

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

KENDİLİĞİNDEN DÜŞÜK İLE SONUÇLANAN KROMOZOMAL
OLARAK NORMAL VEYA SAYISAL ANOMALİYE SAHİP
TROFOBLASTİK DOKULARDA, PLASENTOGENEZDE AKTİVATÖR
VE İNHİBİTÖR ETKİLİ MİRNA'LARIN EKSPRESYON
SEVİYELERİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
DR. ELVİN KAZANCIOĞLU

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MERAL YİRMİBEŞ KARAOĞUZ

ANKARA

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**KENDİLİĞİNDEN DÜŞÜK İLE SONUÇLANAN KROMOZOMAL
OLARAK NORMAL VEYA SAYISAL ANOMALİYE SAHİP
TROFOBLASTİK DOKULARDA, PLASENTOGENEZDE AKTİVATÖR
VE İNHİBİTÖR ETKİLİ MİRNA'LARIN EKSPRESYON
SEVİYELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. ELVİN KAZANCIOĞLU**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MERAL YİRMİBEŞ KARAOĞUZ**

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TTU-2021-6959 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tez Savunma Sınav Tutanağı

08/12/2022

Adı ve Soyadı	Elvin Kazancıoğlu
Baba Adı	Yüksel
Doğum Yeri/Tarihi	
Diploma Tarihi/Diploma No	
Mezun Olduğu Fakülte	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı/Bilim Dalı	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
İhtisas Süresi	4 yıl
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı

UZMANLIK TEZİNİN ADI: "Kendiliğinden düşük ile sonuçlanan kromozomal olarak normal veya sayısal anomaliye sahip trofoblastik dokularda, plasentogenezde aktivatör ve inhibitör etkili miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin araştırılması"

JÜRİ KARARI: Başarılı

JÜRİ ÜYELERİ:

BAŞKAN
Prof.Dr.Meral Yılmaz Karaoğuz

ÜYE
Prof.Dr.Mehmet Ali Ergün

ÜYE
Doç.Dr.Taha Bahar

TEŞEKKÜR

Kendiliğinden düşük ile sonuçlanan kromozomal olarak normal veya sayısal anomaliye sahip trofoblastik dokularda, plasentogenezde aktivatör ve inhibitör etkili miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin araştırılması konulu, BAP tarafından TTU-2021-6959 proje numarası ile desteklenen bu çalışma, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı sorumluluğundaki Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezinde yapılmıştır.

Tez çalışmamın her aşamasında ilgisini, desteğini ve sabrını benden esirgemeyen, bilgi, öneri ve deneyimleri ile eğitimime katkıda bulunan tez yöneticim ve danışmanım Sayın Hocam Prof. Dr. Meral Yirmibeş Karaoguz'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgisinden faydalandığım, bu tezin gerçekleşmesi dahil olmak üzere pek çok konuda danışmanlığına başvurduğum Anabilim Dalı Başkanı Sayın Hocam Prof. Dr. Esra Tuğ'a ilgi ve destekleri için şükranlarımı sunarım. Çalışmam sırasında ve uzmanlık eğitimim boyunca bilgisinden faydalandığım, genetikte güncel yaklaşımları takip etmemizi sağlayan Sayın Hocam Prof. Dr. Mehmet Ali Ergün'e teşekkürlerimi sunarım. Asistanlık eğitimim ve öğrenimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, özellikle dismorfik hasta yaklaşımını kendisinden öğrenme şansı yakaladığım Sayın Hocam Prof. Dr. E. Ferda Perçin'e müteşekkirim. Uzmanlık eğitimim süresince ilgi ve desteğini benden esirgemeyen, çalışma prensibine hayranlık duyduğum Sayın Hocam Dr. Öğr. Üyesi Gülsüm Kayhan'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezin gerçekleşmesinde yardımlarını eksik etmeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hasan Hüseyin Kazan'a teşekkürü bir borç bilirim.

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalışma imkanı bulduğum tüm asistan arkadaşlarıma ve akademik-teknik personele teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak tüm eğitim ve öğrenim hayatımda, karşılıksız sevgi ve ilgileri ile her zaman yanımda olan anneme ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
KISALTMALAR.....	v
TABLolar DİZİNİ.....	vii
ŞEKİL DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. MikroRNA.....	4
2.1.1. Tarihçe.....	4
2.1.2. MikroRNA Ekspresyonu ve Biyogenezi.....	6
2.1.3. MikroRNA Moleküler Etki Mekanizması.....	11
2.2. Placenta Gelişimi ve Fizyolojisi.....	12
2.2.1. Blastosist İmplantasyonu.....	12
2.2.2. Placenta Gelişimi.....	13
2.2.3. Placentogenezde Aktivatör ve İnhibitör Etkili miRNA'lar.....	14
2.3. Gebelik Kaybı Etiyolojisi.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. Katılımcılar ve Örnekler.....	22
3.2. DeneySEL Basamaklar.....	26
3.2.1. Trofoblastik Dokulardan Sitogenetik Analiz.....	26
3.2.2. Dokuların Saklanması.....	27

3.2.3. İzlenen Deneysel Basamaklar.....	27
3.2.3.1. Dokudan Total RNA İzolasyonu.....	27
3.2.3.2. DNaz Uygulaması.....	29
3.2.3.3. cDNA Sentezi.....	30
3.2.3.4. Kantitatif Ters Transkriptaz Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	32
3.3. İstatiksel Analizler.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Katılımcıların Klinik Özellikleri.....	35
4.2. Olgun miRNA Tespiti İçin Kullanılan Primerlerin Validasyonu.....	36
4.3. MikroRNA Ekspresyon Seviyeleri.....	38
4.3.1. MIR210 ekspresyonu.....	39
4.3.2. MIR376c ekspresyonu.....	39
4.3.3. MIR378a-5p ekspresyonu.....	40
4.3.4. MIR34a ekspresyonu.....	41
4.3.5. MIR195 ekspresyonu.....	42
5. TARTIŞMA.....	44
6. SONUÇLAR.....	55
7. KAYNAKLAR.....	57
8. ÖZET.....	69
9. SUMMARY.....	70
10. ÖZGEÇMİŞ	72

11. EKLER.....	74
11.1. Ek-1: Bilgilendirilmiş Onam Formu-2.....	74
11.2. Ek-2: Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar İçin Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (BGOF).....	76



KISALTMALAR

ACOG	: Amerikan Obstetri ve Jinekoloji Derneği
C14MC	: Chromosome 14 MicroRNA Cluster, Kromozom 14 MikroRNA Kümesi
cDNA	: complementary DNA, komplementer DNA
CMA	: Chromosomal Microarray Analysis, Kromozomal Mikroarray Analizi
DGCR8	: DiGeorge syndrome critical region 8, DiGeorge sendromu kritik bölge 8
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoxynucleotide triphosphate, deoksinükleotid trifosfat
ds-RBD	: double stranded RNA binding domain, çift sarmallı RNA bağlayan segment
dsRNA	: Double stranded RNA, çift sarmallı RNA
DTT	: Dithiothreitol, ditiyotreitöl
ESHRE	: European Society of Human Reproduction and Embryology, Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Derneği
HIF-1α	: Hypoxia Inducible Factor-1 alpha, Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör-1alfa
miRNA*	: microRNA*, öncül mikroRNA yolcu zinciri
IVF	: in vitro fertilizasyon
nt	: nucleotide, nükleotid
ORF	: Open reading frame, başlangıç ve bitiş kodonları arasındaki

okuma çerçevesi

PB : Processing body, P cisimciği

PE : Preeklampsia

piRNA : PIWI interacting RNA, PIWI etkileşimli RNA

PPARGC1B : Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 beta,
peroksizom proliferatör, aktive reseptör, γ koaktivatör 1

pre-miRNA : Precursor microRNA, öncül mikroRNA

pri-miRNA : Primary microRNA, birincil mikroRNA

qRT-PCR : Quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction, Kantitatif
Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RAN•GTP : GTP-bağlayıcı nükleer protein

RNA : Ribonükleik asit

RNaz : Ribonükleaz

SARS-CoV-2 : Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, Şiddetli akut
solunum sendromu korona virüs 2

siRNA : Small interfering RNA, kısa interfering RNA

ssRNA : Single stranded RNA, tek sarmallı RNA

UTR : Untranslated region, translasyona uğramayan bölge

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Sitogenetik anomalilerin maternal yaşa göre gruplar arasında dağılımı.....	23
Tablo 2. Sadece olgun miRNA'ların ters transkripsiyonunu sağlayabilecek özel primerler.	31
Tablo 3. qRT-PCR'da çalışılan forward ve reverse primerler.....	32
Tablo 4. qRT-PCR ana bileşeni için gerekli olan bileşenler.....	33
Tablo 5. qRT-PCR çalışmasında kullanılan termal profil.....	33
Tablo 6. Kontrol grubu (dizomik XY) ve çalışma grubu miRNA ekspresyon değişikliklerinin referans miRNA ile kıyaslanması.....	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Tüm çalışma grubundaki spontan abortus sayıları ve yüzdeleri....	24
Şekil 2. Spontan abortus etiyojisi için GHDM'e refere edilen tüm trofoblastik doku örneklerinden bu çalışma için belirlenen içleme ve dışlama kriterleri.....	25
Şekil 3. Çalışma grubu içindeki cinsiyet dağılımı.....	26
Şekil 4. Sadece olgun miRNA'ların ekspresyon seviyelerini tespit etmeye yönelik primer dizayn yaklaşımı.	30
Şekil 5. MIR210 kantifikasyon eğrisi (sol) ve erime eğrisi (sağ).....	36
Şekil 6. MIR376c kantifikasyon eğrisi (sol) ve erime eğrisi (sağ).....	36
Şekil 7. MIR378a-5p kantifikasyon eğrisi (sol) ve erime eğrisi (sağ).....	37
Şekil 8. MIR34a kantifikasyon eğrisi (sol) ve erime eğrisi (sağ).....	37
Şekil 9. MIR195 kantifikasyon eğrisi (sol) ve erime eğrisi (sağ).....	37
Şekil 10. Çalışma grubu (n= 58) ve alt gruplarının, kontrol grubu (n= 42) trofoblastik doku örneklerine kıyasla MIR210 ekspresyonunu (delta Ct; ΔCt) gösteren grafikler (A-L).....	39

Şekil 11. Çalışma grubu (n= 58) ve alt gruplarının, kontrol grubu (n= 42) trofoblastik doku örneklerine kıyasla MIR376c ekspresyonunu gösteren grafikler (A-L).	40
Şekil 12. Çalışma grubu (n= 58) ve alt gruplarının, kontrol grubu (n= 42) trofoblastik doku örneklerine kıyasla MIR378a-5p ekspresyonunu gösteren grafikler (A-L).	41
Şekil 13. Çalışma grubu (n= 58) ve alt gruplarının, kontrol grubu (n= 42) trofoblastik doku örneklerine kıyasla MIR34a ekspresyonunu gösteren grafikler (A-L).	42
Şekil 14. Çalışma grubu (n= 58) ve alt gruplarının, kontrol grubu (n= 42) trofoblastik doku örneklerine kıyasla MIR195 ekspresyonunu gösteren grafikler (A-L).	43

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kendiliğinden düşük veya spontan abortus olarak da adlandırılan gebelik kaybı, intrauterin hayatta 20. gebelik haftası ve öncesi dönemde fetüsün canlılığını kaybetmesi olarak tanımlanmaktadır. Gebelik kaybı, erken gebelikte en sık görülen komplikasyondur (1, 2).

Kendiliğinden düşükler, aileler ve toplum için önemli bir sağlık sorunudur. Etiyolojide uterin anomaliler gibi yapısal bozukluklar ile hormonal-immünolojik etkenler gibi nedenler dışlandıktan sonra, genetik faktörler öncelikli olarak araştırılmalıdır. Bu genetik faktörler içinde kromozomal anomaliler en büyük grubu oluşturduğu için ilk basamak plasental dokunun sitogenetik analizi olmalıdır (1, 2). Sitogenetik analizde anomalili karyotip (sıklıkla sayısal anomaliler ve özellikle de anöploidiler) veya cinsiyeti erkek lehine (XY) normal konstitüsyonel karyotip belirlendiğinde bu durum abort materyalinin gerçek karyotipi lehine yorumlanmaktadır. Rutin sitogenetik analizde normal kadın karyotipi (XX) belirlendiğinde ise annenin desidual hücreleri ile kontaminasyon (yaklaşık %80-90 oranında) riski yüksek olduğundan, bu kromozom analizinin sonucunun anneye mi yoksa fetüse mi ait olduğunun ayırımı yapılamamaktadır (1-4).

Son yıllarda, kromozomal anomalilerin yanı sıra kendiliğinden düşük etiyojisinde gen/DNA/RNA düzeyindeki çalışmalar da önem kazanmaya başlamıştır (5-8). Özellikle kendiliğinden düşükler ile mikroRNA (miRNA) ifadenme (ekspresyon) seviyeleri arasındaki ilişki giderek daha fazla merak uyandırmaktadır. Bu çalışmada da trofoblastik dokuda plasentogenezi düzenleyen

(aktivatör ve inhibitör etkili) miRNA ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Literatürdeki çalışmalarda, gerçek fetal doku ayrımı yapılmayan plasental örneklerde, fetal/maternal miRNA ekspresyon sonuçları sunulmakta iken; ilk defa bu çalışma ile fetal dokuyu yansıtan erkek cinsiyette normal karyotip saptanmış veya sayısal kromozomal anomali (anöploidi ve triploidi) belirlenmiş trofoblastik doku örnekleri seçilerek, miRNA ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir.

Literatürde trofoblast invazyonu üzerinde inhibitör (örneğin MIR34a) veya trofoblast proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu üzerinde aktivatör (örneğin MIR378a-5p) etkisi olan miRNA'lar ile ilişkili çalışmalar yer almakla beraber bu grup miRNA'ların kendiliğinden düşük materyalleri üzerindeki etkisini gösteren çalışmalar son derece sınırlıdır (9-11). Diğer bir kısıtlılık ise kendiliğinden düşükler ile yapılan çalışmalarda fetal/maternal doku ayrımının yapılmamış olmasıdır. Ventura ve arkadaşları spontan abortusu olan 11 kadına ait plasental örnek (fetal/maternal doku ayrımı yapılmaksızın) ile medikal nedeni olmaksızın küretaj yapılan 20 kontrol grubu kadına ait plasental örnekte direkt cerrahi işlemi takiben MIR17 ve MIR19b'nin ekspresyon seviyelerini araştırmışlardır (12). Hosseini ve arkadaşlarının çalışmasında da düşük materyalinin fetal doku lehine olduğunun ayrımı yapılmaksızın miRNA ekspresyonu 24 plasenta örneğinde çalışılmıştır (13). Her iki çalışmada da plasental dokunun gerçek fetal dokuyu mu yoksa anneye ait desidual dokuyu mu yansıttığının ayrımı yapılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmalardaki miRNA ekspresyon seviyeleri ile ilgili elde edilen verilerde kısıtlılık söz konusudur. Bu çalışmada ise, **fetal doku lehine seçilen plasental örneklerde** (trofoblastik dokularda) plasenta gelişiminde aktivatör etkili **MIR378a-5p**,

MIR376c ve **MIR195** ile inhibitör etkili **MIR34a** ve **MIR210** ekspresyon seviyeleri, 42 normal XY karyotipli kontrol grubu ile 58 anomalili (anöploidi ve triploidi) karyotip belirlenen çalışma grubunda araştırılmıştır. Bu hali ile çalışma, gerçek fetal dokuyu yansıttığı bilgisine sahip olunan hastaların düşük materyalleri üzerinde miRNA ekspresyon seviyelerinin belirlendiği ilk çalışmadır ve sonuçları açısından da fetüsü yansıtan gebelik kaybına ait daha doğru verilerin eldesine olanak sağlamıştır.

Sonuç olarak bu tez çalışması ile kromozomal anomaliler gibi iyi bilinen etiyolojik faktörlerin dışında plasenta gelişiminde önemi olan miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin ve abort patofizyolojisindeki olası rollerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MikroRNA

2.1.1. Tarihçe

MikroRNA'lar, çeşitli hedef genlerin ekspresyonunu posttranskripsiyonel olarak düzenleyen küçük endojen tek zincirli RNA'lardır (14). İnsan genomu, yaklaşık 2.700 olgun miRNA (15) ve GENCODE verilerine (v.29) göre düşük varyasyonlara sahip izoformlar da dahil olmak üzere 200.000'den fazla miRNA transkripti kodlamaktadır (16). Nematodlar, sinekler ve memelilerde genomun yaklaşık %1'ini miRNA'ların oluşturduğu tahmin edilmektedir (17-20).

