR 0.97; [%95CI 0.56, 1.68]) (I2=%0, P=0.67). Ham veriler ile yapılan ölü doğum analizinde, paternal metotreksat maruziyeti sonrası ölü doğum riskinde anlamlı bir artış gözlenmedi (OR 0.85; [%95CI 0.11, 6.45]) (I2=%0, P=0.65). Yine paternal metotreksat maruziyeti sonrası erken doğum riskinde de anlamlı bir artış gözlenmedi (OR 0.90; [%95CI 0.38, 2.14]) (I2=%63, P=0.10). Ancak I2=%63 ile analizde orta düzey bir heterojenite saptandı.

Bu meta-analizden elde edilen bulgulara göre paternal metotreksat maruziyeti ile major konjenital malformasyon, ölü doğum ve erken doğum riskinde anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Kalitatif değerlendirmede mevcut vaka raporları, vaka serileri ve kohortlar göz önüne alındığında tekrar eden bir malformasyon paterni de gözlenmemiştir. Paternal metotreksat maruziyetinin elektif terminasyon endikasyonu olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. Daha net sonuçlara varabilmek için standardize, katılımcı sayısı yüksek, kontrollü gözlemsel çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Metotreksat, meta-analiz, paternal maruziyet, gebelik

PREGNANCY OUTCOMES FOLLOWING PATERNAL METHOTREXATE EXPOSURE: SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS

SUMMARY

This study aimed to reveal whether there is an association between major congenital malformations and other adverse pregnancy outcomes after paternal methotrexate exposure by a systematic review of the literature and meta-analysis.

PubMed, Web of Science, and Reprotox databases were searched using the relevant search terms until April 2022. Cohort and case-control studies were included.

No significant increase in the risk of major congenital malformations was observed after paternal methotrexate exposure in the analysis of the four cohort studies (OR 0.97; [95%CI 0.56, 1.68]) (I^2=0%, P=0.67). In the analysis of stillbirth with raw data, no significant increase in the risk of stillbirth was observed after paternal methotrexate exposure (OR 0.85; [95%CI 0.11, 6.45]) (I^2=%0, P=0.65). In addition, no significant increase was observed in the risk of preterm birth after paternal methotrexate exposure (OR 0.90; [95%CI 0.38, 2.14]) (I^2=63%, P=0.10). However, there was moderate heterogeneity in this analysis, with I^2=63%.

According to the findings from this meta-analysis, no significant increase in the risk of major congenital malformation, stillbirth and preterm birth was observed with paternal methotrexate exposure. A repetitive malformation pattern was also not observed in the qualitative assessment, considering the available case reports, case series, and cohorts. It has been interpreted that paternal methotrexate exposure is not an indication for elective termination. In order to reach clearer results, standardized, controlled observational studies with a high number of participants are needed.

Keywords: Methotrexate, meta-analysis, paternal exposure, pregnancy

8. KAYNAKLAR

1. ÇELİKER A, GÖÇER M. Türkiye'de ve Dünyada Teratojenite Bilgi Servislerinin Çalışma Koşulları ve Sağladıkları Hizmetler. Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy. 2021;41(2):102–16.

2. Mazzu-Nascimento T, Melo DG, Morbioli GG, Carrilho E, Vianna FSL, Silva AA da, et al. Teratogens: a public health issue - a Brazilian overview. Genet Mol Biol. 2017 May;40(2):387–97.

3. Bermas BL. Paternal safety of anti-rheumatic medications. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol [Internet]. 2020;64:77–84. Available from: https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2019.09.004

4. Weber-schoendorfer C, Hoeltzenbein M, Wacker E, Meister R, Schaefer C. No evidence for an increased risk of adverse pregnancy outcome after paternal low-dose methotrexate: An observational cohort study. Rheumatology (United Kingdom). 2014;53(4):757–63.

5. Winter RW, Larsen MD, Magnussen B, Friedman S, Kammerlander H, Nørgård BM. Birth outcomes after preconception paternal exposure to methotrexate: A nationwide cohort study. Reprod Toxicol. 2017 Dec;74:219–23.

6. Hyoun SC, Običan SG, Scialli AR. Teratogen update: Methotrexate. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2012;94(4):187–207.

7. Beghin D, Cournot MP, Vauzelle C, Elefant E. Paternal exposure to methotrexate and pregnancy outcomes. J Rheumatol. 2011 Apr;38(4):628–32.

8. Visser K, Katchamart W, Loza E, Martinez-Lopez JA, Salliot C, Trudeau J, et al. Multinational evidence-based recommendations for the use of methotrexate in rheumatic disorders with a focus on rheumatoid arthritis: integrating systematic literature research and expert opinion of a broad international panel of rheumatologists in the 3. Ann Rheum Dis. 2009 Jul;68(7):1086–93.

9. Apraş Bilgen Ş, Kılıç L, Erden A, Aşlar Z, Bes C, Karabulut G, et al. The recommendations of Turkish Society for Rheumatology for pregnancy management in rheumatic diseases and the use of antirheumatic drugs during pregnancy. Ulusal Romatoloji Dergisi. 2019;11(2):91–104.

10. Hill MA. File:Human-critical periods of development.jpg - Embryology [Internet]. [cited 2022 Apr 4]. Available from: https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/File:Human-critical_periods_of_development.jpg

11. Kumar P, Das A, Lal NR, Jain S, Ghosh A. Safety of important dermatological drugs (retinoids, immune suppressants, anti androgens and thalidomide) in reproductively active males with respect to pregnancy outcome: A brief review of literature. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2018;84(5):539–46.

12. Meserve J, Luo J, Zhu W, Veeravalli N, Bandoli G, Chambers CD, et al. Paternal Exposure to Immunosuppressive and/or Biologic Agents and Birth Outcomes in Patients With Immune-Mediated Inflammatory Diseases. Gastroenterology [Internet]. 2021;161(1):107-115.e3. Available from: https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.03.020

13. Colie CF. • Reproductive Toxicology Review MALE MEDIATED TERATOGENESIS. Vol. 7, Reproductive Toxicology. 1993.

14. Yazigi RA, Odem RR, Polakoski KL. Demonstration of specific binding of cocaine to human spermatozoa. JAMA. 1991 Oct;266(14):1956–9.

15. Benziger DP, Edelson J. Absorption from the vagina. Drug Metab Rev. 1983;14(2):137–68.

16. Gray TJ, Beamand JA. Effect of some phthalate esters and other testicular toxins on primary cultures of testicular cells. Food Chem Toxicol. 1984 Feb;22(2):123–31.

17. Schull WJ, Otake M, Neel J v. Genetic effects of the atomic bombs: a reappraisal. Science (1979). 1981 Sep;213(4513):1220–7.

18. Aitken RJ, Sawyer D. The human spermatozoon–not waving but drowning. Adv Exp Med Biol. 2003;518:85–98.

19. Hennekam RC, Biesecker LG, Allanson JE, Hall JG, Opitz JM, Temple IK, et al. Elements of morphology: General terms for congenital anomalies. Am J Med Genet A. 2013;161(11):2726–33.

20. Maksimovic V, Pavlovic-Popovic Z, Vukmirovic S, Cvejic J, Mooranian A, Al-Salami H, et al. Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate. Mol Biol Rep. 2020;47(6):4699–708.

21. Inoue K, Yuasa H. Molecular basis for pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in rheumatoid arthritis therapy. Drug Metab Pharmacokinet. 2014;29(1):12–9.

22. Morgacheva O, Furst DE. Use of MTX in the elderly and in patients with compromised renal function. Clin Exp Rheumatol. 2010;28(5 Suppl 61):S85-94.

23. Allegra CJ, Drake JC, Jolivet J, Chabner BA. Inhibition of phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide transformylase by methotrexate and dihydrofolic acid polyglutamates. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Aug;82(15):4881–5.

24. Par Pharmaceutical(per FDA). Methotrexate Tablets. 2020;4–5.

25. Methotrexate. In: In Depth Answers [Internet]. Greenwood Village (CO): IBM Corporation. 2022 [cited 2022 Apr 12]. Available from: www.micromedexsolutions.com

26. Sentürk N. Metotreksat. Turkderm Deri Hastaliklari ve Frengi Arsivi. 2016;50(Suppl 1):18–21.

27. Grannell L. Stockley's Drug Interactions. 11th ed. Vol. 39, Australian Prescriber. 2016. p. 179.

28. Verberne EA, de Haan E, van Tintelen JP, Lindhout D, van Haelst MM. Fetal methotrexate syndrome: A systematic review of case reports. Reproductive Toxicology [Internet]. 2019;87:125–39. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089062381930036X

29. of Research D, in Human Reproduction RT. Methotrexate for the termination of early pregnancy: a toxicology review. Reprod Health Matters [Internet]. 1997;5(9):162–7. Available from: https://doi.org/10.1016/S0968-8080(97)90020-3

30. Thiersch JB. Therapeutic abortions with a folic acid antagonist, 4-aminopteroylglutamic acid (4-amino P.G.A) administered by the oral route. Am J Obstet Gynecol. 1952 Jun;63(6):1298–304.