Memeli gelişimi, fizyolojisi ve hastalıkları için temel öneme sahip birçok keşifte olduğu gibi, bilinen ilk miRNA da memelilerde değil, omurgasız bir canlıda keşfedilmiştir (14). İlk olarak Victor Ambros ve ark. tarafından, bir araştırmada, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) larva gelişiminin zamanlamasını kontrol ettiği bilinen, bir gen olan, *lin-4*'ün protein kodlamadığı ancak bir çift küçük RNA sentezlediği keşfedilmiştir. Yaklaşık 22 nükleotid ve 61 nükleotid uzunluğundaki iki küçük *lin-4* gen ürününden uzun olanın, daha kısa olana öncülük ettiği ve bir stem-loop formasyonunda katlanacağı tahmin edilmiştir. Bu *lin-4* gen ürünü veya ürünleri, *lin-14* haberci RNA'sı (messenger RNA, mRNA) üzerindeki 3' translasyona uğramayan bölgedeki (3' untranslated region, 3'UTR) bir tekrar dizisinin tamamlayıcısıdır (21). Ruvkun laboratuvarı, *lin-4* aracılı bu düzenlemenin *lin-14* mRNA seviyelerinde gözle görülür bir değişiklik olmaksızın LIN-14 protein miktarını önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (21). Bu keşifler, birinci larvanın hücre bölünmelerinden geçişini tetikleyen düzenleyici yolun bir parçası olarak

antisens bir mekanizma ile *lin-4* RNA'ların *lin-14* 3'UTR bölgesi aracılığıyla etkileşerek *lin-14* mRNA'sının translasyonunu doğrudan veya dolaylı olarak inhibe etmek üzere düzenleyebildiği bir modeli desteklemektedir (21, 22).

2000 yılında, Ruvkun laboratuvarı tarafından *C. elegans*'ta gelişim zamanlamasını kontrol eden *let-7* gen (23) ürünü olan ikinci küçük RNA tanımlanmıştır. *lin-4* RNA gibi 21 nükleotidli *let-7* RNA'nın da çift sarmallı bir saç tokası (hairpin) öncülünden sentezlendiği düşünülmüştür (24). Gelişimsel zamanlamada düzenleyici rolü olan *lin-41*'in 3'UTR'sindeki bir dizi, *let-7* gen ürününün tamamlayıcısıdır ve *let-7*'nin işlevinin, *lin-41* mRNA 3'UTR'sine doğrudan bağlanmak ve *lin-41* ekspresyonunu inhibe etmek olduğu düşünülmüştür (25). Solucanlardaki kısmi baz eşleşmesi yoluyla genleri hedef alan bu küçük RNA'ların iki farklı örneği, gen regülasyonuna yeni bir anlayış getirmiştir (24). Kısa *lin-4* RNA, mikroRNA'lar veya miRNA'lar olarak adlandırılan çok sayıda küçük düzenleyici RNA sınıfının kurucu üyesi olarak kabul edilmektedir (26-29). Fonksiyonel çalışmalar, miRNA'ların hemen hemen her fizyolojik süreçte yer aldığını ve dolayısıyla miRNA düzensizliklerinin insandaki pek çok patolojik süreç ile bağlantılı olduğunu göstermiştir (30). Protein translasyonunun inhibisyonu veya mRNA bozulmasının teşvik edilmesi yoluyla miRNA'lar, hücre farklılaşması ve proliferasyonu ve büyüme, apoptoz, anjiyogenez, inflamasyon, redoks sinyali ve diğer endotel fonksiyonlar gibi fizyolojik ve patolojik pek çok süreçte rol oynamaktadırlar (24, 26, 31, 32). miRNA'ların çeşitli biyolojik aşamaların anomalilerinin başlangıcında ve ilerlemesinde rol oynadığına dair ortaya çıkan kanıtlarla birlikte son birkaç on yılda miRNA temelli tedavilere büyük bir ilgi söz

konusudur (33, 34). miRNA ilişkili gen düzenlemesinin kapsamı ve önemi, daha fazla miRNA ve bunların düzenleyici hedefleri ve işlevleri keşfedildikçe daha çok odak haline gelmektedir.

2.1.2. MikroRNA Ekspresyonu ve Biyogenezi

İstenmeyen genetik materyallerin ve transkriptlerin baskılanması için ökaryotlarda çok sayıda küçük RNA türü evrimleşmiştir (35, 36). Küçük susturucu RNA'ları tanımlayan özellikler ise az sayıda (~20-30) nükleotid içermeleri ve hedeflerine yönlendirdikleri Argonaute (AGO) protein ailesi üyeleriyle ilişkileridir. Tipik olarak hedef genlerin ekspresyonunun azalmasına neden olmaktadır ve bu farklı küçük RNA sınıfları, karmaşık gen regülasyon modellerine rehberlik etmektedirler. RNA sınıfları arasında, biyogenez için gerekli proteinlerde, düzenleyici işlevlerini yerine getiren AGO içeren komplekslerinin yapısında (AGO ve PIWI), gen regülasyon yollarında ve biyolojik işlevlerinde farklılıklar yer almaktadır (35). Hayvan türlerinde, genel olarak susturmayı indükleyen üç küçük RNA grubu eksprese edilmektedir: mikroRNA (miRNA), endojen kısa interfering-small interfering RNA (siRNA) ve PIWI etkileşimli-PIWI interacting RNA (piRNA) (7, 36). Bunlar arasından miRNA'lar, pek çok somatik dokuda baskın olan küçük RNA sınıfını oluşturmaktadır (37).

Biyogenezi zamansal ve uzamsal olarak sıkı kontrol altında olan miRNA'ların düzensizlikleri birçok hastalık, özellikle de kanser ile ilişkilidir (37). MikroRNA biyogenezi, hem nükleer hem de sitoplazmik aşamaları içeren

kompleks bir süreçtir (26). Biyogenez aşamalarındaki farklılıklardan dolayı kanonik ve kanonik olmayan iki farklı yol ile üretilmektedirler (38-41). Kanonik yol, miRNA sentezinin yaklaşık %99'undan sorumluyken kanonik olmayan yolun kalan miRNA sentezinden sorumlu olduğu varsayılmaktadır (37).

İnsanlarda, kanonik miRNA genlerinin çoğu, kodlayan veya kodlamayan transkriptlerin intronlarında yer alırken bazı miRNA dizileri ekzon bölgeleri içinde yer almaktadır (7, 37). MikroRNA kodlayan genler, tek gen (monosistronik) olarak veya bir lokus içindeki miRNA kümesi (polisistronik) bileşeni olarak transkribe edilebilir (42). Bir polisistronik transkripsiyon kümesi içinde yer alan miRNA genleri, farklı 'miRNA ailesine' üye olabilir (43). Aynı 'miRNA ailesi' üyelerinin, genellikle olgun miRNA ile 2-8 nükleotidlik özdeş bir diziye sahip olduğu kabul edilmektedir (44). Aynı kümedeki miRNA'lar, genellikle birlikte transkripsiyona uğrarken her biri posttranskripsiyonel düzeyde ek bağımsız düzenlemelere uğrayabilmektedirler (37). Örneğin, evrimsel olarak korunan kümelerden biri, bilateriyen hayvanların gelişiminde önemli bir rolü olan mir-100~let-7~mir-125 kümesidir (43) ve aralarından let-7 miRNA, embriyonik kök hücrelerde ve memelilerdeki bazı kanser hücrelerinde posttranskripsiyonel olarak baskılanmaktadır (37). Bunun dışında, miRNA genleri kendi veya intron bölgesinde bulunduğu protein kodlayan 'konakçı' genlerin promotörleri aracılığıyla transkribe edilebilmektedirler (42). Bununla birlikte, miRNA genlerinin genellikle çoklu transkripsiyon başlangıç bölgelerine sahip olduğu (45) ve intronik miRNA'ların promotörlerinin bazen 'konakçı' genlerin promotörlerinden farklı olduğu da bildirilmiştir (46).

MikroRNA transkripsiyonu, RNA polimeraz II tarafından gerçekleştirilmektedir ve bu süreç RNA polimeraz II ile ilişkili transkripsiyon faktörleri ve epigenetik düzenleyiciler tarafından kontrol edilmektedir (47, 48). Ek olarak RNA polimeraz III'ün de farklı organizmalarda bazı miRNA transkripsiyonlarında rol oynadığı kaydedilmiştir (49, 50). Kanonik yol ile RNA polimeraz II tarafından miRNA dizilerini içeren birincil miRNA (primary microRNA; pri-miRNA) olarak bilinen transkriptler üretilmektedir (48). Pri-miRNA, olgun miRNA dizisinin de içine dahil olduğu bir kilobazdan fazla nükleotid içeren bir stem-loop şeklindedir. Tipik bir pri-miRNA, 33-35 nt'lik bir gövdeden, terminal bir halkadan ve 5' ve 3' ucundaki tek iplikli RNA (single stranded RNA; ssRNA) segmentlerinden oluşmaktadır (37). Transkripsiyonun ardından, pri-miRNA birtakım olgunlaşma aşamalarından geçmektedir (51). Hem nükleer hem de sitoplazmik aşamalardan oluşan bu kompleks süreçte, spesifik olarak çift iplikli RNA (double stranded RNA; dsRNA) üzerinde etkili olan RNaz III tipi endonükleaz olan Drosha ve Dicer proteinleri rol almaktadır (26, 37, 52). Olgunlaşma süreci, nükleer kompartmanda miRNA prekürsörü veya pre-miRNA olarak bilinen ~60-70 nt'lik stem-loop ara ürünü serbestleştirmek üzere Drosha ile pri-miRNA'nın kırılmasıyla başlamaktadır (52). Drosha proteinin tek bir dsRNA bağlanma bölgesi (dsRBD), substrat ile güçlü etkileşim için gerekli ancak tek başına yeterli olmamaktadır (53). Nükleoplazmada ve nükleolusta yerleşen (54, 55) DGCR8 proteini (omurgasızlarda Pasha olarak bilinen), içerdiği iki dsRBD'si aracılığıyla pri-miRNA'yı tanır (56). Korunmuş C terminal bölgesi aracılığıyla da Drosha ile etkileşime girer (55). Böylelikle Drosha, ek RNA bağlama aktivitesi

gösteren ve temel kofaktörü olan DGCR8 ile birlikte “mikroişlemci kompleksi” oluşturmaktadır (53, 57-59). Mikroişlemci kompleksi, ssRNA segmentleri, ~35 nt uzunluğundaki gövdeyi ve pri-miRNA'nın terminal halkasını tanımaktadır. Bazal bağlantı noktası, bölünme yerini belirlenmede ana referans nokta olarak işlev görmektedir (56, 60); apikal bağlantı noktası, verimli ve doğru pri-miRNA işleme için önemlidir (61, 62). Mikroişlemci kompleks, bazal bağlantı noktasından ~11 nt ve apikal bağlantı noktasından ~22 nt ölçer ve Drosha bu noktadan pri-miRNA'yı parçalar (56, 61).

Bu ilk işlemde sonra, pre-miRNA'lar olgunlaşmalarının tamamlanabilmesi için exportin 5 (EXP5) proteini ve GTP-bağlayıcı nükleer protein RAN•GTP'den oluşan ‘taşıma kompleksi’ aracılığıyla sitoplazmaya aktarılır (63, 64). EXP5 proteini, yalnızca pre-miRNA'nın sitoplazmaya taşınmasına aracılık etmekle kalmayıp serbest pre-miRNA'yı nükleer alanda yıkımdan da korumaktadır (65). Taşıma kompleksinin, nükleer por kompleksten geçişini takiben, GTP hidrolize olur, bu da taşıma kompleksinin çözülmesine ve pre-miRNA'nın sitozole salınmasına neden olmaktadır (65). Sitoplazmaya aktarıldıktan sonra, pre-miRNA, Dicer tarafından terminal halkanın yakınında bölünerek küçük bir RNA duplesi şeklinde serbest bırakılır (66-70). Üretilen küçük miRNA duplesi daha sonra RNA kaynaklı susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex, RISC) adı verilen efektör bir kompleksi oluşturmak üzere bir AGO proteinine yüklenir (71-73). RISC kurulumu iki adımı içerir: RNA duplesinin yüklenmesi ve ardından çözülmesi (74). RISC'yi uygun mRNA hedeflerine yönlendirmek üzere (73, 75-77) RNA duplesinin yüklemesinin ardından oluşan pre-RISC kompleksi, olgun bir RISC

oluşturmak için “yolcu zinciri (miRNA*)” hızla uzaklaştırır. Geride kalan "kılavuz zincir", genellikle çok daha yaygınken (toplamın ortalama %96-99'u); biyolojik olarak daha aktif olan, uzaklaştırılan yolcu zincirdir (37).

Drosha tarafından pri-miRNA'nın tanınması, ardından bölünmesiyle başlayan ve pre-miRNA yapılarının oluşmasını sağlayan kanonik yolun aksine, **kanonik olmayan yolda** dallanmış intronlar, Drosha aracılı bölünme olmaksızın miRNA processing yoluna girmek için pre-miRNA'ların yapısal özelliklerini taklit etmektedir (38, 39). Konakçı genler tarafından kodlanan mRNA'nın splicingi sonucunda elde edilen bu yoldaki pre-miRNA'lar/intronlar **mirtronlar** olarak adlandırılmaktadır (39).

Alternatif yolların varlığı, miRNA biyogenezinin evrimsel süreçteki farklı gelişimini yansıtmaktadır. Fonksiyonel miRNA'ların büyük çoğunluğunun biyogenezleri için kanonik yolu takip etmesi ve korunmuş miRNA'ların (örneğin, MIR320 ve MIR451) sadece yaklaşık %1'inin omurgalılarda Dicer veya Drosha'dan bağımsız olarak üretilmesi dikkate değerdir. Diğer kanonik olmayan yoldan gelen miRNA'lar daha az orandadır ve korunmaları yetersizdir. Bu nedenle, kanonik olmayan yol ile sentezlenen miRNA'ların fonksiyonel uygunluğu dikkatle yorumlanmalıdır (37).

2.1.3. MikroRNA Moleküler Etki Mekanizması

RNA susturmada miRNA'lar, hedef mRNA'ları ile baz eşleşmesi yoluyla kılavuz işlevi görürken; RISC bileşeni AGO proteinleri, translasyon inhibisyonunu, mRNA deadenilasyonunu ve mRNA bozulmasını indükleyen faktörleri toplayan efektörler olarak işlev görmektedir (78).

Genellikle, hedef mRNA'ların 3' UTR'sinde miRNA bağlanma bölgeleri bulunmaktadır (44). Daha nadiren de miRNA'lar işlevlerini, hedef mRNA'ların 5' UTR (79), ORF (open reading frame) (80) ya da promotör (81) bölgelerine bağlanarak yerine getirmektedirler. İnsanda protein kodlayan genlerin %60'ından fazlası en az bir korunmuş miRNA bağlama bölgesi içermektedir. miRNA'ların “çekirdek dizisi (seed)” olarak ifade edilen 2-8 nükleotid uzunluğundaki ana dizileri, hedef mRNA'ya tam uygunluk göstererek bağlanmayı sağladıkları için büyük önem taşımaktadır. Bununla birlikte miRNA downstream nükleotidleri de hedef mRNA ile baz eşleşmesine katkıda bulunmaktadır (37, 82). Hedef mRNA'nın direkt bölünmesi veya protein sentezinin bir şekilde inhibisyonu, miRNA'lar ile hedeflerinin 3'UTR bölgeleri arasındaki uygunluk derecesine bağlıdır (26). MikroRNA ve hedefi 3' UTR arasındaki tam veya tama yakın uygunluk olması, hedef mRNA'yı parçalamak üzere RISC'yi indüklemektedir. Hatalı baz eşleşmesi ise temelde hedef mRNA'nın translasyonel susturulmasını indüklemektedir; aynı zamanda hedef mRNA miktarını da azaltabilmektedir (83). MikroRNA'ların, mRNA stabilitesini etkilemeden protein seviyelerini azalttığı önerisi ilk kez, Ruvkun laboratuvarı tarafından lin-4 aracılı düzenlemenin lin-14 mRNA seviyelerinde gözle görülür bir değişiklik olmaksızın LIN-14 protein miktarını

önemli ölçüde azalttığının gösterilmesi üzerine öne sürülmüştür. Zaman içinde memeli hücre kültüründe yapılan çalışmalar bu model için daha fazla destek sağlamıştır. Hedef mRNA deadenilasyonu yoluyla translasyonun engellenebileceği, translasyon başlangıcının bloke edildiği ya da translasyon başlangıcından sonraki adımların hedeflenmesi gibi etki mekanizmaları miRNA ilişkili susturma için önerilmiştir (84). Son zamanlardaki çalışmalar, translasyona uğramamış mRNA'lar içeren ve mRNA bozunma bölgeleri olarak hizmet edebilen, P-cisimleri (Processing bodies, PB) olarak anılan, spesifik sitoplazmik odakların varlığını ortaya çıkarmıştır (85) ve bir dizi posttranskripsiyonel düzenleyici yol, PB'lere bağlanmıştır (86). Etkilenen mRNA'ların yanı sıra miRNA düzenleyici sistemin protein bileşenlerinin de sitoplazmik granüler PB'ler içinde biriktiği gösterilmiştir (85, 87). Bu durum da ribozomlardan ve başlatma faktörlerinden yoksun olan PB'lerin, hedef mRNA'nın yeniden konumlandırılmasını ve inhibisyonu başarmanın bir yolu olabileceği ihtimalini artırmıştır (88).

2.2. Plasenta Gelişimi ve Fizyolojisi

2.2.1. Blastosist İmplantasyonu

Plasenta, embriyo ve fetüs gelişimi, fertilizasyon ile başlayan devamlı bir süreçtir. Fertilizasyondan sonraki 1 ile 3. günlerde fallop tüpü içinde gelişen “zigot”, takip eden 4. günde “morula” formasyonunda uterin kaviteye ulaşmaktadır. Beşinci günde, morula içinde sıvı birikimi ve hücrelerin polarizasyonu ile “blastosist” halini almaktadır. Blastosist, plasenta ve fetal zarları oluşturacak bir dış

hücre tabakasına (trofoblast), embriyoyu oluşturacak bir iç hücre tabakasına ve sıvı dolu bir boşluğa sahiptir. Altıncı günde, büyümenin devamlılığı için gerekli olan substratlara erişim sağlayan maternal endometriuma blastosist implantasyonu gerçekleşmektedir. İmplantasyon terimi, blastosistin uygun bir uterin konuma hareketini, adhezyonunu ve invazyonunu kapsamaktadır (89). Blastosistin uygun uterin konuma adhezyonunu takiben, son derece hızlı trofoblast proliferasyonu başlar ve trofoblast hücreleri, maternal uterin stromayı istila eden multinükleer sinsityotrofoblastları oluşturmak üzere hücreler füzyona uğramaktadır. Sinsityotrofoblastlar multifonksiyonel hücrelerdir; ancak en temel işlevleri: emilim, değiş tokuş ve özel hormonal fonksiyonlardır (90).

2.2.2. Plasenta Gelişimi

İnsan plasentasının gelişimi, blastosistin implantasyonu ile başlamaktadır (91). İnsan plasentası, gebeliğin yaklaşık 21. gününde kesin yapısı ortaya çıkan (90), doğumdan sonra uterustan atılan, normal gelişimi sağlamak için gerekli ve gebelik ilerledikçe değişen birçok işlevden sorumlu fetal bir organdır (92).

Erken gebelikte, plasantanın birincil rolleri arasında maternal endometriuma invazyon, maternal vasküler sistemi yeniden şekillendirmek ve gebeliği sürdürmek için önemli olan hormonları salgılamak yer almaktadır. Plasenta, fetüse kan akışını ve besin dağıtımını düzenlemektedir (92). Maternal-fetal değişim, maternal ve fetal kanı bölümlere ayıran multinükleer sinsityotrofoblast tabakası tarafından çevrelenen sitotrofoblast hücrelerinin dallanma labirentinde meydana gelmektedir

(93). Labirent, trofoblastik dev hücreler ve spongiotrofoblastik hücreler içeren bir bağlantı bölgesi ile maternal desiduadan ayrılmaktadır. İnsanlarda plasental villus doğrudan maternal kana uzanmaktadır. Bu villuslar, ekstravillöz sitotrofoblast hücreleri tarafından maternal desiduaya bağlanan bir sinsityotrofoblast tabakası ve villöz sitotrofoblast hücrelerinden oluşmaktadır (93).

Fetüse kan akışını ve besin dağıtımını düzenlemek dışında plasenta, fetüsü olumsuz çevresel etkilerden korumaktadır ve genellikle birden fazla organın (akciğer, beyin, böbrek, bağışıklık sistemi vb.) işlevini de yerine getirmektedir (92). Bu fetal organ, hücre biyolojisi ve gelişimi ile endokrinoloji, immünoloji ve anjiyogenez dahil olmak üzere biyolojinin çeşitli yönleri için bir model olarak kullanılmıştır (90).

2.2.3. Plasentogenezde Aktivatör ve İnhibitör Etkili miRNA'lar

MikroRNA'lar, anne ve fetus hastalığına ve sağlığına ilişkin plasental fonksiyonun, şüphesiz, en iyi çalışılmış epigenetik düzenleyicileridir (94). İnsan plasental dokusunda eksprese edilen birçok miRNA tanımlanmıştır (95). Ek olarak, miRNA biyogenezi için gerekli çekirdek proteinler, villöz trofoblast hücrelerinde de tespit edilmiştir (96). Kanonik miRNA biyogenezinde rol alan Dicer ve Drosha enzimlerinin germline eksikliğinin erken embriyogenezde ölüme neden olduğu bildirilmiştir (97, 98). Dicer ve Drosha eksikliğinin neden olduğu özdeş fenotiplerin bulunması, bu iki enzimin aynı yolda işlevi olmasıyla tutarlıdır ve implantasyon sonrası embriyoda miRNA'lara ihtiyaç olduğunu göstermektedir (98). Benzer

şekilde, Dgcr8 knock-out fare embriyolarında, gelişiminin erken aşamalarda durduğu ve knock-out embriyonik kök hücrelerde proliferasyon ve diferansiyasyon kusurları olduğu gösterilmiştir (99). İnsanlarda ise *DGCR8*'i içeren genomik bölgenin delesyonu, DiGeorge sendromu ile ilişkilendirilmiştir (100, 101).

In vitro çalışmalar ile miRNA'ların trofoblastik hücre proliferasyonunu, migrasyonunu, invazyonunu, apoptozunu ve anjiyogenezi düzenlediği de gösterilmiştir (9, 11, 102-104). Riskli gebelikleri olan kadınlarda, plasentada miRNA'ların anormal ekspresyonu bildirilmiştir (105, 106). Bu nedenle, plasentanın normal gelişiminde miRNA'ların gerekli olması, anormal miRNA ekspresyonunun ise hatalı plasantasyon ve riskli gebeliklerle ilişkili olması muhtemeldir (94, 107).

Bu doğrultuda yapılan bir çalışmada, embriyogenezde kritik rolü olan transforming growth factor- β (TGF- β) süper ailesinin (108-110) bir üyesi olan Nodal'ın miRNA'lar tarafından düzenlenmesi incelenmiştir (11). Beşinci kromozomun uzun kolunda (5q32) yer alan *PPARGC1B* geninin ilk intronunda MIR378 ailesinin iki üyesinden biri olan **MIR378a-5p**'nin (111), Nodal'ı hedefleyerek trofoblastik hücre sağ kalımını, proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu destekleyebileceğine dair kanıtlar sağlanmıştır. Ayrıca, plasental **MIR378a-5p** ekspresyon seviyelerinin gebelik evrelerine göre değiştiği ve preeklampsi (PE) ile tehlikeye giren gebeliklerde disregülasyon olduğu gösterilmiştir (11). Plasental gelişimde aktivatör etkili bu **MIR378a-5p**, kolon kanser hücre hattında da overeksprese edilerek bu dokularda gelişen trizomi ve tetrazomi gibi sayısal kromozomal anomaliler ile ilişkilendirilmiştir. Aynı

çalışmada hem kontrollerde hem de **MIR378a-5p** overekspresyonu olan HCT-116 (insan kolon kanser hücre hattı) hücrelerinde nullizomi ve monozomi ise daha az sıklıkta görülmüştür (112).

NCBI referans sekansına (NR_029861.1) göre **MIR376c**, kromozom 14q32.31'de yerleşmiş olup plasentada, gelişmekte olan embriyolarda ve erişkin dokularda eksprese edilen C14MC gen kümesinin bir üyesidir (113). İnsan plasentasında yüksek oranda eksprese edilen C14MC gen kümesi, anneden genomik baskılanan (maternal imprinted) genler tarafından kodlanmaktadır (114). Imprinted genlerin insan embriyonik gelişiminde rol oynadığı ve hücrel farklılaşma ve prognozunun düzenlenmesinde önemli roller oynadığı bilinmektedir (115). Embriyogenezde kritik rolü olan TGF- β /Nodal sinyal yolağının miRNA'lar tarafından düzenlenmesine ilişkin bir çalışmada trofoblastik dokuda **MIR376c** ekspresyon seviyeleri çalışılmış ve **MIR376c**'nin, trofoblastik hücre aktivitesini nasıl düzenlediğinin ve PE patogenezinin nasıl katkıda bulunabileceğinin daha da netleştirilmesi amaçlanmıştır. **MIR376c**'nin, TGF- β ve Nodal sinyalini bozmak üzere reseptörlerini (sırası ile ALK5 ve ALK7) kısmen baskılayarak trofoblastik hücre proliferasyonunu, sağ kalımını, migrasyonunu ve invazyonunu desteklediği gösterilmiştir (103).

TGF- β /Nodal sinyali üzerinden trofoblastik hücre migrasyonunu ve invazyonunu desteklediği bilinen bir diğer miRNA ise 17p13.1'de yer alan MIR15 gen kümesi üyesi **MIR195**'tir (9, 116). **MIR195** bu etkisini, Nodal dahil olmak üzere TGF- β süper ailesinin birkaç üyesinin ortak reseptörü olan, ActRIIA'nın (117) ekspresyonunu düzenleyerek göstermiştir. **MIR195**'in anormal ekspresyonu,

insan plasentasında ActRIIA'nın aracılık ettiği Activin/Nodal sinyalleşmesine müdahale ederek PE oluşumuna katkıda bulunabileceği öne sürölmüşür (9).

MIR34a, birinci kromozomun kısa kolunda (1p36.22) çok sayıda kanserle ilişkili bir bölgede kodlanmaktadır. **MIR34a**'yı kodlayan birincil transkript iki ekzona sahiptir. İlk ekzon, olgun **MIR34a** dizisinin yaklaşık 30 kb upstreaminde bir CpG adası (sitozin-fosfat-guanin bölgeleri) içinde p53 için bağlanma bölgesi bulunmaktadır. İkinci ekzon ise prekürsör **MIR34a** sekansını içermektedir (118, 119). Birincil transkript ve promotör yapısı göz önünde bulundurulduğunda **MIR34a**'nın, doğrudan p53 tarafından transaktive edildiği ve p53 tarafından başlatılan gen ekspresyon programının önemli bir bileşeni olduğu gösterilmiştir. **MIR34a**'ya yanıt veren genler arasında hücre döngüsünü, apoptozunu, DNA onarımını ve anjiyogenez basamağını kontrol eden transkriptler oldukça fazladır (118). Bununla birlikte farklı biyolojik yollarda **MIR34a** için başka direkt hedefler de bildirilmiştir (120). Örneğin, **MIR34a** plasenta vaskülarizasyonu ve gelişimi için önemli olan Notch sinyal yolağında (121, 122) yer alan, DLL1 (delta-like protein) proteinini inhibe ederek Notch sinyalini bozabilmektedir (120). Proliferasyon üzerindeki inhibisyon etkisi iyi bilinen **MIR34a**'nın, migrasyon ve invazyon üzerindeki inhibisyon etkisi de hepatosellöler kanser hücreleri üzerinde yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (123). Ardından Pang ve ark., **MIR34a**'nın Jagged1 ve reseptörü Notch1'in ekspresyonunu düzenlediğini ve **MIR34a**'nın zorlanmış ekspresyonunun Jagged1 ve Notch1 ekspresyonunun inhibisyonu yoluyla trofoblastik hücrelerin invazyon kapasitesini azalttığını göstermişlerdir (124). **MIR34** ailesinin ve MIR195 kümesinin de içinde bulunduğu bir grup

miRNA'nın ekspresyon seviyelerinin üçüncü trimester plasentalarında önemli ölçüde artmış olduğu tespit edilmiştir (125).

MikroRNA'ların hipoksik yanıtta da yer aldığı ve biyolojik olarak önemli genlerin düşük oksijen gerilimi ile baskılanmasına katkıda bulunduğu çok sayıda çalışma ile gösterilmiştir (96, 126-131). HIF-1 α , oksijen stresine yanıt olarak hücrel metabolizmayı düzenleyen önemli bir transkripsiyon faktörüdür (132) ve HIF-1 α transkripsiyonel regülasyonuna duyarlı olan miRNA'lara '*hipoksamiR*' denilmektedir (133). **MIR210**, hipoksida çeşitli fonksiyonların kontrolünde rol oynayan ana hipoksamirdir (134). **MIR210** geni, düşük oksijen konsantrasyonu ile düzenlenmesiyle tutarlı şekilde hipoksi ile indüklenebilir *AK123483* geninin intronunda yer almaktadır (127). Birçok farklı hücre tipinde hipoksiye yanıt olarak **MIR210** ekspresyon düzeyi artmaktadır (134). İlk trimester plasentasında da artan **MIR210** ekspresyonu, erken plasental gelişimde fizyolojik bir hipoksik durumu yansıtmaktadır. **MIR210**'nun da dahil olduğu, ilk trimester plasentalarında baskın olarak eksprese edilen miRNA'lar, onkogenez/anjiyogenez ve doku remodellingi ile ilişkilendirilmektedir (125). Hipoksik şartlar altında kültürlenmiş trofoblastlarda **MIR210** ekspresyonunun arttığı (135, 136) ve artmış **MIR210** seviyelerinin, trofoblast hücrelerinin migrasyonunu ve invazyonunu engellediği de bildirilmiştir (136).

Farklı gebelik evrelerinde miRNA'ların ekspresyon profillerinde değişiklikler görülebilmektedir (137). Onkojenik, anjiyojenik ve antiapoptotik özellikler sergileyen miRNA'lar birinci trimester plasentalarında baskın olarak eksprese edilirken, hücre farklılaşmasını destekleyen ve tümör supresör olarak işlev

gören miRNA'lar üçüncü trimester plasentalarında güçlü bir şekilde eksprese edilir (125). Literatürde farklı çalışmalarda bazı aynı miRNA'lar için birbiri ile çelişkili ekspresyon seviyeleri bildirilmektedir. Örneğin, ciddi PE'li kadınlardan alınan plasental örneklerde mikroyarray analizini takiben kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR) ile MIR195 seviyeleri değerlendirilmiş ve belirgin şekilde artış görülmüştür (138). Diğer çalışmalar, preeklampitik gebeliklerde MIR195'te bir azalma olduğunu göstermiştir (9, 138). Bu tutarsızlıkların, saptama yöntemlerinin duyarlılığındaki farklılıktan, kullanılan örneklerin farklı gebelik evrelerinden elde edilmesinden ve/veya bireysel farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Ayrıca, sıklıkla plasentanın yalnızca küçük bir kısmı kullanılarak RNA eldesi söz konusu olduğundan plasenta içindeki numune alma bölgeleriyle de ilişkilendirilmektedir (139). Başka bir çalışmada, plasental miRNA'ların, gebelik evrelerine göre miRNA ekspresyon profilindeki farklılığını incelemek üzere plasental örneklerde MIR378a-5p ve MIR376c çalışılmıştır. Birinci ve ikinci trimesterde MIR378a-5p düzeylerinin, üçüncü trimestere göre daha yüksek olduğu (11); aksine MIR376c düzeylerinin, ikinci ve üçüncü trimesterlerde birinci trimestere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (103). Birinci ve üçüncü trimester trofoblast hücrelerinin miRNA profilini farklı trofoblastik hücre hatlarınıninkiyile karşılaştırmayı amaçlayan başka bir çalışmada, C14MC içindeki miRNA'ların ekspresyonunun, birinci trimesterden üçüncü trimestere ilerledikçe azaldığı gösterilmiştir (137). Bu durumda, plasental MIR376c düzeylerinin üçüncü trimesterde birinci trimestere göre daha yüksek olduğu bulgusu ile çelişen sonuçlar

alınmıştır. Bu çelişkinin, iki çalışma arasında RNA ekstraksiyonu için farklı materyallerin kullanılmasından ve/veya kullanılan hücre hatlarının farklılığından (plasental doku örnekleri/ saflaştırılmış trofoblast hücrelerinin primer kültürleri) kaynaklanıyor olabileceği düşünülmüştür (139).

Farklı gebelik evrelerinde miRNA'ların farklı ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi, miRNA'ların gelişimsel olarak düzenlendiğini ve gebelik sırasında evreye özgü işlevleri olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte, plasentadaki her bir miRNA'nın uzaysal ve zamansal ekspresyon modelini tam olarak karakterize etmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Bu çalışmalar ile miRNA'ların uzaysal ve zamansal ekspresyon modelinin anlaşılması, bu miRNA'ların tanı belirteçleri olarak klinik kullanımını veya terapötik ajanlar olarak manipüle etmenin yollarını araştırmayı beraberinde getirmesi olası görünmektedir.

2.3. Gebelik Kaybı Etiyolojisi

Gebelik kaybı (düşük), fetüsün yaşayabilir duruma erişmeden önce gebeliğin kendiliğinden sonlanması olarak tanımlanır. Bu nedenle terim, konsepsiyondan itibaren 24. gebelik haftasına kadarki tüm gebelik kayıplarını içermektedir. Yenidoğan bakımındaki ilerlemeler, 24. gebelik haftası civarında doğan az sayıda bebeğin hayatta kalmasını sağladığı için (140) bu tanımlar, ülkeler arasında farklılık gösterebilmektedir. Genel kabul gören tanımlama ise intrauterin

hayatta 20. gebelik haftası ve öncesi dönemde gebelik materyalinin canlılığını kaybetmesidir.