31. REPROTOX ® Website Copyright© 1994-2022 [Internet]. Available from: https://www.reprotox.org/member

32. Feldkamp M, Carey JC. Clinical teratology counseling and consultation case report: low dose methotrexate exposure in the early weeks of pregnancy. Teratology. 1993 Jun;47(6):533–9.

33. Weber-Schoendorfer C, Oppermann M, Wacker E, Bernard N, network of French pharmacovigilance centres, Beghin D, et al. Pregnancy outcome after TNF-α inhibitor therapy during the first trimester: a prospective multicentre cohort study. Br J Clin Pharmacol. 2015 May;80(4):727–39.

34. Blackburn Jr WD, Alarcón GS. Impotence in three rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate. Arthritis Rheum. 1989 Oct;32(10):1341–2.

35. Lasserson TJ, Thomas J HJ. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions version 6.3 (updated February 2022) [Internet]. Chapter 1: Starting a review. In: Higgins JPT, Thomas J, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page MJ, Welch VA (editors). [cited 2022 Apr 13]. Available from: http://www.training.cochrane.org/handbook

36. Deeks JJ, Higgins JPT AD (editors). Chapter 10: Analysing data and undertaking meta-analyses. [Internet]. In: Higgins JPT, Thomas J, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page MJ, Welch VA (editors). Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions version 6.3 (updated February 2022). Cochrane, 2022. [cited 2022 Apr 13]. Available from: http://www.training.cochrane.org/handbook

37. Moher D, Cook DJ, Eastwood S, Olkin I, Rennie D, Stroup DF. Improving the quality of reports of meta-analyses of randomised controlled trials: the QUOROM statement. Quality of Reporting of Meta-analyses. Lancet. 1999 Nov;354(9193):1896–900.

38. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. BMJ. 2021 Mar;372:n71.

39. Thomas J, Kneale D, McKenzie JE, Brennan SE BS. Chapter 2: Determining the scope of the review and the questions it will address. In: Higgins JPT, Thomas J, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page MJ, Welch VA (editors). [Internet]. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions version 6.3 (updated February 2022). Cochrane, 2022. [cited 2022 Apr 18]. Available from: http://www.training.cochrane.org/handbook

40. Lefebvre C, Glanville J, Briscoe S, Featherstone R, LittLefebvre C, Glanville J, Briscoe S, Featherstone R, Littlewood A, Marshall C, Metzendorf M-I, Noel-Storr A, Paynter R, Rader T, Thomas J, Wieland LS.lewood A, Marshall C, Metzendorf M-I, Noel-Storr A WLS. Chapter 4: Searching for and selecting studies. In: Higgins JPT, Thomas J, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page MJ, Welch VA (editors) [Internet]. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions version 6.3 (updated February 2022). Cochrane, 2022. [cited 2022 Apr 19]. Available from: https://training.cochrane.org/handbook

41. Li T, Higgins JPT DJ (editors). Chapter 5: Collecting data. In: Higgins JPT, Thomas J, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page MJ, Welch VA (editors). [Internet]. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions version 6.3 (updated February 2022). Cochrane, 2022. [cited 2022 Apr 21]. Available from: http://www.training.cochrane.org/handbook

42. Boutron I, Page MJ, Higgins JPT, Altman DG, Lundh A HA. Chapter 7: Considering bias and conflicts of interest among the included studies. In: Higgins JPT, Thomas J, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page MJ, Welch VA (editors). [Internet]. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions version 6.3 (updated February 2022). Cochrane, 2022. [cited 2022 Apr 21]. Available from: www.training.cochrane.org/handbook

43. Cummings P. The relative merits of risk ratios and odds ratios. Arch Pediatr Adolesc Med. 2009 May;163(5):438–45.

44. McKenzie JE, Beller EM, Forbes AB. Introduction to systematic reviews and meta-analysis. Respirology. 2016 May;21(4):626–37.

45. Borenstein M, Hedges L V, Higgins JPT, Rothstein HR. A basic introduction to fixed-effect and random-effects models for meta-analysis. Res Synth Methods. 2010 Apr;1(2):97–111.

46. Higgins JPT, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analyses Testing for heterogeneity.

47. Moher D, Ghersi D, Dooley G, Stewart L, Clarke M, Macleod M. PROSPERO: International prospective register of systematic reviews. [Internet]. [cited 2022 May 20]. Available from: https://www.crd.york.ac.uk/prospero/#aboutpage

48. Eck LK, Jensen TB, Mastrogiannis D, Torp-Pedersen A, Askaa B, Nielsen TK, et al. Risk of Adverse Pregnancy Outcome After Paternal Exposure to Methotrexate Within 90 Days Before Pregnancy. Obstetrics and gynecology. 2017 Apr;129(4):707–14.

49. Wallenius M, Lie E, Daltveit AK, Salvesen KÅ, Skomsvoll JF, Kalstad S, et al. No excess risks in offspring with paternal preconception exposure to disease-modifying antirheumatic drugs. Arthritis Rheumatol. 2015 Jan;67(1):296–301.

50. Egeberg A, Gislason GH, Nast A. Birth Outcomes in Children Fathered by Men Treated with Immunosuppressant Drugs before Conception—A Danish Population-Based Cohort Study. Journal of Investigative Dermatology. 2017;137(8):1790–2.

51. Merks JHM, van Karnebeek CDM, Caron HN, Hennekam RCM. Phenotypic Abnormalities: Terminology and Classification. Am J Med Genet. 2003 Dec 15;123 A(3):211–30.

52. Rasmussen SA, Olney RS, Holmes LB, Lin AE, Keppler-Noreuil KM, Moore CA. Guidelines for case classification for the National Birth Defects Prevention Study. Vol. 67, Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology. 2003. p. 193–201.

53. L Frank HLLBPP. Experiences with methotrexate in psoriasis. Dermatologica . 1968;137(2):87–96.

54. Kroner TH, Tachumi A. Conception of normal child during chemotherapy of acute lymphoblastic leukaemia in the father. Br Med J [Internet]. 1977 May 21;1(6072):1322–3. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/266414

55. Matthews JH, Wood JK. Male fertility during chemotherapy for acute leukemia. N Engl J Med [Internet]. 1980;303(21):1235. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7421954

56. Perry WH. Methotrexate and teratogenesis. Arch Dermatol [Internet]. 1983;119(11):874–5. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6639107

57. Griggs LR, Schwartz DA. Successful paternity of a healthy child while taking methotrexate for Crohn's disease. Am J Gastroenterol [Internet]. 2006;101(12):2893–4. Available from: http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00867_13.x

58. Østensen M, von Esebeck M, Villiger PM, Østensen M, Esebeck ; M von, Villiger ; P M. Therapy with Immunosuppressive Drugs and Biological Agents and Use of Contraception in Patients with Rheumatic Disease [Internet]. Vol. 34, The Journal of Rheumatology. 2007. Available from: www.jrheum.org

59. Hoeltzenbein M, Weber-Schoendorfer C, Stackelberg L, Schaefer C. Paternal exposure to drugs—Is there an increased risk for congenital abnormalities?: Experience of the Berlin Institute for Clinical Teratology and Drug Risk Assessment during Pregnancy. Reproductive Toxicology - REPROD TOXICOL. 2008 Sep 1;26:64.

60. Lamboglia F, D'Incà R, Oliva L, Bertomoro P, Sturniolo GC. Patient with severe Crohn's disease became a father while on methotrexate and infliximab therapy. Inflamm Bowel Dis [Internet]. 2009;15(5):648–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1002/ibd.20722

61. Paschou S, Voulgari P v, Vrabie IG, Saougou IG, Drosos AA. Fertility and reproduction in male patients with ankylosing spondylitis treated with infliximab. J Rheumatol [Internet]. 2009;36(2):351–4. Available from: http://dx.doi.org/10.3899/jrheum.080554

62. Saougou I, Markatseli TE, Papagoras C, Kaltsonoudis E, Voulgari P v, Drosos AA. Fertility in male patients with seronegative spondyloarthropathies treated with infliximab. Joint Bone Spine [Internet]. 2012;80(1):34–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2012.03.004

63. Lee CYW, Jin C, Mata AM, Tanaka T, Einarson A, Koren G. A pilot study of paternal drug exposure: the Motherisk experience. Reprod Toxicol [Internet]. 2010;29(3):353–60. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.01.008

64. Viktil KK, Engeland A, Furu K. Outcomes after anti-rheumatic drug use before and during pregnancy: a cohort study among 150,000 pregnant women and expectant fathers. Scand J Rheumatol [Internet]. 2012;41(3):196–201. Available from: http://dx.doi.org/10.3109/03009742.2011.626442

65. Friedman S, Larsen MD, Magnussen B, Jølving LR, de Silva P, Nørgård BM. Paternal use of azathioprine/6-mercaptopurine or methotrexate within 3 months before conception and long-term health outcomes in the offspring-A nationwide cohort study. Reprod Toxicol [Internet]. 2017;73:196–200. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.08.013

66. Drechsel P, Stüdemann K, Niewerth M, Horneff G, Fischer-Betz R, Seipelt E, et al. Pregnancy outcomes in DMARD-exposed patients with juvenile idiopathic arthritis-results from a JIA biologic registry. Rheumatology (United Kingdom). 2020 Mar 1;59(3):603–12.

67. Mouyis M, Flint JD, Giles IP. Safety of anti-rheumatic drugs in men trying to conceive: A systematic review and analysis of published evidence. Semin Arthritis Rheum. 2019 Apr 1;48(5):911–20.

68. Schaefer C, Peters P, Miller RK. Drugs during pregnancy and lactation: Treatment options and risk assessment: Third edition. Drugs During Pregnancy and Lactation: Treatment Options and Risk Assessment: Third Edition. 2014 Nov 26;1–892.

9. EKLER

EK-1. PRISMA 2020 Checklist Template

PRISMA 2020 Checklist

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
TITLE			
Title	1	Identify the report as a systematic review.	
ABSTRACT			
Abstract	2	See the PRISMA 2020 for Abstracts checklist.	
INTRODUCTION			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of existing knowledge.	
Objectives	4	Provide an explicit statement of the objective(s) or question(s) the review addresses.	
METHODS			
Eligibility criteria	5	Specify the inclusion and exclusion criteria for the review and how studies were grouped for the syntheses.	
Information sources	6	Specify all databases, registers, websites, organisations, reference lists and other sources searched or consulted to identify studies. Specify the date when each source was last searched or consulted.	
Search strategy	7	Present the full search strategies for all databases, registers and websites, including any filters and limits used.	
Selection process	8	Specify the methods used to decide whether a study met the inclusion criteria of the review, including how many reviewers screened each record and each report retrieved, whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	
Data collection process	9	Specify the methods used to collect data from reports, including how many reviewers collected data from each report, whether they worked independently, any processes for obtaining or confirming data from study investigators, and if applicable, details of automation tools used in the process.	
Data items	10a	List and define all outcomes for which data were sought. Specify whether all results that were compatible with each outcome domain in each study were sought (e.g. for all measures, time points, analyses), and if not, the methods used to decide which results to collect.	
	10b	List and define all other variables for which data were sought (e.g. participant and intervention characteristics, funding sources). Describe any assumptions made about any missing or unclear information.	
Study risk of bias assessment	11	Specify the methods used to assess risk of bias in the included studies, including details of the tool(s) used, how many reviewers assessed each study and whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	
Effect measures	12	Specify for each outcome the effect measure(s) (e.g. risk ratio, mean difference) used in the synthesis or presentation of results.	
Synthesis methods	13a	Describe the processes used to decide which studies were eligible for each synthesis (e.g. tabulating the study intervention characteristics and comparing against the planned groups for each synthesis (item #5)).	
	13b	Describe any methods required to prepare the data for presentation or synthesis, such as handling of missing summary statistics, or data conversions.	
	13c	Describe any methods used to tabulate or visually display results of individual studies and syntheses.	
	13d	Describe any methods used to synthesize results and provide a rationale for the choice(s). If meta-analysis was performed, describe the model(s), method(s) to identify the presence and extent of statistical heterogeneity, and software package(s) used.	
	13e	Describe any methods used to explore possible causes of heterogeneity among study results (e.g. subgroup analysis, meta-regression).	
	13f	Describe any sensitivity analyses conducted to assess robustness of the synthesized results.	
Reporting bias assessment	14	Describe any methods used to assess risk of bias due to missing results in a synthesis (arising from reporting biases).	
Certainty assessment	15	Describe any methods used to assess certainty (or confidence) in the body of evidence for an outcome.	

PRISMA 2020 Checklist

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
RESULTS			
Study selection	16a	Describe the results of the search and selection process, from the number of records identified in the search to the number of studies included in the review, ideally using a flow diagram.	
	16b	Cite studies that might appear to meet the inclusion criteria, but which were excluded, and explain why they were excluded.	
Study characteristics	17	Cite each included study and present its characteristics.	
Risk of bias in studies	18	Present assessments of risk of bias for each included study.	
Results of individual studies	19	For all outcomes, present, for each study: (a) summary statistics for each group (where appropriate) and (b) an effect estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval), ideally using structured tables or plots.	
Results of syntheses	20a	For each synthesis, briefly summarise the characteristics and risk of bias among contributing studies.	
	20b	Present results of all statistical syntheses conducted. If meta-analysis was done, present for each the summary estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval) and measures of statistical heterogeneity. If comparing groups, describe the direction of the effect.	
	20c	Present results of all investigations of possible causes of heterogeneity among study results.	
	20d	Present results of all sensitivity analyses conducted to assess the robustness of the synthesized results.	
Reporting biases	21	Present assessments of risk of bias due to missing results (arising from reporting biases) for each synthesis assessed.	
Certainty of evidence	22	Present assessments of certainty (or confidence) in the body of evidence for each outcome assessed.	
DISCUSSION			
Discussion	23a	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence.	
	23b	Discuss any limitations of the evidence included in the review.	
	23c	Discuss any limitations of the review processes used.	
	23d	Discuss implications of the results for practice, policy, and future research.	
OTHER INFORMATION			
Registration and protocol	24a	Provide registration information for the review, including register name and registration number, or state that the review was not registered.	
	24b	Indicate where the review protocol can be accessed, or state that a protocol was not prepared.	
	24c	Describe and explain any amendments to information provided at registration or in the protocol.	
Support	25	Describe sources of financial or non-financial support for the review, and the role of the funders or sponsors in the review.	
Competing interests	26	Declare any competing interests of review authors.	
Availability of data, code and other materials	27	Report which of the following are publicly available and where they can be found: template data collection forms; data extracted from included studies; data used for all analyses; analytic code; any other materials used in the review.	

From: Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. BMJ 2021;372:n71. doi: 10.1136/bmj.n71

For more information, visit: http://www.prisma-statement.org/

EK-2 ROBINS-I TOOL Template

The Risk Of Bias In Non-randomized Studies – of Interventions (ROBINS-I) assessment tool

(version for cohort-type studies)

Developed by: Jonathan AC Sterne, Miguel A Hernán, Barnaby C Reeves, Jelena Savović, Nancy D Berkman, Meera Viswanathan, David Henry, Douglas G Altman, Mohammed T Ansari, Isabelle Boutron, James Carpenter, An-Wen Chan, Rachel Churchill, Asbjørn Hróbjartsson, Jamie Kirkham, Peter Jüni, Yoon Loke, Terri Pigott, Craig Ramsay, Deborah Regidor, Hannah Rothstein, Lakhbir Sandhu, Pasqualina Santaguida, Holger J Schünemann, Beverly Shea, Ian Shrier, Peter Tugwell, Lucy Turner, Jeffrey C Valentine, Hugh Waddington, Elizabeth Waters, Penny Whiting and Julian PT Higgins

Version 1 August 2016

ROBINS-I tool (Stage I): At protocol stage

Specify the review question

Participants	
Experimental intervention	
Comparator	
Outcomes	

List the confounding domains relevant to all or most studies

List co-interventions that could be different between intervention groups and that could impact on outcomes

ROBINS-I tool (Stage II): For each study

Specify a target randomized trial specific to the study

Design	Individually randomized / Cluster randomized / Matched (e.g. cross-over)
Participants	
Experimental intervention	
Comparator	

Is your aim for this study…?

- ☐ to assess the effect of *assignment to* intervention
- ☐ to assess the effect of *starting and adhering to* intervention

Specify the outcome

Specify which outcome is being assessed for risk of bias (typically from among those earmarked for the Summary of Findings table). Specify whether this is a proposed benefit or harm of intervention.