Amerikan Obstetri ve Jinekoloji Derneği (ACOG) kendiliğinden düşükleri, gebelik kayıplarının en yaygın şekli olarak bildirmektedir. Gebeliklerin yaklaşık %20'sinde 20. gebelik haftası öncesi vajinal kanama görülür ve bu vakaların %50'sinde kendiliğinden düşük meydana gelmektedir (141). Klinik olarak tanımlanan gebeliklerin %10-20'sinin erken gebelik kaybıyla sonuçlandığı düşünülmektedir (142). Bir kadın gebe olduğunu anlamadan önce, ağır ve geç bir adet kanaması ile gebeliğini kaybedebileceği göz önüne alındığında, bu oranların daha da yüksek olması muhtemel görünmektedir. Bir çalışmada, serum insan koryonik gonadotropin (hCG) ölçümleri ile takip edilen kadınlar arasında, klinik olarak tanımlanan spontan abortuslar da dahil olmak üzere, implantasyon sonrası toplam gebelik kaybı oranı %31 olarak bulunmuştur (141).

Kromozomal anomaliler, spontan abortusların doğrudan bir nedenidir (143). Maternal hücrelerin kontaminasyonu ekarte edilerek, kromozomal mikroarray analizi (CMA) ile tanımlanan genetik anomaliye sahip gebelik kayıplarının oranının, farklı gelişim evrelerindeki gebeliklerde önemli ölçüde farklılık gösterdiği görülmüştür. Pre-embriyonik (ultrason muayenesinde görünür embriyo olmayan) kayıplarda genetik anomalilerin prevalansı oldukça düşük (%9,1) iken embriyonik (6-10 haftalık gebelik) kayıpların %50'sinden fazlasında ve erken fetal (10-20 haftalık gebelik) kayıpların neredeyse üçte birinde genetik anomali saptanmıştır (4). Prevalans, gebelik haftasına göre değişmekle birlikte 20. haftadan önceki gebelik kayıplarının yarısından fazlasında kromozomal anomali

saptanmaktadır (4, 144-146). Bunlardan en yaygın olanları otozomal trizomiler, monozomi X ve poliploidiler oluşturmaktadır (147, 148).

Bu projede kendiliğinden düşüğe ait küretaj ile elde edilmiş trofoblastik doku örneğinde sık karşılaşılan otozomal trizomi (trizomi 16, trizomi 21, trizomi 22), monozomi X ve triploidi saptanmış (fetal doku lehine anomalili sonuçlar) olgular çalışma grubu olarak seçilmiştir. Fetal doku lehine seçilen bu plasental örneklerde (trofoblastik dokularda) plasenta gelişiminde aktivatör etkili **MIR378a-5p**, **MIR376c** ve **MIR195** ile inhibitör etkili **MIR34a** ve **MIR210**'un ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Böylece ekspresyon farklılıklarının varlığına veya yokluğuna göre, inhibitör veya aktivatör miRNA ekspresyonlarının normal karyotipli ve/veya anomalili karyotipli düşük gelişimine katkısı değerlendirilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Katılımcılar ve Örnekler

Bu çalışmaya dahil edilen hastalar, son üç yılda Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi'nde spontan abortus nedeniyle tıbbi terminasyon yapılmış ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı sorumluluğundaki Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi'mize (GHDM) düşük etiyolojisi açısından yönlendirilmiş kadınlar arasından seçilmiştir. Bu kadınların tamamının spontan abortustan birkaç gün önce ultrason taraması ile fetal kalp atımı (FKA) pozitif olarak değerlendirilmiştir. Örnekler kabul edilmeden önce kendilerinden veya birinci derece yakınlarından önceki gebelik sayısı, ölü doğum sayısı ve önceki düşük sayısı

gibi bilgileri içeren obstetrik öyküleri sorgulanmıştır (**Tablo 1** ve **Şekil 1**). Düşük materyallerinden öncelikle düşük etiyojisini araştırmak amacıyla karyotip analizi yapmak üzere uzun dönem doku kültürü kurulmuştur. Eş zamanlı olarak direkt trofoblastik doku örnekleri kültüre edilmeksizin -80 °C’de muhafaza edilmek üzere ayrılmıştır. İlk basamak konvansiyonel sitogenetik analizi tamamlanmış ve muhafaza edilen kültüre edilmemiş trofoblastik dokusu bulunanlar arasından kontrol ve çalışma grubu oluşturulmuştur.

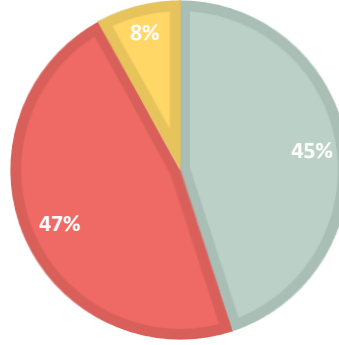
Tablo 1. Sitogenetik anomalilerin maternal yaşa göre gruplar arasında dağılımı

Maternal yaş (yıl)	Materyal sayısı (n)	Karyotip					
		T16 (n)	T21 (n)	T22 (n)	MX (n)	Triploidi (n)	46, XY (n)
<25	13	1	1	0	4	1	6
25-29	22	2	1	2	4	4	9
30-34	32	4	2	1	3	8	14
≥35	33	5	4	6	3	2	13
	TOPLAM	12	8	9	14	15	42

T16: Trizomi 16, T21: Trizomi 21, T22: Trizomi 22, MX: Monozomi X

ABORT SAYISININ VE YÜZDESİNİN DAĞILIMI

■ 1 ■ 2 veya 3 ■ 4 ve üzeri



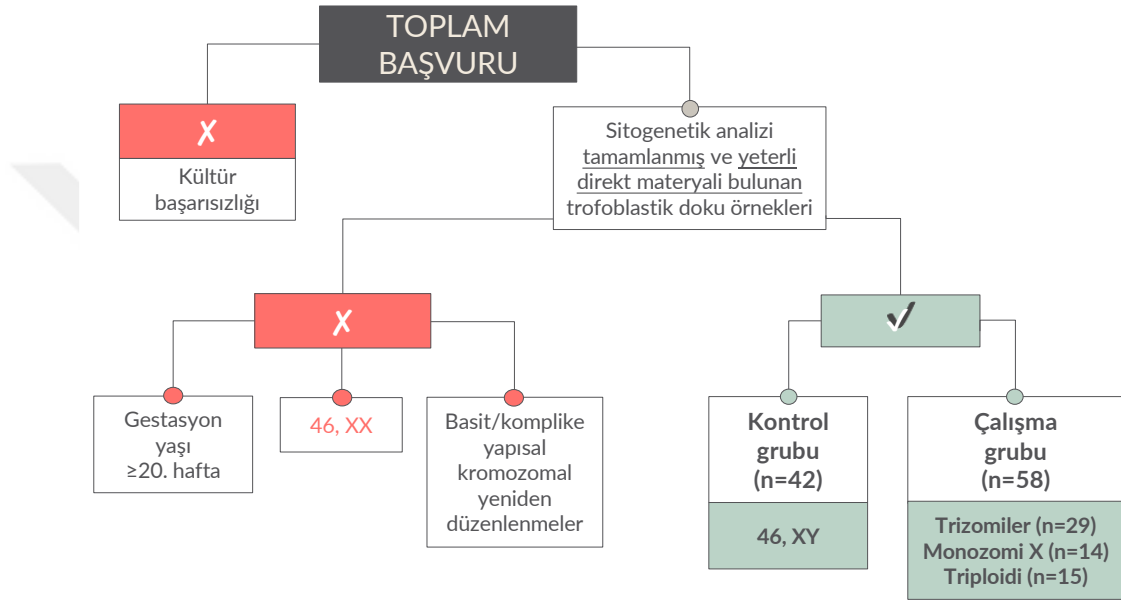
Şekil 1. Tüm çalışma grubundaki spontan abortus sayıları ve yüzdeleri.

Düşük materyalinde sitogenetik analizi tamamlanan ve sonucunda sayısal kromozomal anomali (anöploidi/triploidi) belirlenen kadınlar (n=58) **çalışma grubu** olarak seçilmiştir. Bu gruptaki kadınların yaş ortalaması 32 yıl (20-44) ve gestasyon yaşı ortalaması 64,6 gün olarak belirlenmiştir. Karyotip sonucuna göre çalışma grubu içerisindeki sayısal kromozomal anomalilerin dağılımı: 15 adet triploidi, 14 adet monozomi X, 12 adet trizomi 16, 8 adet trizomi 21 ve 9 adet trizomi 22'dir. Monozomi X (MX) dışlanarak sayısal anomaliye sahip trofoblastik dokulardaki erkek cinsiyetinin 20 örnekte bulunduğu görülmüştür (Şekil 3).

Kontrol grubu, düşük materyalinde karyotip analizi tamamlanmış ve fetal dokuyu yansıtan erkek cinsiyette normal karyotip saptanmış hastalardan (n= 42) oluşturulmuştur. Kontrol grubundaki kadınların yaş ortalaması 32.1 yıl (22-44) ve gestasyon yaş ortalaması 63,01 gün olarak hesaplanmıştır.

Tüm kadınların gebelik haftaları son adet tarihi ve/veya ultrason ile doğrulanmış haftaları esas alınarak kaydedilmiştir. Gebeliğin intrauterin 20.gebelik haftası sonrası dönemde canlılığını kaybettiğini beyan eden hastalar ile rutin

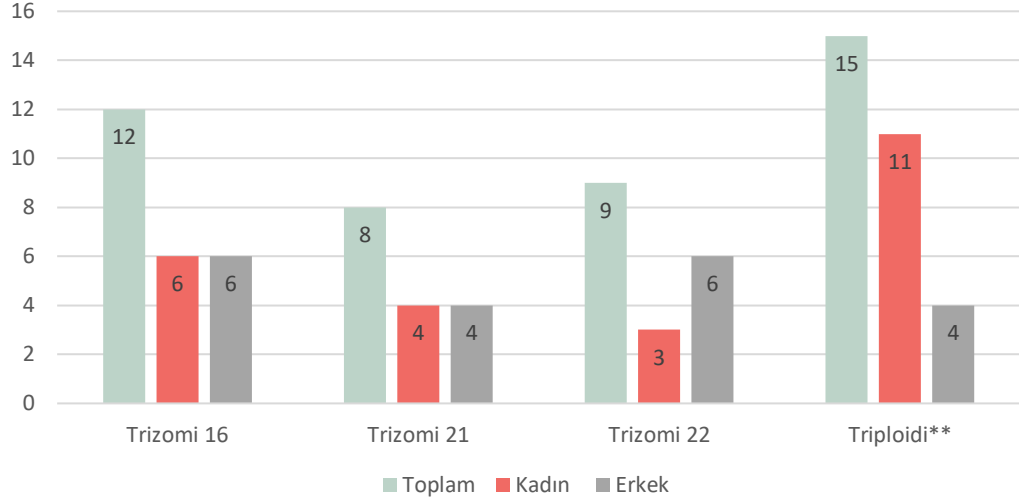
sitogenetik analiz ile maternal-fetal ayrımı yapılamayan 46,XX karyotipe sahip hastalar ile basit/komplike yapısal kromozomal yeniden düzenlenmelere sahip hastalar çalışma dışı bırakılmıştır (Şekil 2).



Şekil 2. Spontan abortus etiyojisi için GHDM’e refere edilen tüm trofoblastik doku örneklerinden bu çalışma için belirlenen işleme ve dışlama kriterleri. Dışlama kriterleri uyarınca çalışmaya dahil edilmeyen dokular “X” işareti ile belirtilen kutucuklarla temsil edilmiştir. İşleme kriterleri uyarınca çalışmaya dahil edilen dokular “✓” işareti ile belirtilen kutucuklarla temsil edilmiştir.

Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezimize refere edilen her bir hasta, laboratuvarında çalışılacak materyali/dokusu konusunda bilgilendirildikten sonra uygun olan onam formunu imzalamaktadır. Ekte abort materyali için hastalara imzalatılan onam formu sunulmaktadır (Ek-1). Hastalara ayrıca bu çalışma için hazırlanmış olan “girişimsel olmayan klinik araştırmalar için bilgilendirilmiş gönüllü olur formu” (BGOF) hakkında bilgilendirilme yapılmış ve bu formu da imzalamaları talep edilmiştir (Ek-2).

Çalışma grubu içindeki cinsiyet dağılımı



Şekil 3. Çalışma grubu içindeki cinsiyet dağılımı*

*Monozomi X tanılı dokular grafikte yer almamaktadır.

**Triploidik dokularda Y kromozom varlığı esas alınarak sayı belirtilmiştir.

3.2. Deneysel Basamaklar

3.2.1. Trofoblastik Dokulardan Sitogenetik Analiz

Trofoblastik doku örneklerinin uzun dönem doku kültürü, harvest, G-bantlama ve karyotip analizi aşamaları, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı sitogenetik laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Vakumlu küretaj ile toplanmış trofoblastik doku örnekleri doku kültür medyumunu içeren transport sıvısı içerisinde tarafımıza ulaştırılmıştır. Maternal desidual dokular, dikkatli bir şekilde ayrılarak, materyaller görünür kan pıhtılarından da arındırılmıştır. Karyotip analizi için gerekli miktarın dışında kalan doku örnekleri 2 mL'lik ependorflara aktarılmıştır.

3.2.2. Dokuların Saklanması

Direkt trofoblastik doku örnekleri, kültüre edilmeksizin ve herhangi bir kimyasal uygulanmaksızın -80 °C’de dondurularak saklanmıştır. Örnekler, hastaların kimlik bilgileri belirtilmeksizin kodlanmıştır.

3.2.3. İzlenen Deneysel Basamaklar

Literatür taraması sonucunda çalışma için, plasentogenezde etkili aktivatör ve inhibitör miRNA’lar belirlenmiştir. Aktivatör miRNA’lar **MIR378a-5p**, **MIR376c**, **MIR195** iken, inhibitör etkililer **MIR34a** ve **MIR210**’dur. İlgili miRNA’ların olgun halde ekspresyon seviyelerinin tespiti için öncelikle dokulardan total RNA izole edilmiştir.

3.2.3.1. Dokudan Total RNA İzolasyonu

Kültüre edilmeksizin -80°C’de dondurulmuş direkt trofoblastik dokular, oda sıcaklığında çözündürülmüştür. TRIzol™ Reaktifi (Thermo Fisher, ABD) ile total RNA izolasyonu için 50-100 mg doku örneği kullanılmıştır. Örnekler, mekanik olarak homojenize edilmiş ve 1.5 mL’lik ependorf tüpler içerisine aktarılmıştır. Homojenize edilen dokuya üreticinin talimatlarına göre 1 mL TRIzol™ Reaktifi eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. Faz ayrımı, RNA presipitasyonu, yıkama ve süspansiyon elde etme aşamaları için aşağıda belirtilen aşamalar sırasıyla uygulanmıştır. Bu aşamalarda her bir örnek için kullanılan

kimyasal maddelerin miktarı başlangıçta kullanılan 1 mL TRIzol™ reaktifine göre hesaplanmıştır.

Faz ayrımı aşaması:

1. Faz ayrımı için 1 mL TRIzol™ eklenmiş dokuya 0.2 mL kloroform eklenmiştir.

2. Örnek tüpleri sıkıca kapatıldı ve 15 saniye el ile kuvvetlice sallanmıştır.

3. 15 dakika buzda inkübe edilmiştir.

4. Örnekler, 4°C ve 12.000 x g'de 15 dakika santrifüjlenmiştir.

Santrifüjlemenin ardından karışım üç faza ayrılmıştır. En altta kırmızı fenol-kloroform faz, ortada ara faz ve üstte ise şeffaf faz yer almaktadır. RNA, yalnızca en üst fazda yer almaktadır.

5. En üst faz bir mikropipet yardımıyla ve alttaki fazlara zarar vermeden yeni bir 1.5 mL'lik ependorf tüpe aktarılmıştır.

RNA presipitasyon aşaması:

1. Yeni bir tüpe aktarılan faza 0,5 mL soğuk izopropanol eklenmiştir.

2. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir.

3. 4°C ve 12.000 x g'de 15 dakika santrifüjlenmiştir.

Total RNA presipitatu, tüpün altında beyaz bir pelet oluşturmuştur.

4. Süpernatant bir mikropipet ile uzaklaştırılmıştır.

RNA yıkama aşaması:

1. Pelet üzerine 1 mL önceden soğutulmuş %75 etanol eklenmiştir.

2. Örnek kısaca vortekslenip, ardından 4°C ve 12.000 × g'de 15 dakika santrifüjlenmiştir.

3. Süpernatant mikropipetle uzaklaştırılmıştır.

4. RNA peleti içeren tüp, etanolü uzaklaştırmak üzere 5-10 dakika kapağı açık şekilde bırakılmıştır.

RNA süspansiyonu aşaması:

1. Pelet, gözle görülebilir büyüklüğüne göre 50-100 µL RNaz içermeyen su içinde yukarı ve aşağı pipetleyerek yeniden süspanse edilmiştir.