Specify the numerical result being assessed

In case of multiple alternative analyses being presented, specify the numeric result (e.g. RR = 1.52 (95% CI 0.83 to 2.77) and/or a reference (e.g. to a table, figure or paragraph) that uniquely defines the result being assessed.

Preliminary consideration of confounders

Complete a row for each important confounding domain (i) listed in the review protocol; and (ii) relevant to the setting of this particular study, or which the study authors identified as potentially important.

"Important" confounding domains are those for which, in the context of this study, adjustment is expected to lead to a clinically important change in the estimated effect of the intervention. "Validity" refers to whether the confounding variable or variables fully measure the domain, while "reliability" refers to the precision of the measurement (more measurement error means less reliability).

(i) Confounding domains listed in the review protocol				
Confounding domain	Measured variable(s)	Is there evidence that controlling for this variable was unnecessary?*	Is the confounding domain measured validly and reliably by this variable (or these variables)?	OPTIONAL: Is failure to adjust for this variable (alone) expected to favour the experimental intervention or the comparator?
			Yes / No / No information	Favour experimental / Favour comparator / No information

(ii) Additional confounding domains relevant to the setting of this particular study, or which the study authors identified as important				
Confounding domain	Measured variable(s)	Is there evidence that controlling for this variable was unnecessary?*	Is the confounding domain measured validly and reliably by this variable (or these variables)?	OPTIONAL: Is failure to adjust for this variable (alone) expected to favour the experimental intervention or the comparator?
			Yes / No / No information	Favour experimental / Favour comparator / No information

* In the context of a particular study, variables can be demonstrated not to be confounders and so not included in the analysis: (a) if they are not predictive of the outcome; (b) if they are not predictive of intervention; or (c) because adjustment makes no or minimal difference to the estimated effect of the primary parameter. Note that "no statistically significant association" is not the same as "not predictive".

Preliminary consideration of co-interventions

Complete a row for each important co-intervention (i) listed in the review protocol; and (ii) relevant to the setting of this particular study, or which the study authors identified as important.

"Important" co-interventions are those for which, in the context of this study, adjustment is expected to lead to a clinically important change in the estimated effect of the intervention.

(i) Co-interventions listed in the review protocol		
Co-intervention	Is there evidence that controlling for this co-intervention was unnecessary (e.g. because it was not administered)?	Is presence of this co-intervention likely to favour outcomes in the experimental intervention or the comparator
		Favour experimental / Favour comparator / No information
		Favour experimental / Favour comparator / No information
		Favour experimental / Favour comparator / No information

(ii) Additional co-interventions relevant to the setting of this particular study, or which the study authors identified as important		
Co-intervention	Is there evidence that controlling for this co-intervention was unnecessary (e.g. because it was not administered)?	Is presence of this co-intervention likely to favour outcomes in the experimental intervention or the comparator
		Favour experimental / Favour comparator / No information
		Favour experimental / Favour comparator / No information
		Favour experimental / Favour comparator / No information

Risk of bias assessment (cohort-type studies)

Responses underlined in green are potential markers for low risk of bias, and responses in red are potential markers for a risk of bias. Where questions relate only to sign posts to other questions, no formatting is used.

Bias domain	Signalling questions	Elaboration	Response options
Bias due to confounding	1.1 Is there potential for confounding of the effect of intervention in this study? **If N/PN to 1.1:** the study can be considered to be at low risk of bias due to confounding and no further signalling questions need be considered	In rare situations, such as when studying harms that are very unlikely to be related to factors that influence treatment decisions, no confounding is expected and the study can be considered to be at low risk of bias due to confounding, equivalent to a fully randomized trial. There is no NI (No information) option for this signalling question.	Y / PY / PN / N
	If Y/PY to 1.1: determine whether there is a need to assess time-varying confounding:		
	1.2. Was the analysis based on splitting participants' follow up time according to intervention received? **If N/PN**, answer questions relating to baseline confounding (1.4 to 1.6) **If Y/PY**, proceed to question 1.3.	If participants could switch between intervention groups then associations between intervention and outcome may be biased by time-varying confounding. This occurs when prognostic factors influence switches between intended interventions.	NA / Y / PY / PN / N / NI
	1.3. Were intervention discontinuations or switches likely to be related to factors that are prognostic for the outcome? **If N/PN**, answer questions relating to baseline confounding (1.4 to 1.6) **If Y/PY**, answer questions relating to both baseline and time-varying confounding (1.7 and 1.8)	If intervention switches are unrelated to the outcome, for example when the outcome is an unexpected harm, then time-varying confounding will not be present and only control for baseline confounding is required.	NA / Y / PY / PN / N / NI
	Questions relating to baseline confounding only		
	1.4. Did the authors use an appropriate analysis method that controlled for all the important confounding domains?	Appropriate methods to control for measured confounders include stratification, regression, matching, standardization, and inverse probability weighting. They may control for individual variables or for the estimated propensity score. Inverse probability weighting is based on a function of the propensity score. Each method depends on the assumption that there is no unmeasured or residual confounding.	NA / Y / PY / PN / N / NI

	1.5. **If Y/PY to 1.4**: Were confounding domains that were controlled for measured validly and reliably by the variables available in this study?	Appropriate control of confounding requires that the variables adjusted for are valid and reliable measures of the confounding domains. For some topics, a list of valid and reliable measures of confounding domains will be specified in the review protocol but for others such a list may not be available. Study authors may cite references to support the use of a particular measure. If authors control for confounding variables with no indication of their validity or reliability pay attention to the subjectivity of the measure. Subjective measures (e.g. based on self-report) may have lower validity and reliability than objective measures such as lab findings.	NA / Y / PY / PN / N / NI
	1.6. Did the authors control for any post-intervention variables that could have been affected by the intervention?	Controlling for post-intervention variables that are affected by intervention is not appropriate. Controlling for mediating variables estimates the direct effect of intervention and may introduce bias. Controlling for common effects of intervention and outcome introduces bias.	NA / Y / PY / PN / N / NI
	Questions relating to baseline and time-varying confounding		
	1.7. Did the authors use an appropriate analysis method that adjusted for all the important confounding domains and for time-varying confounding?	Adjustment for time-varying confounding is necessary to estimate the effect of starting and adhering to intervention, in both randomized trials and NRSI. Appropriate methods include those based on inverse probability weighting. Standard regression models that include time-updated confounders may be problematic if time-varying confounding is present.	NA / Y / PY / PN / N / NI
	1.8. **If Y/PY to 1.7**: Were confounding domains that were adjusted for measured validly and reliably by the variables available in this study?	See 1.5 above.	NA / Y / PY / PN / N / NI
	Risk of bias judgement	See Table 1.	Low / Moderate / Serious / Critical / NI
	Optional: What is the predicted direction of bias due to confounding?	Can the true effect estimate be predicted to be greater or less than the estimated effect in the study because one or more of the important confounding domains was not controlled for? Answering this question will be based on expert knowledge and results in other studies and therefore can only be completed after all of the studies in the body of evidence have been reviewed. Consider the potential effect of each of the unmeasured domains and whether all important confounding domains not controlled for in the analysis would be likely to change the estimate in the same direction, or if one important confounding domain that was not controlled for in the analysis is likely to have a dominant impact.	Favours experimental / Favours comparator / Unpredictable

Bias in selection of participants into the study	2.1. Was selection of participants into the study (or into the analysis) based on participant characteristics observed after the start of intervention? **If N/PN to 2.1:** go to 2.4	This domain is concerned only with selection into the study based on participant characteristics observed *after* the start of intervention. Selection based on characteristics observed *before* the start of intervention can be addressed by controlling for imbalances between experimental intervention and comparator groups in baseline characteristics that are prognostic for the outcome (baseline confounding). Selection bias occurs when selection is related to an effect of either intervention or a cause of intervention **and** an effect of either the outcome or a cause of the outcome. Therefore, the result is at risk of selection bias if selection into the study is related to both the intervention and the outcome.	Y / PY / PN / N / NI
	2.2. **If Y/PY to 2.1**: Were the post-intervention variables that influenced selection likely to be associated with intervention?		NA / Y / PY / PN / N / NI
	2.3 **If Y/PY to 2.2**: Were the post-intervention variables that influenced selection likely to be influenced by the outcome or a cause of the outcome?		NA / Y / PY / PN / N / NI
	2.4. Do start of follow-up and start of intervention coincide for most participants?	If participants are not followed from the start of the intervention then a period of follow up has been excluded, and individuals who experienced the outcome soon after intervention will be missing from analyses. This problem may occur when prevalent, rather than new (incident), users of the intervention are included in analyses.	Y / PY / PN / N / NI
	2.5. **If Y/PY to 2.2 and 2.3, or N/PN to 2.4**: Were adjustment techniques used that are likely to correct for the presence of selection biases?	It is in principle possible to correct for selection biases, for example by using inverse probability weights to create a pseudo-population in which the selection bias has been removed, or by modelling the distributions of the missing participants or follow up times and outcome events and including them using missing data methodology. However such methods are rarely used and the answer to this question will usually be "No".	NA / Y / PY / PN / N / NI
	Risk of bias judgement	See Table 1.	Low / Moderate / Serious / Critical / NI
	Optional: What is the predicted direction of bias due to selection of participants into the study?	If the likely direction of bias can be predicted, it is helpful to state this. The direction might be characterized either as being towards (or away from) the null, or as being in favour of one of the interventions.	Favours experimental / Favours comparator / Towards null /Away from null / Unpredictable

Bias in classification of interventions	3.1 Were intervention groups clearly defined?	A pre-requisite for an appropriate comparison of interventions is that the interventions are well defined. Ambiguity in the definition may lead to bias in the classification of participants. For individual-level interventions, criteria for considering individuals to have received each intervention should be clear and explicit, covering issues such as type, setting, dose, frequency, intensity and/or timing of intervention. For population-level interventions (e.g. measures to control air pollution), the question relates to whether the population is clearly defined, and the answer is likely to be 'Yes'.	Y / PY / PN / N / NI
	3.2 Was the information used to define intervention groups recorded at the start of the intervention?	In general, if information about interventions received is available from sources that could not have been affected by subsequent outcomes, then differential misclassification of intervention status is unlikely. Collection of the information at the time of the intervention makes it easier to avoid such misclassification. For population-level interventions (e.g. measures to control air pollution), the answer to this question is likely to be 'Yes'.	Y / PY / PN / N / NI
	3.3 Could classification of intervention status have been affected by knowledge of the outcome or risk of the outcome?	Collection of the information at the time of the intervention may not be sufficient to avoid bias. The way in which the data are collected for the purposes of the NRSI should also avoid misclassification.	Y / PY / PN / N / NI
	Risk of bias judgement	See Table 1.	Low / Moderate / Serious / Critical / NI
	Optional: What is the predicted direction of bias due to measurement of outcomes or interventions?	If the likely direction of bias can be predicted, it is helpful to state this. The direction might be characterized either as being towards (or away from) the null, or as being in favour of one of the interventions.	Favours experimental / Favours comparator / Towards null /Away from null / Unpredictable

Bias due to deviations from intended interventions	**If your aim for this study is to assess the effect of assignment to intervention, answer questions 4.1 and 4.2**		
	4.1. Were there deviations from the intended intervention beyond what would be expected in usual practice?	Deviations that happen in usual practice following the intervention (for example, cessation of a drug intervention because of acute toxicity) are part of the intended intervention and therefore do not lead to bias in the effect of assignment to intervention. Deviations may arise due to expectations of a difference between intervention and comparator (for example because participants feel unlucky to have been assigned to the comparator group and therefore seek the active intervention, or components of it, or other interventions). Such deviations are not part of usual practice, so may lead to biased effect estimates. However these are not expected in observational studies of individuals in routine care.	Y / PY / PN / N / NI
	4.2. **If Y/PY to 4.1**: Were these deviations from intended intervention unbalanced between groups *and* likely to have affected the outcome?	Deviations from intended interventions that do not reflect usual practice will be important if they affect the outcome, but not otherwise. Furthermore, bias will arise only if there is imbalance in the deviations across the two groups.	NA / Y / PY / PN / N / NI
	If your aim for this study is to assess the effect of starting and adhering to intervention, answer questions 4.3 to 4.6		
	4.3. Were important co-interventions balanced across intervention groups?	Risk of bias will be higher if unplanned co-interventions were implemented in a way that would bias the estimated effect of intervention. Co-interventions will be important if they affect the outcome, but not otherwise. Bias will arise only if there is imbalance in such co-interventions between the intervention groups. Consider the co-interventions, including any pre-specified co-interventions, that are likely to affect the outcome and to have been administered in this study. Consider whether these co-interventions are balanced between intervention groups.	Y / PY / PN / N / NI
	4.4. Was the intervention implemented successfully for most participants?	Risk of bias will be higher if the intervention was not implemented as intended by, for example, the health care professionals delivering care during the trial. Consider whether implementation of the intervention was successful for most participants.	Y / PY / PN / N / NI
	4.5. Did study participants adhere to the assigned intervention regimen?	Risk of bias will be higher if participants did not adhere to the intervention as intended. Lack of adherence includes imperfect compliance, cessation of intervention, crossovers to the comparator intervention and switches to another active intervention. Consider available information on the proportion of study participants who continued with their assigned	Y / PY / PN / N / NI

		intervention throughout follow up, and answer 'No' or 'Probably No' if this proportion is high enough to raise concerns. Answer 'Yes' for studies of interventions that are administered once, so that imperfect adherence is not possible. We distinguish between analyses where follow-up time after interventions switches (including cessation of intervention) is assigned to (1) the new intervention or (2) the original intervention. (1) is addressed under time-varying confounding, and should not be considered further here.	
	4.6. **If N/PN to 4.3, 4.4 or 4.5**: Was an appropriate analysis used to estimate the effect of starting and adhering to the intervention?	It is possible to conduct an analysis that corrects for some types of deviation from the intended intervention. Examples of appropriate analysis strategies include inverse probability weighting or instrumental variable estimation. It is possible that a paper reports such an analysis without reporting information on the deviations from intended intervention, but it would be hard to judge such an analysis to be appropriate in the absence of such information. Specialist advice may be needed to assess studies that used these approaches. If everyone in one group received a co-intervention, adjustments cannot be made to overcome this.	NA / Y / PY / PN / N / NI
	Risk of bias judgement	See Table 2	
	Optional: What is the predicted direction of bias due to deviations from the intended interventions?	If the likely direction of bias can be predicted, it is helpful to state this. The direction might be characterized either as being towards (or away from) the null, or as being in favour of one of the interventions.	

Bias due to missing data	5.1 Were outcome data available for all, or nearly all, participants?	"Nearly all" should be interpreted as "enough to be confident of the findings", and a suitable proportion depends on the context. In some situations, availability of data from 95% (or possibly 90%) of the participants may be sufficient, providing that events of interest are reasonably common in both intervention groups. One aspect of this is that review authors would ideally try and locate an analysis plan for the study.	Y / PY / PN / N / NI
	5.2 Were participants excluded due to missing data on intervention status?	Missing intervention status may be a problem. This requires that the *intended* study sample is clear, which it may not be in practice.	Y / PY / PN / N / NI
	5.3 Were participants excluded due to missing data on other variables needed for the analysis?	This question relates particularly to participants excluded from the analysis because of missing information on confounders that were controlled for in the analysis.	Y / PY / PN / N / NI
	5.4 **If PN/N to 5.1, or Y/PY to 5.2 or 5.3**: Are the proportion of participants and reasons for missing data similar across interventions?	This aims to elicit whether either (i) differential proportion of missing observations or (ii) differences in reasons for missing observations could substantially impact on our ability to answer the question being addressed. "Similar" includes some minor degree of discrepancy across intervention groups as expected by chance.	NA / Y / PY / PN / N / NI
	5.5 **If PN/N to 5.1, or Y/PY to 5.2 or 5.3**: Is there evidence that results were robust to the presence of missing data?	Evidence for robustness may come from how missing data were handled in the analysis and whether sensitivity analyses were performed by the investigators, or occasionally from additional analyses performed by the systematic reviewers. It is important to assess whether assumptions employed in analyses are clear and plausible. Both content knowledge and statistical expertise will often be required for this. For instance, use of a statistical method such as multiple imputation does not guarantee an appropriate answer. Review authors should seek naïve (complete-case) analyses for comparison, and clear differences between complete-case and multiple imputation-based findings should lead to careful assessment of the validity of the methods used.	NA / Y / PY / PN / N / NI
	Risk of bias judgement	See Table 2	Low / Moderate / Serious / Critical / NI
	Optional: What is the predicted direction of bias due to missing data?	If the likely direction of bias can be predicted, it is helpful to state this. The direction might be characterized either as being towards (or away from) the null, or as being in favour of one of the interventions.	Favours experimental / Favours comparator / Towards null /Away from null / Unpredictable