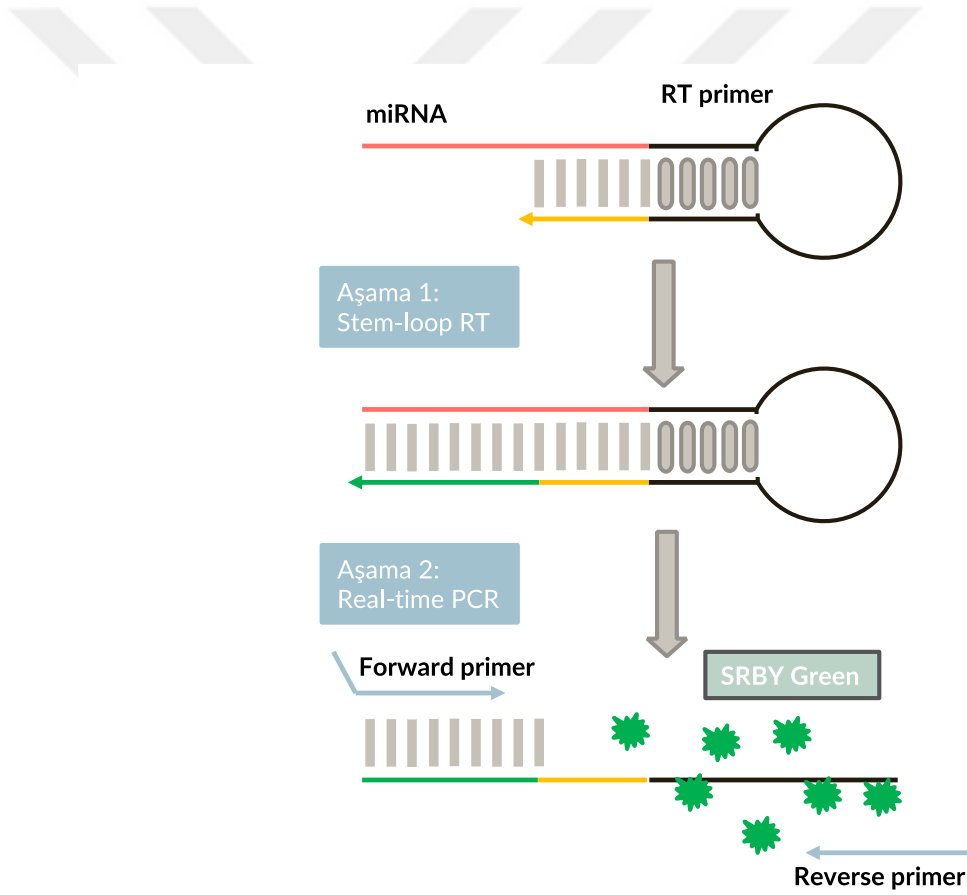
Total RNA eldesi sonrasında kalite kontrolü ve RNA konsantrasyonu NanoDrop™ spektrofotometre (Thermo Fisher, ABD) ile değerlendirilmiştir. RNA integritesi, %1 agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiştir. Elde edilen RNA, komplementer DNA (complementary DNA, cDNA) sentezi için hemen kullanılmayacaksa -80°C'de saklanmıştır.

3.2.3.2. DNaz Uygulaması

İzole edilen total RNA'lara, izolasyon sırasında oluşabilecek DNA kontaminasyonunu ekarte etmek amacıyla DNaz uygulanmıştır. Örnek başına 1 µg total RNA'ya (8 µl) birer µl DNaz tamponu ve DNaz (1 U/µl; Thermo Scientific, ABD) eklenmiştir. Karışım 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, karışıma 1 µl 50 mM EDTA eklenmiş ve 65°C'de 10 dakika inkübasyon ile DNaz inaktif hale getirilmiştir.

3.2.3.3. cDNA Sentezi

Belirtilen miRNA'ların olgun halinin tespiti için Tong ve arkadaşlarının yayınında önerilen yöntem takip edilmiştir (149). Buna göre, cDNA sentezi, sadece olgun miRNA'lara ve internal kontrole bağlanacak ve bu bölgeleri çoğaltacak şekilde loop oluşturabilecek özel primerlerle gerçekleştirilmiştir (**Şekil 4**). cDNA sırasında kullanılan primerler **Tablo 2**'de verilmiştir.



Şekil 4. Sadece olgun miRNA'ların ekspresyon seviyelerini tespit etmeye yönelik primer dizayn yaklaşımı (149).

Tablo 2. Sadece olgun miRNA'ların ters transkripsiyonunu sağlayabilecek özel primerler.

Primer	Sekans
MIR210-cDNA_RP	[5]'GCGTCTCAACTGGTGTCTGGAGTCGG CAATTCAGTTGAGACGCTCAGCCGCTG [3]'
MIR376c-cDNA_RP	[5]'TGATTCTTCTTCGTGTCTGGAGTCGGC AATTGAAGAAGAATCAACGTGGTTAA [3]'
MIR195-cDNA_RP	[5]'ACACCTTGTAATGTGTCTGGAGTCGG CAATTATTACAAGGTGTGCCAATATT [3]'
MIR378a-5p-cDNA_RP	[5]'AGGACAGGGTTAGTGTCTGGAGTCGG CAATTTAACCCTGTCCTACACAGGACC [3]'
MIR34a-cDNA_RP	[5]'TGCAGGTATATGGTGTCTGGAGTCGG CAATTCATATACCTGCAACAACCAGCT [3]'
MIR130a-3p-cDNA_RP	[5]'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACTGGATACGACATGCCCTTTT [3]'

cDNA sentezi için öncelikle, **Tablo 2**'deki primerler, final konsantrasyonları 1.6 μ M olacak şekilde karıştırılmıştır. Primer karışımı, stem-loop yapısı oluşturmak amacıyla (**Şekil 4**) sırasıyla 95, 80, 70, 60, 50, 40, 30 ve 20°C'de 30'ar saniye olacak şekilde inkübe edilmiştir ve +4°C'ye alınmıştır. Daha sonra, DNaz uygulanmış RNA örnekleri (6.25 μ l), 10 mM dNTP karışımı (0.5 μ l) ve primer karışımı (0.5 μ l) karıştırılmış ve primerlerin şablonlara bağlanması için 16°C'de 15 dakika inkübasyon sağlanmıştır. Bu süre sonunda, karışıma 200 U/ μ l RevertAid M-MuLV ters transkriptaz (0.5 μ l; Thermo Scientific, ABD), tampon (2 μ l) ve 20 U/ μ l RNaz inhibitör (0.25 μ l) eklenerek karışım 35°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İşlem sonrası, karışımındaki ters transkriptaz 80°C'de 15 dakika inkübasyon ile inaktif hale getirilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.4. Kantitatif Ters Transkriptaz Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Olgun miRNA seviyeleri, qRT-PCR yöntemi ile göreceli olarak belirlenmiştir. Amplifikasyon amacıyla, cDNA sentezinde kullanılan stem-loop primer sekansları da dikkate alınarak, amplifikasyon primerleri tasarlanmıştır (**Tablo 3**). Sentezlenen primerler, 100 µM olacak şekilde çözünmüş ve 10 µM'lık çalışma konsantrasyonları oluşturulmuştur.

Tablo 3. qRT-PCR'da çalışılan forward ve reverse primerler.

Primer	Sekans
MIR378a-5p forward primer	5'-GAGCACC CTCCTGACTCCT-3'
MIR378a-5p reverse primer	5'-TAACCCTGTCCT ACACAGGACC-3'
MIR376c forward primer	5'-GCGAGCACC AACATAGAGG-3'
MIR376c reverse primer	5'-GCGAGCACC ACGTGGTTAA-3'
MIR195 forward primer	5'-GCGAGCACC TAGCAGCACA-3'
MIR195 reverse primer	5'-GCGAGCACC GCCAATATTT-3'
MIR34a forward primer	5'-GAGCACC TGGCAGTGTCT-3'
MIR34a reverse primer	5'-CATATACCTGCA ACAACCAGCT-3'
MIR210 forward primer	5'-GAGCACC CTGTGCGTGT-3'
MIR210 reverse primer	5'-GAGACGC TCAGCCGCTG-3'
MIR130a-3p forward primer	5'-GCGAGCACC CAGTGCAAT-3'
MIR130a-3p reverse primer	5'-TGGATACGAC ATGCCCTTTT-3'

qRT-PCR için, bir önceki basamakta sentezlenen cDNA'lar 1:3 oranında dilüe edilmiştir. Çalışma, SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak sağlayıcının talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Buna göre, her miRNA taraması için ayrı bir karışım oluşturmak şartıyla, **Tablo 4**'teki bileşenler, aynı anda çalışılan örnek sayısı, negatif kontrol varlığı ve mekanik hata payı göz önüne alınarak, bir ana karışım haline getirilmiştir.

Tablo 4. qRT-PCR ana bileşeni için gerekli olan bileşenler.

Bileşen	Hacim (µl; 1X reaksiyon için)
SYBR Green PCR Master Mix	10
İleri Primer (10 µM)	1
Geri Primer (10 µM)	1
PCR-grade su	4

Bu karışım, 16 µl/kuyucuk olacak şekilde PCR striplerine alınmıştır. Daha sonra üzerine dilüe edilmiş cDNA örneklerinden 4 µl eklenmiştir. Çalışma sırasında, her bir örnek için en az iki teknik replika kullanılmıştır. Hazırlanan karışıma **Tablo 5**'teki termal profile uygun olacak şekilde BioRad CFX96 (BioRad Inc., ABD) eklenmiş ve çalışma başlatılmıştır.

Tablo 5. qRT-PCR çalışmasında kullanılan termal profil.

Sıcaklık	Süre		Amaç
95°C	5 dakika		Başlangıç denatürasyonu
95°C	15 saniye	50 döngü	Döngüsel denatürasyon
60°C	30 saniye		Bağlanma
72°C	30 saniye		Uzama ve okuma
72°C	3 dakika		Final uzama

Tablo 5'te belirtildiği üzere, 50 döngü sonrası gerçekleştirilen amplifikasyonu takiben erime eğrisi oluşturmak amacıyla ikincil bir basamak başlatılmıştır. Buna göre ampliconlar, 50-99°C arasında (1'er derece artış/5 saniye olacak şekilde) inkübe edilmiştir ve okumalar alınmıştır.

Reaksiyon sonucunda elde edilen döngü eşiği (Cycle threshold; Ct) değerleri, daha önce benzer bir çalışmada önerildiği üzere (150) Ct değişimleri (Delta Ct) aracılığıyla süreçlendirilmiş ve grafik haline getirilmiştir. Buna göre, her bir örnekte hedef miRNA'lar ve referans olarak seçilen MIR130 için elde edilen Ct değerlerinin ortalaması alınmıştır. Daha sonra, her bir örnekte, her bir hedef miRNA için ortalama Ct değerleri, ayrı ayrı olmak kaydıyla aynı örneğin referans miRNA ortalama Ct değerinden çıkartılmıştır. Böylece delta Ct değerlerine ulaşılmıştır.

3.3. İstatiksel Analizler

Çalışmada her bir örnek için en az iki teknik replika ve her bir primer çifti için bir negatif kontrol kullanılmıştır. Elde edilen veriler, GraphPad Prism (GraphPad Inc., ABD) programı ile Mann-Whitney U testi kullanılarak analiz edilmiş ve $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

Gruplar içinde, her bir miRNA için ortalama değerler alınmıştır. Bu değerler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bu açıdan, delta Ct dağılımları, her bir grup içinde standart sapmaları da içerecek şekilde tek noktada gösterilebilmiştir.

4. BULGULAR

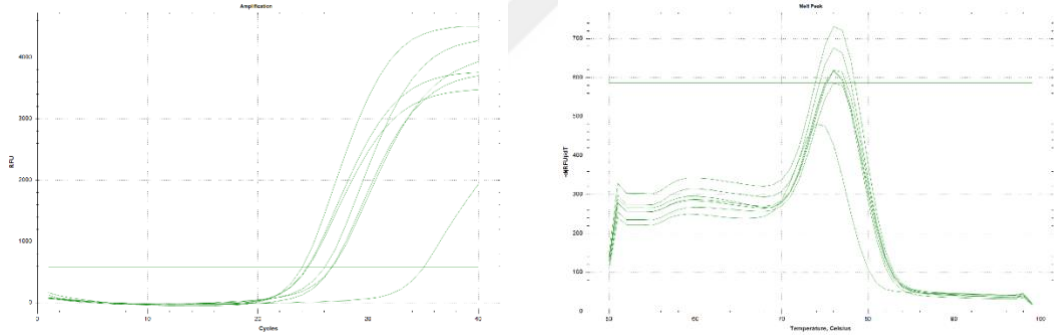
4.1. Katılımcıların Klinik Özellikleri

Konvensiyonel sitogenetik analizde normal karyotip (46, XY) saptanan 42 ve sayısal kromozomal anomali saptanan 58 olmak üzere toplam 100 kadın hastanın trofoblastik doku örneği çalışmaya alınmıştır. Bu kadınların başvuru anındaki ortalama yaşları, çalışma ve kontrol gruplarında sırasıyla 32 yıl ve 32,1 yıl olarak hesaplanmıştır. **Tablo 1**, sitogenetik anomalilerin maternal yaşa göre gruplar arasındaki dağılımını göstermektedir. İleri anne yaşı (≥ 35 yıl) grubunda sitogenetik anomali oranı %60,6 (20/33) ve genç anne yaşı (≤ 34 yıl) grubunda ise bu oran %56,7 (38/67) olarak hesaplanmıştır. Anne yaşının, 34 yıl ve altında olduğu grupta trizomilerin sıklığı %20,89 (14/67) iken 35 yıl ve üzeri olduğu grupta %45,45 (15/33) görülmüştür (**Tablo 1**). Çalışma grubu içinde (MX dışlanarak) kadın ve erkek cinsiyet dağılımına dair detaylar, Y kromozomu varlığı esas alınarak **Şekil 3**'te verilmiştir.

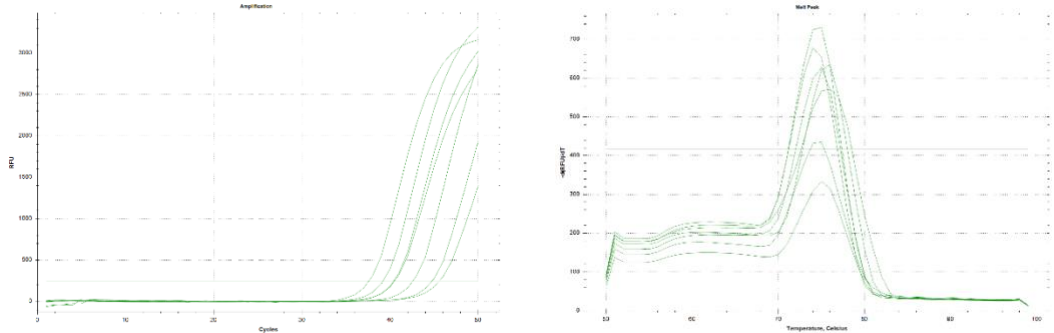
Çalışmaya dahil edilen tüm katılımcılar arasında obstetrik öyküde 2 veya 3 spontan abortus olanlar, en büyük grubu (%47) oluşturmaktadır. Bu grubu, ilk gebelik kaybında başvuranlar (%45) ve ardından ≥ 4 gebelik kaybında başvuranlar (%8) izlemektedir (**Şekil 1**).

4.2. Olgun miRNA Tespiti İçin Kullanılan Primerlerin Validasyonu

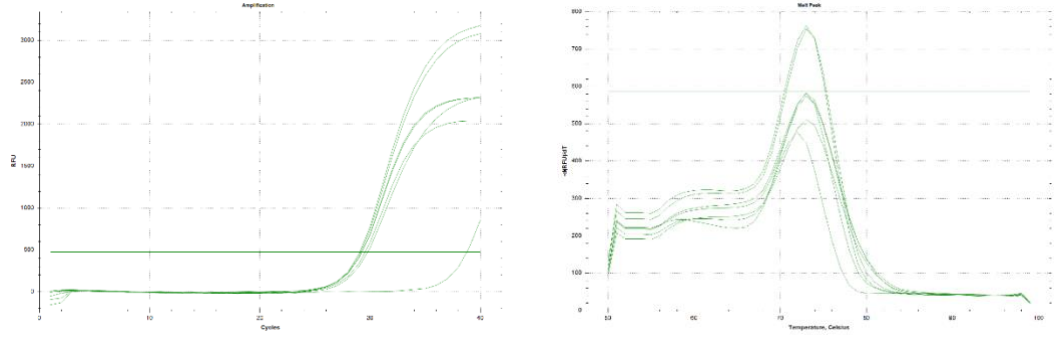
Bu çalışmada cDNA sentezi için, Tong ve arkadaşlarının (149) referansı esas alınarak sadece olgun miRNA'lara ve internal kontrole bağlanarak bu bölgeleri çoğaltacak şekilde loop oluşturabilecek özel primer dizileri tasarlanmıştır (**Tablo 2**). Referans alınan yöntem yaygın kullanımda olmadığından, miRNA ekspresyon analizi öncesinde tasarlanan özel primerlerin tek bir amplicon çoğaltıp çoğaltmadığının kontrolü yapılmıştır. Aşağıda sunulan grafiklerdeki erime eğrileri, primerlerin spesifik olarak çalışmada seçilen her bir olgun miRNA'yı çoğalttığını göstermektedir (**Şekil 5-9**).



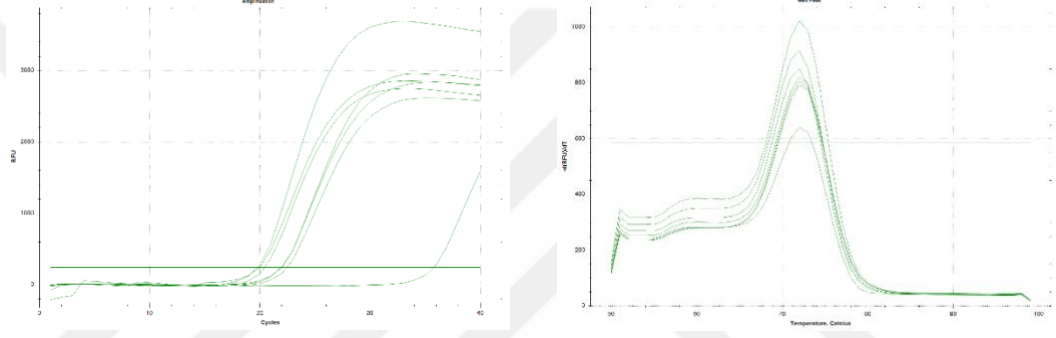
Şekil 5. MIR210 kantifikasyon eğrisi (sol) ve erime eğrisi (sağ)



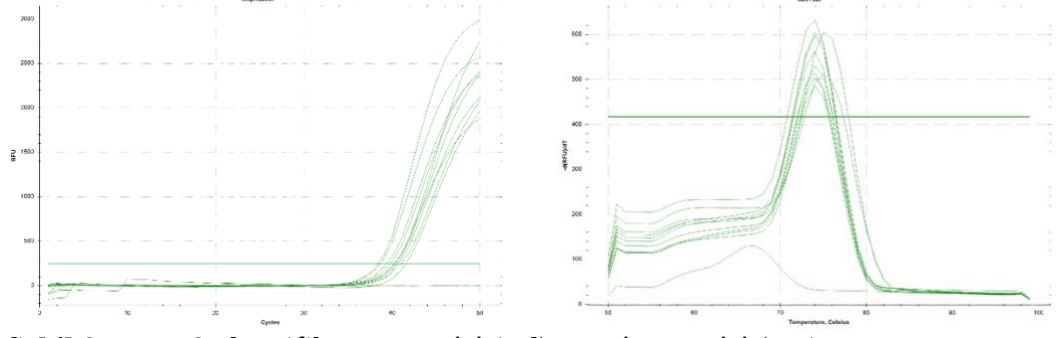
Şekil 6. MIR376c kantifikasyon eğrisi (sol) ve erime eğrisi (sağ)



Şekil 7. MIR378a-5p kantifikasyon eğrisi (sol) ve erime eğrisi (sağ)



Şekil 8. MIR34a kantifikasyon eğrisi (sol) ve erime eğrisi (sağ)



Şekil 9. MIR195 kantifikasyon eğrisi (sol) ve erime eğrisi (sağ)

4.3. MikroRNA Ekspresyon Seviyeleri

Çalışmaya dahil edilen miRNA'ların (MIR210, MIR376c, MIR378a-5p, MIR34a ve MIR195) ekspresyon seviyeleri farklı parametreler üzerinden değerlendirilmiştir. **Tablo 6** kontrol ve çalışma alt gruplarındaki trofoblastik dokulardaki her bir miRNA'nın ekspresyon değişikliklerini içermektedir.

Tablo 6. Kontrol grubu (dizomik XY) ve çalışma grubu miRNA ekspresyon değişikliklerinin referans miRNA ile kıyaslanması.

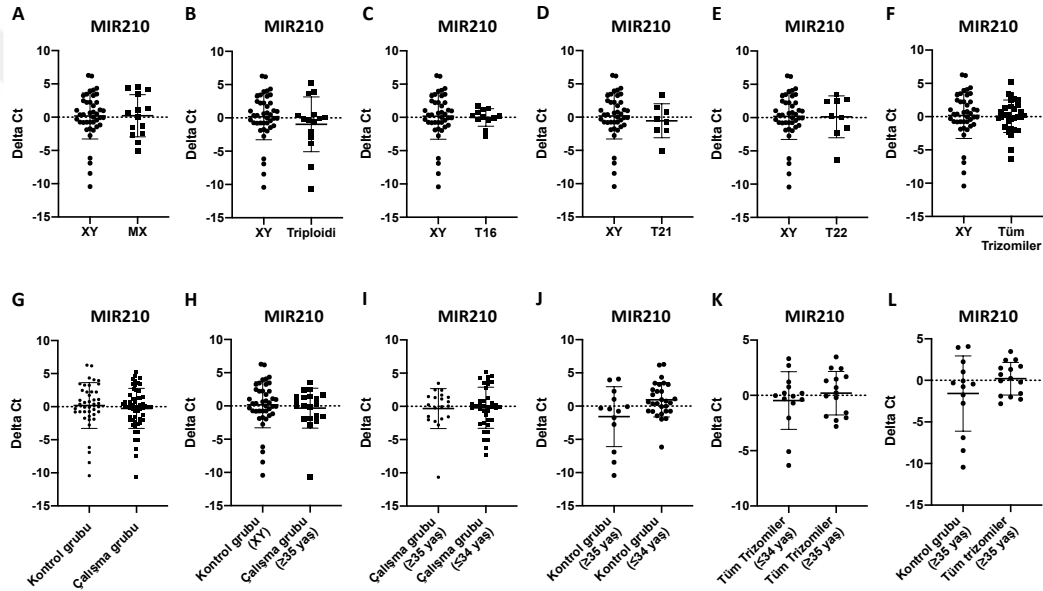
		MIR34a	MIR210	MIR195	MIR376c	MIR378a-5p
KARYOTİP	XY	↑	↑	↓	↓	↓
	MX	↑	↑	↓	↓	↓
	T16	↑**	↑	↓	↓	↓
	T21	↑**	↑	↓	↓	↓
	T22	↑	↑	↓	↓	↓
	Triploidi	↑	↑	↓	↓	↓

Referans MIR130'a kıyasla çalışma ve kontrol gruplarının artmış ekspresyon seviyeleri "↑" işareti ile, azalmış ekspresyon seviyeleri "↓" işareti ile gösterilmiştir. Normal karyotip (dizomik XY) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) sonuç elde edilen gruplar "***" işareti ile belirtilmiştir.

Sonuçlar her bir miRNA için ayrı başlıklar altında daha detaylı şekilde aşağıda sunulmaktadır.

4.3.1. MIR210 ekspresyonu

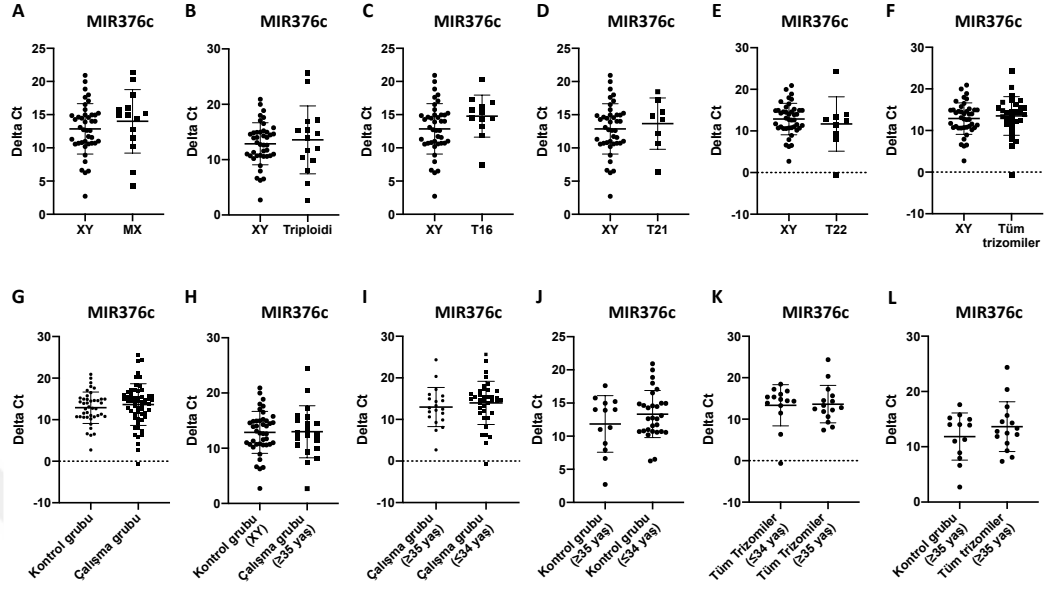
Plasenta gelişiminde inhibitör etkili MIR210'un ekspresyon seviyesinin diğer miRNA'lar ile karşılaştırıldığında daha yüksek düzeyde olduğu görülmüştür (Şekil 10). Ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.



Şekil 10. Çalışma grubu (n= 58) ve alt gruplarının, kontrol grubu (n= 42) trofoblastik doku örneklerine kıyasla MIR210 ekspresyonunu (delta Ct; ΔCt) gösteren grafikler (A-L). Anne yaşı, fetal kromozomal yapı ve MIR210 ekspresyonu ilişkisine yönelik grafikler (H-L).

4.3.2. MIR376c ekspresyonu

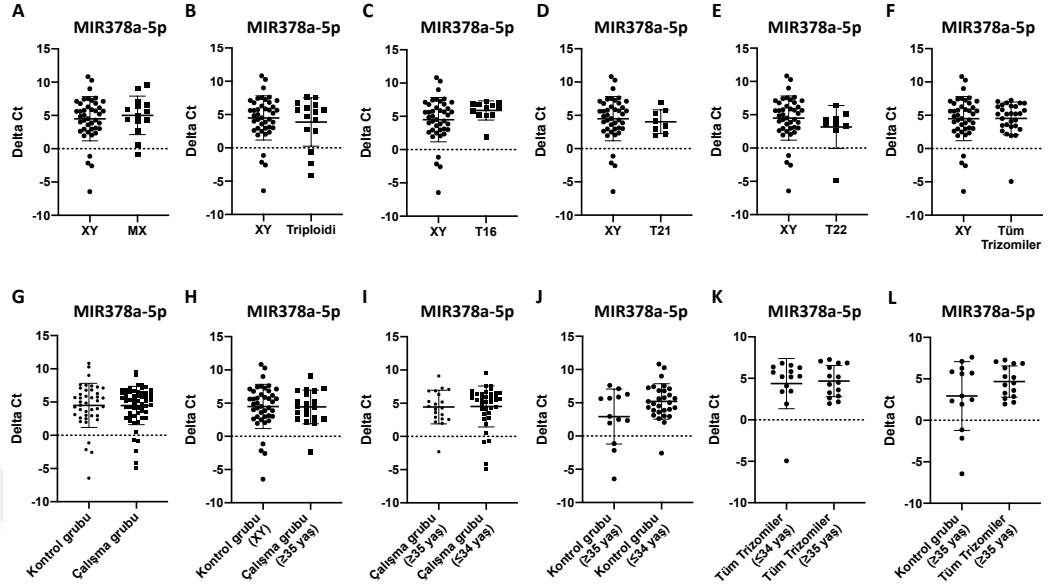
Ekspresyon analizi sonucunda tüm gruplarda $\Delta Ct \geq 0$ olarak saptanmıştır (Şekil 11). Bu sonuç, tüm gruplarda MIR376c'nin ekspresyon seviyesinin düşük olduğunu göstermektedir. Gruplar arasında da MIR376c ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.



Şekil 11. Çalışma grubu (n= 58) ve alt gruplarının, kontrol grubu (n= 42) trofoblastik doku örneklerine kıyasla MIR376c ekspresyonunu gösteren grafikler (A-L). Anne yaşı, fetal kromozomal yapı ve MIR376c ekspresyonu ilişkisine yönelik grafikler (H-L).

4.3.3. MIR378a-5p ekspresyonu

Ekspresyon analizi sonucunda tüm gruplarda çoğunlukla $\Delta Ct \geq 0$ olarak saptanmıştır (**Şekil 12**). Bu sonuç, MIR378a-5p'nin diğer miRNA'lara kıyasla ekspresyon seviyesinin düşük olduğunu göstermektedir. Gruplar arasında da MIR378a-5p ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

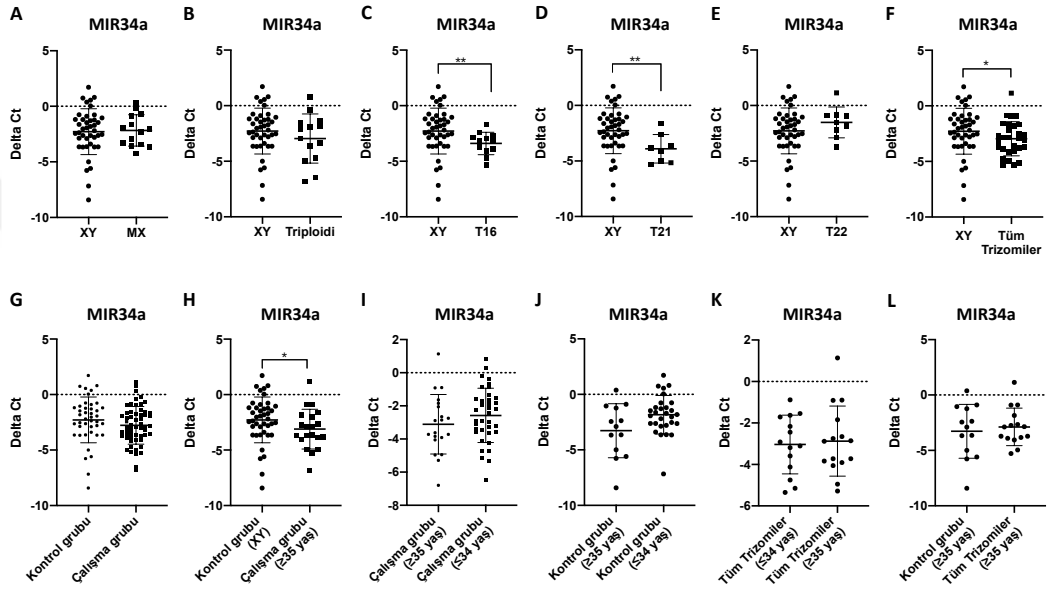


Şekil 12. Çalışma grubu (n= 58) ve alt gruplarının, kontrol grubu (n= 42) trofoblastik doku örneklerine kıyasla MIR378a-5p ekspresyonunu gösteren grafikler (A-L). Anne yaşı, fetal kromozomal yapı ve MIR378a-5p ekspresyonu ilişkisine yönelik grafikler (H-L).

4.3.4. MIR34a ekspresyonu

Ekspresyon analizi sonucunda tüm gruplarda çoğunlukla $\Delta Ct \leq 0$ olarak saptanmıştır (Şekil 13). Bu sonuç, MIR34a'nın diğer tüm miRNA'lara kıyasla ekspresyon seviyesinin yüksek olduğunu göstermektedir. **Trizomik trofoblastik doku örneklerinde, MIR34a ekspresyon seviyeleri, dizomik normal örneklerle karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur** ($p=0.0324$; Şekil 13-F). Trizomi 16 ve trizomi 21 saptanan trofoblastik örneklerde, dizomik XY karyotipli trofoblastik örneklerle kıyasla MIR34a ekspresyon düzeyi anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ($p=0.0072$; Şekil 13-C ve $p=0.0097$; Şekil 13-D). Trizomi 22 saptanan grup ile kontrol grubu (dizomik XY) arasında ise MIR34a ekspresyonunda anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Şekil 13-E). Ayrıca **ileri anne yaşı kaydedilen (≥ 35 yıl)**

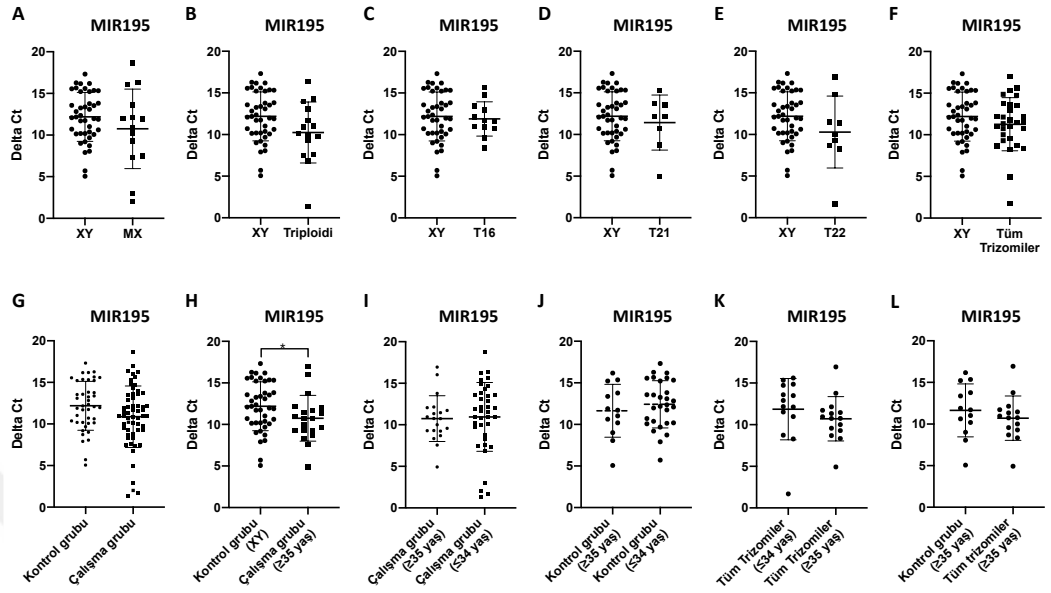
sitogenetik anomalili trofoblastik doku örneklerinde, MIR34a ekspresyon seviyeleri, kontrol grubu örnekleriyle kıyaslandığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.0346$; Şekil 13-H).