11

Bias in measurement of outcomes	6.1 Could the outcome measure have been influenced by knowledge of the intervention received?	Some outcome measures involve negligible assessor judgment, e.g. all-cause mortality or non-repeatable automated laboratory assessments. Risk of bias due to measurement of these outcomes would be expected to be low.	Y / PY / PN / N / NI
	6.2 Were outcome assessors aware of the intervention received by study participants?	If outcome assessors were blinded to intervention status, the answer to this question would be 'No'. In other situations, outcome assessors may be unaware of the interventions being received by participants despite there being no active blinding by the study investigators; the answer this question would then also be 'No'. In studies where participants report their outcomes themselves, for example in a questionnaire, the outcome assessor is the study participant. In an observational study, the answer to this question will usually be 'Yes' when the participants report their outcomes themselves.	Y / PY / PN / N / NI
	6.3 Were the methods of outcome assessment comparable across intervention groups?	Comparable assessment methods (i.e. data collection) would involve the same outcome detection methods and thresholds, same time point, same definition, and same measurements.	Y / PY / PN / N / NI
	6.4 Were any systematic errors in measurement of the outcome related to intervention received?	This question refers to differential misclassification of outcomes. Systematic errors in measuring the outcome, if present, could cause bias if they are related to intervention or to a confounder of the intervention-outcome relationship. This will usually be due either to outcome assessors being aware of the intervention received or to non-comparability of outcome assessment methods, but there are examples of differential misclassification arising despite these controls being in place.	Y / PY / PN / N / NI
	Risk of bias judgement	See Table 2	Low / Moderate / Serious / Critical / NI
	Optional: What is the predicted direction of bias due to measurement of outcomes?	If the likely direction of bias can be predicted, it is helpful to state this. The direction might be characterized either as being towards (or away from) the null, or as being in favour of one of the interventions.	Favours experimental / Favours comparator / Towards null /Away from null / Unpredictable

12

Bias in selection of the reported result	Is the reported effect estimate likely to be selected, on the basis of the results, from...		
	7.1. ... multiple outcome *measurements* within the outcome domain?	For a specified outcome domain, it is possible to generate multiple effect estimates for different measurements. If multiple measurements were made, but only one or a subset is reported, there is a risk of selective reporting on the basis of results.	Y / PY / PN / N / NI
	7.2 ... multiple *analyses* of the intervention-outcome relationship?	Because of the limitations of using data from non-randomized studies for analyses of effectiveness (need to control confounding, substantial missing data, etc), analysts may implement different analytic methods to address these limitations. Examples include unadjusted and adjusted models; use of final value vs change from baseline vs analysis of covariance; different transformations of variables; a continuously scaled outcome converted to categorical data with different cut-points; different sets of covariates used for adjustment; and different analytic strategies for dealing with missing data. Application of such methods generates multiple estimates of the effect of the intervention versus the comparator on the outcome. If the analyst does not pre-specify the methods to be applied, and multiple estimates are generated but only one or a subset is reported, there is a risk of selective reporting on the basis of results.	Y / PY / PN / N / NI
	7.3 ... different *subgroups*?	Particularly with large cohorts often available from routine data sources, it is possible to generate multiple effect estimates for different subgroups or simply to omit varying proportions of the original cohort. If multiple estimates are generated but only one or a subset is reported, there is a risk of selective reporting on the basis of results.	Y / PY / PN / N / NI
	Risk of bias judgement	See Table 2	Low / Moderate / Serious / Critical / NI
	Optional: What is the predicted direction of bias due to selection of the reported result?	If the likely direction of bias can be predicted, it is helpful to state this. The direction might be characterized either as being towards (or away from) the null, or as being in favour of one of the interventions.	Favours experimental / Favours comparator / Towards null /Away from null / Unpredictable

Overall bias	**Risk of bias judgement**	See Table 3.	Low / Moderate / Serious / Critical / NI
	Optional: What is the overall predicted direction of bias for this outcome?		Favours experimental / Favours comparator / Towards null /Away from null / Unpredictable

Table 1. Reaching risk of bias judgements in ROBINS-I: pre-intervention and at-intervention domains

Judgement	Bias due to confounding	Bias in selection of participants into the study	Bias in classification of interventions
Low risk of bias (the study is comparable to a well-performed randomized trial with regard to this domain)	No confounding expected.	(i) All participants who would have been eligible for the target trial were included in the study; *and* (ii) For each participant, start of follow up and start of intervention coincided.	(i) Intervention status is well defined; *and* (ii) Intervention definition is based solely on information collected at the time of intervention.
Moderate risk of bias (the study is sound for a non-randomized study with regard to this domain but cannot be considered comparable to a well-performed randomized trial):	(i) Confounding expected, all known important confounding domains appropriately measured and controlled for; *and* (ii) Reliability and validity of measurement of important domains were sufficient, such that we do not expect serious residual confounding.	(i) Selection into the study may have been related to intervention and outcome; *and* The authors used appropriate methods to adjust for the selection bias; *or* (ii) Start of follow up and start of intervention do not coincide for all participants; *and* (a) the proportion of participants for which this was the case was too low to induce important bias; *or* (b) the authors used appropriate methods to adjust for the selection bias; *or* (c) the review authors are confident that the rate (hazard) ratio for the effect of intervention remains constant over time.	(i) Intervention status is well defined; *and* (ii) Some aspects of the assignments of intervention status were determined retrospectively.

Serious risk of bias (the study has some important problems);	(i) At least one known important domain was not appropriately measured, or not controlled for; *or* (ii) Reliability or validity of measurement of an important domain was low enough that we expect serious residual confounding.	(i) Selection into the study was related (but not very strongly) to intervention and outcome; *and* This could not be adjusted for in analyses; *or* (ii) Start of follow up and start of intervention do not coincide; *and* A potentially important amount of follow-up time is missing from analyses; *and* The rate ratio is not constant over time.	(i) Intervention status is not well defined; *or* (ii) Major aspects of the assignments of intervention status were determined in a way that could have been affected by knowledge of the outcome.
Critical risk of bias (the study is too problematic to provide any useful evidence on the effects of intervention);	(i) Confounding inherently not controllable *or* (ii) The use of negative controls strongly suggests unmeasured confounding.	(i) Selection into the study was very strongly related to intervention and outcome; *and* This could not be adjusted for in analyses; *or* (ii) A substantial amount of follow-up time is likely to be missing from analyses; *and* The rate ratio is not constant over time.	(Unusual) An extremely high amount of misclassification of intervention status, e.g. because of unusually strong recall biases.
No information on which to base a judgement about risk of bias for this domain.	No information on whether confounding might be present.	No information is reported about selection of participants into the study or whether start of follow up and start of intervention coincide.	No definition of the intervention or no explanation of the source of information about intervention status is reported.

Table 2. Reaching risk of bias judgements in ROBINS-I: post-intervention domains

Judgement	Bias due to deviations from intended intervention	Bias due to missing data	Bias in measurement of outcomes	Bias in selection of the reported result
Low risk of bias (the study is comparable to a well-performed randomized trial with regard to this domain)	**Effect of assignment to intervention:** (i) Any deviations from intended intervention reflected usual practice; *or* (ii) Any deviations from usual practice were unlikely to impact on the outcome. **Effect of starting and adhering to intervention:** The important **co-interventions** were balanced across intervention groups, and there were no deviations from the intended interventions (in terms of **implementation or adherence**) that were likely to impact on the outcome.	(i) Data were reasonably complete; *or* (ii) Proportions of and reasons for missing participants were similar across intervention groups; *or* (iii) The analysis addressed missing data and is likely to have removed any risk of bias.	(i) The methods of outcome assessment were comparable across intervention groups; *and* (ii) The outcome measure was unlikely to be influenced by knowledge of the intervention received by study participants (i.e. is objective) or the outcome assessors were unaware of the intervention received by study participants; *and* (iii) Any error in measuring the outcome is unrelated to intervention status.	There is clear evidence (usually through examination of a pre-registered protocol or statistical analysis plan) that all reported results correspond to all intended outcomes, analyses and sub-cohorts.

Moderate risk of bias (the study is sound for a non-randomized study with regard to this domain but cannot be considered comparable to a well-performed randomized trial):	**Effect of assignment to intervention:** There were deviations from usual practice, but their impact on the outcome is expected to be slight. **Effect of starting and adhering to intervention:** (i) There were deviations from intended intervention, but their impact on the outcome is expected to be slight. *or* (ii) The important co-interventions were not balanced across intervention groups, or there were deviations from the intended interventions (in terms of implementation and/or adherence) that were likely to impact on the outcome; *and* The analysis was appropriate to estimate the effect of starting and adhering to intervention, allowing for deviations (in terms of implementation, adherence and co-intervention) that were likely to impact on the outcome.	(i) Proportions of and reasons for missing participants differ slightly across intervention groups; *and* (ii) The analysis is unlikely to have removed the risk of bias arising from the missing data.	(i) The methods of outcome assessment were comparable across intervention groups; *and* (ii) The outcome measure is only minimally influenced by knowledge of the intervention received by study participants; *and* (iii) Any error in measuring the outcome is only minimally related to intervention status.	(i) The outcome measurements and analyses are consistent with an *a priori* plan; or are clearly defined and both internally and externally consistent; *and* (ii) There is no indication of selection of the reported analysis from among multiple analyses; *and* (iii) There is no indication of selection of the cohort or subgroups for analysis and reporting on the basis of the results.