Şekil 13. Çalışma grubu ($n= 58$) ve alt gruplarının, kontrol grubu ($n= 42$) trofoblastik doku örneklerine kıyasla MIR34a ekspresyonunu gösteren grafikler (A-L). Anne yaşı, fetal kromozomal yapı ve MIR34a ekspresyonu ilişkisine yönelik grafikler (H-L).

4.3.5. MIR195 ekspresyonu

Ekspresyon analizi, MIR195'in diğer tüm miRNA'lara göre ekspresyon seviyesinin düşük olduğunu göstermiştir. *İleri anne yaşı olan (≥ 35 yıl) anomalili grup ile kontrol grubu (dizomik XY) arasında ise MIR195 ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p=0.0484$; Şekil 14-H).*



Şekil 14. Çalışma grubu (n= 58) ve alt gruplarının, kontrol grubu (n= 42) trofoblastik doku örneklerine kıyasla MIR195 ekspresyonunu gösteren grafikler (A-L). Anne yaşı, fetal kromozomal yapı ve MIR195 ekspresyonu ilişkisine yönelik grafikler (H-L).

5. TARTIŞMA

Gebelik, blastosist implantasyonunu takiben plasenta oluşumu ve embriyo gelişimi ile devam eden biyolojik bir süreçtir. Bu süreçte plasenta fonksiyonlarının düzensizliği başta spontan abortus olmak üzere farklı erken gebelik komplikasyonları ile ilişkilendirilmektedir (1, 2). Spontan abortusların en yaygın nedenleri arasında, sıklıkla yaşamla bağdaşmayan anöploidiler ve/veya triploidiler gibi sayısal kromozomal anomaliler yer almakla beraber, enfeksiyonlar, immünolojik, endokrinolojik ve anatomik nedenler de etiyolojide rol alabilmektedir (147, 148, 151). Bununla birlikte halen gebelik kayıplarının önemli bir kısmında altta yatan neden açıklanamadığı için, literatürde son yıllarda spontan abortuslarda gen/DNA/RNA temelli çalışmalar önem kazanmaya başlamıştır (5-8). Bunlar arasında, son zamanlarda, post-transkripsiyonel regülasyondan sorumlu olan miRNA'lar ile ilgili olanlar dikkat çekmektedir (7, 12, 13, 152-156). Bu çalışmalar plasenta örnekleri üzerinde yapıldığında bazı kısıtlılıklar söz konusu olmaktadır. Devam eden gebeliğe ait doğum anında alınan plasenta örneğinde çalışmalar yapıldığında, gebelik kayıplarının sonuçlarını yansıtmamakta (9-11) veya abort materyalinde yapılan çalışmalarda ise gebelik kayıplarının etiyolojisine katkı sağlanması hedeflenmekle beraber, gerçek fetal doku ayrımı yapılmadığı için elde edilen sonuçlar (fetal mi? / maternal mi?) güvenilir olmamaktadır (12, 13). Bu çalışmada ise, plasentogenezele ilişkisi insan plasentasında veya hücre hatlarında gösterilmiş olan MIR378a-5p, MIR376c, MIR195, MIR34a ve MIR210 ekspresyon seviyeleri spontan abortus sonucu elde edilen ve **fetal doku lehine olan (dizomik XY ve anomalili)** trofoblastik dokularda analiz edilmiştir. Ayrıca çalışmada

kullanılan primerler, olgun miRNA ekspresyonunun pratik tespiti için SYBR Green ile çalışabilecek ve stem-loop oluşturabilecek şekilde özel olarak tasarlanmıştır (149, **Tablo 2, Şekil 4**). Tong ve arkadaşlarının kullandığı yöntem (149) esas alınarak şiddetli akut solunum sendromu-korona virüs 2'nin (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SARS-CoV-2) genomik sekansları loop oluşumu için kullanılmıştır. İlk aşamada sınırlı sayıda örnekte cDNA sentezlenmiş ve RT-PCR ile erime eğrileri değerlendirilmiştir. Erime eğrilerinde tek bir pik eldesi ile tek bir ampikon üretilmiş, bu da primer tasarımının başarı ile gerçekleştirildiğini doğrulamıştır (**Şekil 5-9**). Böylece tasarlanan bu primerler ile olgun miRNA ekspresyon seviyelerinin değerlendirilebilmesi sağlanmıştır.

Ekspresyon analizleri sonucunda **Tablo 6**'da da belirtildiği gibi tüm trofoblastik dokularda (n= 100) plasenta gelişiminde **aktivatör etkili MIR378a-5p, MIR376c ve MIR195'in ekspresyon düzeyleri azalmış, inhibitör etkili MIR34a ve MIR210'un ekspresyon düzeyleri artmış** olarak saptanmıştır. Gebeliğin normal sürecinin sekteye uğradığı yani abortus ile sonlandığı durumlar için, aktivatör etkililerde azalmış ekspresyon, inhibitör etkililerde artmış ekspresyon seviyelerinin olması abort patofizyolojisi açısından uyumlu olarak değerlendirilmiştir. Her bir miRNA ekspresyon düzeyleri ayrı ayrı değerlendirildiğinde, ileri anne yaşı (≥ 35 yıl) olan anomalili örnekler ile dizomik örnekler karşılaştırıldığında, **MIR195 ve MIR34a ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır** ($p=0.0484$; **Şekil 14-H**, $p=0.0346$; **Şekil 13-H, Tablo 6**). Trizomik trofoblastik doku örneklerinde de dizomik normal örneklere kıyasla **MIR34a ekspresyon seviyeleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur** ($p=0.0324$; **Şekil 13-F, Tablo 6**).

MIR34a birinci kromozom kısa kolunda (1p36.22) lokalizedir ve beyin dokusu başta olmak üzere tüm dokularda ifade edilir. Transkripsiyonu doğrudan P53 tarafından aktive edilmektedir ve bir tümör baskılayıcı olarak da bilinmektedir. Anormal MIR34a down-regulasyonu birçok kanserde bildirilmiştir (157). Aksine ektopik MIR34a ekspresyonu, hücre döngüsünün durmasını, apoptozu ve yaşlanmayı indüklemekte ve kanser hücrelerinin göçünü ve istilasını engellemektedir (158). MIR34a'nın miRNA'lar ile ilgili veri tabanında (159) ve literatürde, kanserdeki hücrel proliferasyon, invazyon ve metastaz ile ilişkisi bilinmekle (160-162) beraber trofoblast biyolojisindeki rolü hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada trofoblastik dokulardaki ekspresyon seviyelerini değerlendirebilmek amacıyla, her bir trizomik trofoblastik dokusunun MIR34a ekspresyonu ayrı ayrı olarak dizomik normal örnekler ile karşılaştırılmıştır. **Tablo 6'**da detayları sunulduğu üzere **MIR34a ekspresyonunda T16 ve T21'li trofoblastik dokularda anlamlı bir artış** ($p=0.0072$; **Şekil 13-C** ve $p=0.0097$; **Şekil 13-D**), T22'li trofoblastik dokularda ise anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p=0.3332$; **Şekil 13-E**). Literatür taramasında trofoblastik dokunun spontan abortus (dizomik ve/veya trizomik) sonrası alınmış örnekleri üzerinde MIR34a ekspresyonunun analizinin yapıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak plasenta örneklerinin birinci trimesterde koryon villus örnekleme ile elde edildiği bir mikroRNA mikroArray çalışmasında öploidik ($n=5$) ve trizomik (Down sendrom'lu; DS) örneklerde ($n=4$) miRNA ekspresyon farklılıkları değerlendirilmiştir (163). Lim ve ark. tarafından yapılan bu çalışmada, 1.205 insan miRNA'sı ve 144 insan viral miRNA'sı olmak üzere toplam 1.349 miRNA'nın

profili çıkarılmıştır. Trizomik plasenta örneklerinde diploid plasentadan farklı olarak 16 miRNA'da artmış ekspresyon, 18 miRNA'da azalmış ekspresyon saptanmıştır. Ancak kromozom 21 üzerinde yer alan miRNA ekspresyonlarında iki grup arasında fark gözlenmemiştir. Biyoinformatik analizler ile ekspresyon değişikliği tespit edilen 34 miRNA'nın, 13479 hedef geni olduğu tahmin edilmiş ve yalnızca 76'sının 21. kromozom üzerinde lokalize olduğu görülmüştür. Hedef genlerin 10'unun azalmış ekspresyon gösteren ve 34'ünün artmış ekspresyon gösteren miRNA'lar tarafından, 32'sinin her iki grup tarafından kontrol edildiği belirtilmiştir (163). Bu çalışmada miRNA ekspresyonunun mikroArray ile genom çapında değerlendirilmesiyle beraber, bizim çalışmamıza kıyasla az sayıda örnekte yapılmıştır. Bizim çalışmamızda aynı gruplar arasında (trizomi 21'li ve dizomik trofoblastik doku) MIR34a ekspresyon artışı saptanmış olması, çalışılan materyallerin spontan abortus sonucunda elde edilen trofoblastik dokular olması ile ilişkilendirilebilir. Bu nedenle trofoblastik hücre sağ kalımını etkileyecek süreçlerin de miRNA ekspresyonu üzerinde bir katkısı olabileceği düşünülmüştür. Bunun yanı sıra çalışmamızda da bu çalışmayla benzer şekilde MIR195, MIR210, MIR378a-5p ve MIR376c ekspresyonlarında gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (163).

Modi ve arkadaşlarının 2017'de yayımladıkları bir çalışmada ise, T21'li (n=7) ve normal karyotipli (n=6) term gebeliklerden elde edilen kültüre edilmiş amniyositlerde, kromozom 21 üzerinde lokalize olan üç miRNA'nın (hsa-miR-125b, hsa-miR-99a ve hsa-let-7c) ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir. Trizomi 21 tanısı almış amniyosit örneklerinde, dizomik kontrollere kıyasla üç

miRNA ekspresyonu da anlamlı şekilde düşük saptanmıştır (164). Bizim çalışmamızda ise trizomik (T21'li) trofoblastik doku örneklerinde dizomiklere göre MIR34a'nın ekspresyon düzeyinde anlamlı bir artış saptanmıştır. Bizim çalışmamız ve Modi ve ark. araştırmasında çalışma grubu aynı (trizomi 21) olmasına rağmen ekspresyon düzeyleri değerlendirilen hücre hatlarının farklılığı ve seçilen miRNA'ların farklı olması ekspresyon analiz sonuçlarını değiştirmektedir. Bizim çalışmamızda direkt trofoblastik doku çalışılmakla beraber, diğer çalışmada kültüre edilmiş üç ayrı hücre hattını (amniyosit, fibroblast ve epitel) içeren amniyon sıvısı çalışılmıştır. Bizim çalışmamızda tek bir hücre grubuna ait ekspresyon seviyeleri değerlendirilirken, diğerinde üç ayrı hücre hattının sonucu değerlendirilmiştir. Modi ve arkadaşlarının çalışması ve bugüne kadar ki pek çok çalışmada, trizomi 21'deki miRNA ekspresyon değişiklikleri için öncelikle 21. kromozomda yer alan miRNA'lara odaklanılmış ve gen dozajının miRNA'ların ekspresyonu üzerine etkisi anlaşılmaya çalışılmıştır (164-170). Ancak miRNA'lar tarafından düzenlenen genler, belirli bir kromozomla sınırlı değildir; miRNA'lar genom boyunca çok sayıda hedef genin ekspresyonunu etkileyebilirler ve hastalık ilişkili fenotipe katkıda da bulunabilirler (17, 95, 129, 163). Bizim çalışmamızda da bu nedenle çalışma grubundaki anöploidilere ait kromozomlardan ziyade, plasenta gelişiminde rol alan ve farklı kromozomlar üzerinde lokalize olan miRNA'ların (MIR195, MIR34a, MIR210, MIR376c, MIR378a-5p; sırasıyla 17p13.1, 1p36.22, 11p15.5, 14q32.31, 5q32'de lokalize) çalışılması hedeflenmiştir. Sonuçlarımız, T16 ve T21'de yer alan birçok biyolojik yolakta ve komplikasyonlarda MIR34a ve hedef transkriptlerinin muhtemel katkısı olabileceğini göstermesi ve bu iki trizomide

genetik-epigenetik modülasyonların daha iyi anlaşılmasına olanak sağlama potansiyeli olması açısından değerlidir.

İleri anne yaşının trizomik gebelik kayıpları ile ilişkisi nedeniyle (171) bu çalışmanın sonuçları anne yaşı, fetal kromozom yapısı ve miRNA ekspresyonu açısından da ayrıca değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda, ileri anne yaşı (≥ 35 yıl) ve genç anne yaşı (≤ 34 yıl) olarak ayrılan farklı grupta her bir miRNA ekspresyonu ayrı ayrı değerlendirilmiştir. *Yalnızca MIR195 ve MIR34a ekspresyonunda, ileri anne yaşı (≥ 35 yıl) kaydedilen sitogenetik anomalili trofoblastik dokularda, kontrol grubuna (dizomik XY) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyon artışı olduğu saptanmıştır* ($p=0.0484$; **Şekil 14-I**, $p=0.0346$; **Şekil 13-H**). McCallie ve ark. MIR195 dahil olmak üzere 60 ayrı miRNA ile yapılan çalışmada ileri anne yaşı ve embriyo kromozom yapısı arasındaki ilişkiyi değerlendirmişlerdir (172). İleri yaş kadınlara ait öploid blastosistlerde genç kadınlara kıyasla MIR195 ekspresyonu >10 kat yüksek ve ileri yaş kadınlara ait anöploidik blastosistlerde, öploidik blastosistlere kıyasla ise aynı miRNA ekspresyonu 3,2 kat yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar bizim çalışmamızdaki anomalili trofoblastik dokulardaki MIR195 ekspresyon analizinin sonuçları ile uyumludur (172). Bizim anomalili grubumuzda anöploidilerin yanı sıra triploidiler de bulunmaktadır ve triploidiler dışlanarak sadece anöploidiler değerlendirildiğinde MIR195 ekspresyonunda anlamlı fark ortaya çıkmamaktadır. McCallie ve ark. anöploidiler hakkında detaylı bilgi içermeyen bu blastosist örnekleri henüz pre-implantasyon dönemindeki embriyolara aittir. Uterin implantasyon aşamasına ulaşmamış blastosistler ile implantasyon sonrasında kendiliğinden uterin kaviteden uzaklaştırılan trofoblastik

dokununun ekspresyon profilinde farklılık oluşması söz konusu olabileceğinden, miRNA ekspresyon seviyelerinde de farklılıklar görülebilecektir. Yine McCallie ve ark. kırklı yaşlarındaki kadınların blastosistlerinde, genç fertil donör oositlerden alınan blastosistlere kıyasla oksidatif stres savunma proteinlerini hedefleyen SIRT1 ekspresyonunun azaldığını göstermişlerdir. Bu durumda yaşlı blastosistlerde artan MIR93 ekspresyonu ile hedef gen *SIRT1*'in baskılanması ve down-regülasyonu arasında ilişki olduğu düşünülmektedir (172). Sonuçlar ileri anne yaşının ve embriyonun kromozomal yapısının, miRNA ekspresyonunu ve hedef gen fonksiyonlarını etkilediğini ve özellikle yaşlı blastosistlerde oksidatif savunma mekanizmalarının azalmasına neden olabileceğini göstermektedir. İleri anne yaşıyla birlikte artan oosit yaşlanma sürecinin MIR195 dahil olmak üzere pek çok miRNA'da ekspresyon değişikliğine yol açarak, spontan abortus gelişimine katkı sağlaması muhtemel gözükmemektedir. MIR195'e benzer şekilde MIR34a ekspresyonundaki anlamlı artış, kadın yaşıyla birlikte artan oosit yaşlanma sürecinine cevap olarak artmış vasküler yapılanma ile ilişkili metabolik katkıyı gösteriyor olabilir. Anjiyogenezi düzenleyen miRNA'lar (anjiyomiR'ler) üzerine yapılan çalışmalar daha çok kanser ile ilişkili dokularda (126, 173-178) iken bazıları da plasental doku ile ilişkilendirilmiştir. MIR34a uterin invazyon ve spiral arter remodellinginde yer aldığı bilinen bir anjiyomiR'dir. MIR34a bu işlevi, plasentasyon sırasında vaskülarizasyon modellerinin ve arteriyel kimliğin oluşturulmasında çok önemli olan Notch sinyal yolunun bir parçası olan, transmembran Notch 1 reseptörü ve Jagged1 ligandının ekspresyonunu düzenleme yoluyla yerine getirmektedir. Pang ve ark., MIR34a'nın ekspresyonunun Jagged1

ve Notch1 ekspresyonunu inhibe ederek trofoblastik hücre invazyon kapasitesini azalttığını göstermişlerdir (124). Pro- ve anti-anjiyojenik faktörler arasında bir dengesizlik olması durumunda, anormal plasenta gelişimine yol açabilen damarlanma artışı veya azalması meydana gelebilir (179). Ek olarak, oksidatif stres plasental vasküler disfonksiyonu ile ilişkilendirilmiştir (180). Spontan abortuslarda, trofoblast invazyon değişikliklerinin vasküler değişikliklerle ilişkili olduğu düşünülmekle beraber spiral arterlere trofoblast invazyonunun değişimi arasında doğrudan bir ilişki olup olmadığı konusunda kesin bir sonuca varılamamıştır (181). Direkt MIR34a hedeflerinin çeşitliliği, MIR34a'nın birçok geni düzenleyerek pleiotropik olarak hareket ettiğini göstermektedir (182).