Serious risk of bias (the study has some important problems);	**Effect of assignment to intervention:** There were deviations from usual practice that were unbalanced between the intervention groups and likely to have affected the outcome. **Effect of starting and adhering to intervention:** (i) The important co-interventions were not balanced across intervention groups, or there were deviations from the intended interventions (in terms of implementation and/or adherence) that were likely to impact on the outcome; *and* (ii) The analysis was not appropriate to estimate the effect of starting and adhering to intervention, allowing for deviations (in terms of implementation, adherence and co-intervention) that were likely to impact on the outcome.	(i) Proportions of missing participants differ substantially across interventions; *or* Reasons for missingness differ substantially across interventions; *and* (ii) The analysis is unlikely to have removed the risk of bias arising from the missing data; *or* Missing data were addressed inappropriately in the analysis; *or* The nature of the missing data means that the risk of bias cannot be removed through appropriate analysis.	(i) The methods of outcome assessment were not comparable across intervention groups; *or* (ii) The outcome measure was subjective (i.e. vulnerable to influence by knowledge of the intervention received by study participants); *and* The outcome was assessed by assessors aware of the intervention received by study participants; *or* (iii) Error in measuring the outcome was related to intervention status.	(i) Outcomes are defined in different ways in the methods and results sections, or in different publications of the study; *or* (ii) There is a high risk of selective reporting from among multiple analyses; *or* (iii) The cohort or subgroup is selected from a larger study for analysis and appears to be reported on the basis of the results.

Critical risk of bias (the study is too problematic to provide any useful evidence on the effects of intervention);	**Effect of assignment to intervention:** There were substantial deviations from usual practice that were unbalanced between the intervention groups and likely to have affected the outcome. **Effect of starting and adhering to intervention:** (i) There were substantial imbalances in important co-interventions across intervention groups, or there were substantial deviations from the intended interventions (in terms of implementation and/or adherence) that were likely to impact on the outcome; *and* (ii) The analysis was not appropriate to estimate the effect of starting and adhering to intervention, allowing for deviations (in terms of implementation, adherence and co-intervention) that were likely to impact on the outcome.	(i) (Unusual) There were critical differences between interventions in participants with missing data; *and* (ii) Missing data were not, or could not, be addressed through appropriate analysis.	The methods of outcome assessment were so different that they cannot reasonably be compared across intervention groups.	(i) There is evidence or strong suspicion of selective reporting of results; *and* (ii) The unreported results are likely to be substantially different from the reported results.

No information on which to base a judgement about risk of bias for this domain.	No information is reported on whether there is deviation from the intended intervention.	No information is reported about missing data or the potential for data to be missing.	No information is reported about the methods of outcome assessment.	There is too little information to make a judgement (for example, if only an abstract is available for the study).

Table 3. Interpretation of domain-level and overall risk of bias judgements in ROBINS-I

Judgement	**Within each domain**	**Across domains**	**Criterion**
Low risk of bias	The study is comparable to a well-performed randomized trial with regard to this domain	The study is comparable to a well-performed randomized trial	The study is judged to be at **low risk of bias for all domains**.
Moderate risk of bias	The study is sound for a non-randomized study with regard to this domain but cannot be considered comparable to a well-performed randomized trial	The study provides sound evidence for a non-randomized study but cannot be considered comparable to a well-performed randomized trial	The study is judged to be at **low or moderate risk of bias for all domains**.
Serious risk of bias	the study has some important problems in this domain	The study has some important problems	The study is judged to be at **serious risk of bias** in at least one domain, but not at critical risk of bias in any domain.
Critical risk of bias	the study is too problematic in this domain to provide any useful evidence on the effects of intervention	The study is too problematic to provide any useful evidence and should not be included in any synthesis	The study is judged to be at **critical risk of bias in at least one domain.**
No information	No information on which to base a judgement about risk of bias for this domain	No information on which to base a judgement about risk of bias	There is no clear indication that the study is at serious or critical risk of bias *and* there is a lack of information in one or more key domains of bias (*a judgement is required for this*).

EK-3 Newcastle-Ottawa Skalası

NEWCASTLE - OTTAWA QUALITY ASSESSMENT SCALE
CASE CONTROL STUDIES

Note: A study can be awarded a maximum of one star for each numbered item within the Selection and Exposure categories. A maximum of two stars can be given for Comparability.

Selection

1) Is the case definition adequate?
   a) yes, with independent validation ✷
   b) yes, eg record linkage or based on self reports
   c) no description

2) Representativeness of the cases
   a) consecutive or obviously representative series of cases ✷
   b) potential for selection biases or not stated

3) Selection of Controls
   a) community controls ✷
   b) hospital controls
   c) no description

4) Definition of Controls
   a) no history of disease (endpoint) ✷
   b) no description of source

Comparability

1) Comparability of cases and controls on the basis of the design or analysis
   a) study controls for _____ (Select the most important factor.) ✷
   b) study controls for any additional factor ✷ (This criteria could be modified to indicate specific control for a second important factor.)

Exposure

1) Ascertainment of exposure
   a) secure record (eg surgical records) ✷
   b) structured interview where blind to case/control status ✷
   c) interview not blinded to case/control status
   d) written self report or medical record only
   e) no description

2) Same method of ascertainment for cases and controls
   a) yes ✷
   b) no

3) Non-Response rate
   a) same rate for both groups ✷
   b) non respondents described
   c) rate different and no designation

COHORT STUDIES

Note: A study can be awarded a maximum of one star for each numbered item within the Selection and Outcome categories. A maximum of two stars can be given for Comparability

Selection

1) Representativeness of the exposed cohort
   a) truly representative of the average _____ (describe) in the community ✸
   b) somewhat representative of the average _____ in the community ✸
   c) selected group of users eg nurses, volunteers
   d) no description of the derivation of the cohort

2) Selection of the non exposed cohort
   a) drawn from the same community as the exposed cohort ✸
   b) drawn from a different source
   c) no description of the derivation of the non exposed cohort

3) Ascertainment of exposure
   a) secure record (eg surgical records) ✸
   b) structured interview ✸
   c) written self report
   d) no description

4) Demonstration that outcome of interest was not present at start of study
   a) yes ✸
   b) no

Comparability

1) Comparability of cohorts on the basis of the design or analysis
   a) study controls for _____ (select the most important factor) ✸
   b) study controls for any additional factor ✸ (This criteria could be modified to indicate specific control for a second important factor.)

Outcome

1) Assessment of outcome
   a) independent blind assessment ✸
   b) record linkage ✸
   c) self report
   d) no description

2) Was follow-up long enough for outcomes to occur
   a) yes (select an adequate follow up period for outcome of interest) ✸
   b) no

3) Adequacy of follow up of cohorts
   a) complete follow up - all subjects accounted for ✸
   b) subjects lost to follow up unlikely to introduce bias - small number lost - > ____ % (select an adequate %) follow up, or description provided of those lost) ✸
   c) follow up rate < ____% (select an adequate %) and no description of those lost
   d) no statement

EK-4 ROBINS-I TOOL Detaylı Değerlendirme

Çalışma		Girişim Öncesi		Girişim sırasında	Girişim Sonrasında				Genel Yanlılık Değerlendirmesi
İlk Yazar	Yıl	Karıştırıcı Faktörlere Bağlı Yanlılık	Çalışmaya Alınan Katılımcıların Seçimine Bağlı Yanlılık	Girişimin Klasifikasyonuna Bağlı Yanlılık	Planlanan Görüşmelerden Sapmaya Bağlı Yanlılık	Kayıp Veri Kaynaklı yanlılık	Sonuçların Ölçümü Kaynaklı Yanlılık	Rapor Edilen Sonucun Seçimi Kaynaklı Yanlılık	Düşük/ Orta/Ciddi/Kritik
Weber	2014	düşük	düşük	düşük	düşük	orta	düşük	düşük	düşük
Lasse	2017	düşük	düşük	düşük	düşük	orta	düşük	düşük	düşük
Meserve	2021	düşük	düşük	düşük	düşük	düşük	düşük	düşük	düşük
Winter	2017	düşük	düşük	düşük	düşük	düşük	düşük	düşük	düşük
Wallenius	2015	orta	orta	orta	düşük	düşük	düşük	orta	orta
Egeberg	2017	düşük	düşük	düşük	düşük	düşük	düşük	düşük	düşük

EK-5 GRADEPRO Summary of Findings

Summary of findings:

Paternal methotrexate exposure compared to non-exposure in men who wishing for conception

Patient or population: men who wishing for conception
Setting:
Intervention: paternal methotrexate exposure
Comparison: non-exposure

Outcomes	Anticipated absolute effects* (95% CI)		Relative effect (95% CI)	№ of participants (studies)	Certainty of the evidence (GRADE)	Comments
	Risk with non-exposure	Risk with paternal methotrexate exposure				
Major Congenital Malformation Crude Data Main Analysis 1 (MCM Crude 1) follow-up: range 6 months to 1 years	**Study population**		**OR 1.15** (0.52 to 2.58)	850402 (4 observational studies)	⨁⨁◯◯ Low[a,b,c]	Paternal methotrexate exposure does not increase Major Congenital Malformation Crude Data Main Analysis 1.
	34 per 1.000	**39 per 1.000** (18 to 83)				
	Moderate					
	30 per 1.000	**34 per 1.000** (16 to 74)				
Major Congenital Malformation Crude Data Main Analysis 2 (MCM Crude 2) follow-up: range 6 months to 1 years	**Study population**		**OR 1.05** (0.49 to 2.26)	1446883 (4 observational studies)	⨁⨁◯◯ Low[a,b,c]	Paternal methotrexate exposure does not increase Major Congenital Malformation Crude Data Main Analysis 2.
	32 per 1.000	**34 per 1.000** (16 to 70)				
	Moderate					
	30 per 1.000	**31 per 1.000** (15 to 65)				
Major Congenital Malformations Main Analysis with aOR 1 (MCM aOR) follow-up: range 6 months to 1 years	**Moderate**		**OR 0.97** (0.56 to 1.68)	(4 observational studies)	⨁⨁⨁◯ Moderate[c,d]	Paternal methotrexate exposure likely results in little to no difference in Major Congenital Malformations Main Analysis with aOR.
	30 per 1.000	**29 per 1.000** (17 to 49)				
Major Congenital Malformations Sensitivity Analysis with aOR (MCM Sensitivity Analysis) follow-up: range 6 months to 1 years	0 per 1.000	**0 per 1.000** (0 to 0)	**OR 1.03** (0.59 to 1.78)	(4 observational studies)	⨁⨁⨁◯ Moderate[c,d]	Paternal methotrexate exposure likely results in little to no difference in Major Congenital Malformations Sensitivity Analysis with aOR.
Stillbirth Crude Data Analysis (Stillbirth)	3 per 1.000	**3 per 1.000** (0 to 19)	**OR 0.85** (0.11 to 6.45)	852742 (2 observational studies)	⨁⨁◯◯ Low[a,c,e]	The evidence suggests that paternal methotrexate exposure results in little to no difference in Stillbirth Crude Data Analysis.
Preterm Birth Crude Data Analysis (Preterm birth)	56 per 1.000	**49 per 1.000** (24 to 98)	**OR 0.87** (0.42 to 1.82)	1014439 (2 observational studies)	⨁◯◯◯ Very low[a,b,c,f]	The evidence is very uncertain about the effect of paternal methotrexate exposure on Preterm Birth Crude Data Analysis.
Preterm Birth Sensitivity Analysis with aOR (Preterm birth Sensitivity)	0 per 1.000	**0 per 1.000** (0 to 0)	**OR 0.90** (0.38 to 2.14)	(2 observational studies)	⨁◯◯◯ Very low[b,c,f]	The evidence is very uncertain about the effect of paternal methotrexate exposure on Preterm Birth Sensitivity Analysis with aOR.

*__The risk in the intervention group__ (and its 95% confidence interval) is based on the assumed risk in the comparison group and the __relative effect__ of the intervention (and its 95% CI).

CI: confidence interval; **OR:** odds ratio

GRADE Working Group grades of evidence
High certainty: we are very confident that the true effect lies close to that of the estimate of the effect.
Moderate certainty: we are moderately confident in the effect estimate: the true effect is likely to be close to the estimate of the effect, but there is a possibility that it is substantially different.
Low certainty: our confidence in the effect estimate is limited: the true effect may be substantially different from the estimate of the effect.
Very low certainty: we have very little confidence in the effect estimate: the true effect is likely to be substantially different from the estimate of effect.

Explanations

a. Confounding factors were not adjusted in this analysis, crude data was used.
b. Confidence interval wideness
c. Confidence interval includes significant benefit and potential harm.
d. Confidence intervals are quite wide but are not considered serious enough to downgrade.
e. Very wide confidence intervals
f. Moderate level heterogeneity

EK-6 GRADEPRO Details

Question: Paternal methotrexate exposure compared to non-exposure in men who wishing for conception
Setting:
Bibliography:

Certainty assessment							№ of patients		Effect		Certainty	Importance
№ of studies	Study design	Risk of bias	Inconsistency	Indirectness	Imprecision	Other considerations	paternal methotrexate exposure	non-exposure	Relative (95% CI)	Absolute (95% CI)		
Major Congenital Malformation Crude Data Main Analysis 1 (follow-up: range 6 months to 1 years)												
4	observational studies	serious[a]	not serious	not serious	very serious[b,c]	all plausible residual confounding would suggest spurious effect, while no effect was observed	7/264 (2.7%)	28822/850138 (3.4%) 3.0%	**OR 1.15** (0.52 to 2.58)	**5 more per 1.000** (from 16 fewer to 49 more) **4 more per 1.000** (from 14 fewer to 44 more)	⨁⨁◯◯ Low	CRITICAL
Major Congenital Malformation Crude Data Main Analysis 2 (follow-up: range 6 months to 1 years)												
4	observational studies	serious[a]	not serious	not serious	very serious[b,c]	all plausible residual confounding would suggest spurious effect, while no effect was observed	7/264 (2.7%)	46687/1446619 (3.2%) 3.0%	**OR 1.05** (0.49 to 2.26)	**2 more per 1.000** (from 16 fewer to 38 more) **1 more per 1.000** (from 15 fewer to 35 more)	⨁⨁◯◯ Low	CRITICAL
Major Congenital Malformations Main Analysis with aOR 1 (follow-up: range 6 months to 1 years)												
4	observational studies	not serious	not serious	not serious	serious[c,d]	none	0/0	3.0%	**OR 0.97** (0.56 to 1.68)	**1 fewer per 1.000** (from 13 fewer to 19 more)	⨁⨁⨁◯ Moderate	CRITICAL
Major Congenital Malformations Sensitivity Analysis with aOR (follow-up: range 6 months to 1 years)												
4	observational studies	not serious	not serious	not serious	serious[c,d]	none	0/0	0/0	**OR 1.03** (0.59 to 1.78)	**1 fewer per 1.000** (from 2 fewer to 1 fewer)	⨁⨁⨁◯ Moderate	CRITICAL
Stillbirth Crude Data Analysis												
2	observational studies	serious[a]	not serious	not serious	very serious[c,e]	all plausible residual confounding would suggest spurious effect, while no effect was observed	0/240 (0.0%)	2544/852502 (0.3%)	**OR 0.85** (0.11 to 6.45)	**0 fewer per 1.000** (from 3 fewer to 16 more)	⨁⨁◯◯ Low	IMPORTANT
Preterm Birth Crude Data Analysis												
2	observational studies	serious[a]	serious[f]	not serious	very serious[b,c]	all plausible residual confounding would suggest spurious effect, while no effect was observed	21/280 (7.5%)	57142/1014159 (5.6%)	**OR 0.87** (0.42 to 1.82)	**7 fewer per 1.000** (from 32 fewer to 42 more)	⨁◯◯◯ Very low	IMPORTANT
Preterm Birth Sensitivity Analysis with aOR												
2	observational studies	not serious	serious[f]	not serious	very serious[b,c]	none	0/0	0/0	**OR 0.90** (0.38 to 2.14)	**1 fewer per 1.000** (from 2 fewer to 0 fewer)	⨁◯◯◯ Very low	IMPORTANT

CI: confidence interval; **OR:** odds ratio

Explanations

a. Confounding factors were not adjusted in this analysis, crude data was used.
b. Confidence interval wideness
c. Confidence interval includes significant benefit and potential harm.
d. Confidence intervals are quite wide but are not considered serious enough to downgrade.
e. Very wide confidence intervals
f. Moderate level heterogeneity