Çalışmamızda diploidik ve anöploidik-triploidik trofoblastik dokularda **artmış MIR210 ekspresyonu** belirlenmiştir. Artmış MIR210 ekspresyonun erken dönem plasenta gelişimsel sürecinin doğal bir bileşeni ve/veya spontan abortus gelişim sürecinin bileşeni olarak yorumlanabilmektedir. MIR210'un hipoksi ile ilişkili belirli patofizyolojik koşullarda indüklenen ana hipoksamir olduğu ve pek çok farklı hücre tipinde hipoksik yanıtta ekspresyonunun arttığı bilinmektedir (134). Gebeliğin 10. haftasına kadar plasenta tam olarak oksijenlenmediği için düşük O₂ (%2) ortamında ilerlemektedir (183). İlk trimester plasentalarında baskın olarak eksprese edilen MIR210'un artmış ekspresyonu, erken dönem plasenta gelişimindeki bu fizyolojik hipoksik durum ile ilişkili olabilecektir (125). Genellikle gebeliğin 20. haftasından sonra ortaya çıkması beklenen PE'de, hastalar ile sağlıklı gebelikler karşılaştırıldığında preeklampatik plasental dokuda MIR210 ekspresyon seviyesinin anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir (136).

Sağlıklı gebeliklerde ileri gebelik haftalarında ekspresyon artışının görülmemesi ise normal plasental fizyoloji ile uyumlu görünmektedir (125). MIR210 ekspresyon artışının şiddetli ve hafif PE'li hastalar arasında karşılaştırıldığı başka bir çalışmada ise şiddetli preeklampitik plasentalarda daha yüksek düzeyde ekspresyon kaydedilmiştir. Bu durum şiddetli preeklampitik plasentalardaki ciddi hipoksiye işaret edebilirken; hafif preeklampitik plasentalarda telafi edici bir mekanizma ile ilişkilendirilebilir (106). Trofoblastik dokuda hipoksi ile indüklenen sürecin MIR210 ekspresyonunu artırdığı ve bu artışın trofoblastik hücrelerin migrasyon ve invazyonunu engellediği de bildirilmiştir (136). Bu nedenle hipoksinin başlattığı MIR210 ekspresyonunun, plasenta gelişim hataları ve/veya riskli gebelikler ile ilişkisi olabileceği düşünülmektedir.

MIR376c, kromozom 14 uzun kolu üzerinde yerleşmiş olan maternal imprinted DLK-DIO3 bölgesinde yer alan büyük bir miRNA kümesinin (C14MC) üyesidir. C14MC kümesindeki miRNA'lar, memelilerde evrimsel olarak korunur ve çoğu plasentada eksprese edilmektedir (184). Fu ve arkadaşlarının HTR8/SVneo hücreleri üzerindeki çalışmaları göstermiştir ki MIR376c'nin overekspresyonu, trofoblast hücre proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunu indüklemekte ve plasenta büyümesini desteklemektedir. Aynı çalışmaya göre ekspresyon düzeyleri gebelik evrelerine göre değişmekte ve kontrole kıyasla preeklampitik plasentada önemli ölçüde ekspresyon azalmaktadır. Bu bulgular, MIR376c'nin plasenta gelişiminde rol oynadığını ve ekspresyon farklılıklarının preeklampsinin patogeneze katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (103). Bu tez çalışmasında trofoblastik dokularda plasenta gelişimi ve trofoblastik hücrelerin

fizyolojisini destekleyici rolü olan MIR376c'nin azalmış ekspresyonunun gösterilmiş olması, spontan abortus gelişimi ile ilişkilendirilmesi açısından anlamlıdır.

MIR378a-5p, hem birinci ve hem de ikinci trimesterde yüksek oranda eksprese olması beklenen bir miRNA olmasına rağmen, birinci trimester gebelik örneklerinden oluşan çalışmamızda düşük oranda eksprese olmuştur (11). MIR378a-5p'nin embriyogenezde kritik rolü olan TGF- β süper ailesinin (108-110) bir üyesi olan Nodal'ı hedefleyerek trofoblastik hücre sağ kalımını, proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu desteklediği bilinmektedir. Ayrıca, plasental MIR378a-5p ekspresyonundaki disregülasyonlar riskli gebeliklerle (preeklampsi gibi) ilişkilendirilmiştir (11). Bu çalışmadaki MIR378a-5p azalmış ekspresyonunun nedeni olarak, abort patofizyolojisindeki trofoblastik doku-endometrium ilişkisinin bozulmasına sekonder ekspresyon patern değişikliği düşünülmekle beraber, bu bilginin doğrulanabilmesi için daha fazla çalışmaya/veriye ihtiyaç duyulmaktadır.

Farklı çalışmalarda, gebelik haftaları ve gebelik komplikasyonlarına göre aynı miRNA'ların ekspresyon paternlerinde farklılıklar olabilmektedir (9, 138). Bu durum, saptama yöntemlerinin duyarlılığındaki çeşitlilikten, kullanılan örneklerin farklılıklarından, örneklerin gebelik haftalarının aynı olmamasından ve/veya bireysel farklılıklardan kaynaklanabilecektir. Ribonükleik asit izolasyonu için kullanılan materyallerin farklılığı (plasental doku örnekleri/ implante edilmiş veya implante edilmemiş blastosistler/ atık blastosist / saflaştırılmış trofoblast hücrelerinin primer kültürleri vb.) ve örnek materyal plasenta olduğunda numune

alınan bölgelerin çeşitlilikleri ve numunenin azlığı/çokluğu ekspresyon düzeylerini etkileyebilecek diğer parametreler olarak kabul edilmektedir (139, 172, 185, 186). Plasenta dokusu intrauterin dönemde temin edildiğinde ise bu materyallerden fetomaternal doku ayrımının yapılıp yapılmaması da çalışmanın niteliğini etkileyebilecektir. Özellikle normal kadın karyotip (XX) belirlenen plasental dokuların sitogenetik analiz sonuçlarının yüksek oranda anneye ait desidua bazalis dokusunu yansıttığı bilindiği için, planlanan çalışmalarda ya ilk aşamada moleküler teknikler ile örneklerde fetomaternal ayrım yapılmalı ya da bu grup örnekler, bizim çalışmamızda olduğu gibi, çalışma dışı bırakılmalıdır (1-4). Bu tez çalışmasında, erkek cinsiyetinde diploidik materyaller seçilerek annenin desidua hücreleri ile kontaminasyon olabildiğince dışlanmıştır. Tüm plasental dokulardan yapılan çalışmaların ortak sorunu olan plasentaya sınırlı mozaizizmler (PSM) direkt trofoblast dokusu ayrılarak RNA izolasyonu yapılan bu çalışmamızda da dışlanamamakla beraber, PSM oranı (~%1-2) son derece düşük olduğundan bu durumun olası etkisinin çalışmanın sonuçlarını değiştirmeyeceği düşünülmüştür (187).

6. SONUÇLAR

- Bu çalışmada, erken gebeliğin bir komplikasyonu olan kendiliğinden düşüklerde etiyolojiye katkı sağlamak amacıyla, 42 dizomik XY kontrol ve 58 anomalili (T16, T21, T22 ile MX'ten oluşan 43 anöplodik ve 15 triploidik) çalışma grubu olmak üzere toplam 100 abort (trofoblastik doku) örneğinde plasenta gelişiminde **aktivatör etkili MIR378a-5p, MIR376c ve MIR195'in** ve **inhibitör etkili MIR34a ve MIR210'un** ekspresyon düzeyleri çalışılmıştır. Literatürde kendiliğinden düşük materyalleri ile belirtilen miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin ilişkisini gösteren başka bir çalışma ile karşılaşılmamıştır.
- Hem kontrol gruplarındaki hem de çalışma gruplarındaki trofoblastik dokularda plasenta gelişiminde **aktivatör etkili MIR378a-5p, MIR376c ve MIR195'in ekspresyon düzeylerinde azalma** ve **inhibitör etkili MIR34a ve MIR210'un ekspresyon düzeylerinde artış** belirlenmiştir.
- **Trizomik** (T16 ve T21) trofoblastik dokularda dizomik (normal XY) dokulara kıyasla **MIR34a ekspresyonunda artış** gözlenmiştir ($p=0.0072$ ve $p=0.0097$). Bir tümör supresör olan MIR34a ekspresyonu ile spontan abortus sonrası elde edilen trofoblastik dokunun değerlendirildiği ve MIR34a ekspresyonunun fetüse ait kromozomal yapılarla ilişkilendirildiği başka bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu çalışma MIR34a

ekspresyonunun ve hedef transkriptlerinin, kanser dışında başka birçok biyolojik yolakla da ilişkili olabileceğini göstermesi açısından değerlidir.

- **MIR195 ve MIR34a ekspresyonunda**, ileri anne yaşı (≥ 35 yıl) kaydedilen sitogenetik anomalili trofoblastik dokularda, kontrol grubuna (dizomik XY) kıyasla artış saptanmıştır ($p=0.0484$, $p=0.0346$). İleri anne yaşıyla birlikte artan oosit yaşlanma sürecinin MIR195, MIR34a ve pek çok miRNA ekspresyon değişikliği yoluyla spontan abortus gelişimine katkı sağlaması muhtemel görülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Karaoguz M, Percin E, Pala E, Biri A, Korucuoglu U. SRY gene amplifications and genotypings revealed the occurrence of the hidden maternal decidual cells in 46, XX karyotyped spontaneous abortions. *Genetic Counseling*. 2010;21(1):9.
2. Nikitina T, Lebedev I, Sukhanova N, Sazhenova E, Nazarenko S. Maternal cell contamination of cultures of spontaneous abortion fibroblasts: Importance for cytogenetic analysis of embryonic lethality. *Russian Journal of Genetics*. 2004;40(7):800-9.
3. Korucuoglu U, Erdem M, Pala E, Karaoguz MY, Erdem A, Biri A. Double aneuploidy in spontaneous miscarriages: two case reports and review of the literature. *Fetal diagnosis and therapy*. 2008;24(2):106-10.
4. Romero S, Geiersbach K, Paxton C, Rose N, Schisterman E, Branch D, et al. Differentiation of genetic abnormalities in early pregnancy loss. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. 2015;45(1):89-94.
5. Ghasemi M, Rezaei M, Yazdi A, Keikha N, Maruei-Milan R, Asadi-Tarani M, et al. The effects of DICER1 and DROSHA polymorphisms on susceptibility to recurrent spontaneous abortion. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2020;34(3):e23079.
6. Liu Y, Tang Y, Ye D, Ma W, Feng S, Li X, et al. Impact of abnormal DNA methylation of imprinted loci on human spontaneous abortion. *Reproductive Sciences*. 2018;25(1):131-9.
7. Paul A, Sadek ST, Mahesan AM. The role of microRNAs in human embryo implantation: a review. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2019;36(2):179-87.
8. Wang H, Cao Q, Ge J, Liu C, Ma Y, Meng Y, et al. Lnc RNA-regulated infection and inflammation pathways associated with pregnancy loss: Genome wide differential expression of lnc RNA s in early spontaneous abortion. *American journal of reproductive immunology*. 2014;72(4):359-75.
9. Bai Y, Yang W, Yang H-x, Liao Q, Ye G, Fu G, et al. Downregulated miR-195 detected in preeclamptic placenta affects trophoblast cell invasion via modulating ActRIIA expression. *PLoS One*. 2012;7(6):e38875.
10. Chen D-b, Wang W. Human placental microRNAs and preeclampsia. *Biology of reproduction*. 2013;88(5):130, 1-11.
11. Luo L, Ye G, Nadeem L, Fu G, Yang BB, Honarparvar E, et al. MicroRNA-378a-5p promotes trophoblast cell survival, migration and invasion by targeting Nodal. *Journal of cell science*. 2012;125(13):3124-32.
12. Ventura W, Koide K, Hori K, Yotsumoto J, Sekizawa A, Saito H, et al. Placental expression of microRNA-17 and-19b is down-regulated in early pregnancy loss. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2013;169(1):28-32.
13. Hosseini MK, Gunel T, Gumusoglu E, Benian A, Aydinli K. MicroRNA expression profiling in placenta and maternal plasma in early pregnancy loss. *Molecular medicine reports*. 2018;17(4):4941-52.

14. Bartel DP. Metazoan micromRNAs. *Cell*. 2018;173(1):20-51.
15. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic acids research*. 2019;47(D1):D155-D62.
16. Plotnikova O, Baranova A, Skoblov M. Comprehensive analysis of human microRNA–mRNA interactome. *Frontiers in genetics*. 2019:933.
17. Baskerville S, Bartel DP. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *Rna*. 2005;11(3):241-7.
18. Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, et al. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes & development*. 2003;17(8):991-1008.
19. Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP. Vertebrate microRNA genes. *Science*. 2003;299(5612):1540-.
20. Lai EC, Tomancak P, Williams RW, Rubin GM. Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome biology*. 2003;4(7):1-20.
21. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75(5):855-62.
22. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *cell*. 1993;75(5):843-54.
23. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *nature*. 2000;403(6772):901-6.
24. Ambros V. The evolution of our thinking about microRNAs. *Nature medicine*. 2008;14(10):1036-40.
25. Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G. The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the *LIN-29* transcription factor. *Molecular cell*. 2000;5(4):659-69.
26. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*. 2004;116(2):281-97.
27. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *science*. 2001;294(5543):862-4.
28. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294(5543):858-62.
29. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001;294(5543):853-8.
30. Dasgupta I, Chatterjee A. Recent advances in miRNA delivery systems. *Methods and protocols*. 2021;4(1):10.
31. Mattick JS, Makunin IV. Non-coding RNA. *Human molecular genetics*. 2006;15(suppl_1):R17-R29.
32. Urbich C, Kuehnbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovascular research*. 2008;79(4):581-8.

33. Esau CC, Monia BP. Therapeutic potential for microRNAs. *Advanced drug delivery reviews*. 2007;59(2-3):101-14.
34. Li Z, Rana TM. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nature reviews Drug discovery*. 2014;13(8):622-38.
35. Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature reviews genetics*. 2009;10(2):94-108.
36. Ishizu H, Siomi H, Siomi MC. Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. *Genes & development*. 2012;26(21):2361-73.
37. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(8):509-24.
38. Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*. 2007;130(1):89-100.
39. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*. 2007;448(7149):83-6.
40. Xie M, Steitz JA. Versatile microRNA biogenesis in animals and their viruses. *RNA biology*. 2014;11(6):673-81.
41. Yang J-S, Lai EC. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Molecular cell*. 2011;43(6):892-903.
42. Zeng Y. Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene*. 2006;25(46):6156-62.
43. Roush S, Slack FJ. The let-7 family of microRNAs. *Trends in cell biology*. 2008;18(10):505-16.
44. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *cell*. 2009;136(2):215-33.
45. Oszolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG, et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes & development*. 2008;22(22):3172-83.
46. Monteys AM, Spengler RM, Wan J, Tecedor L, Lennox KA, Xing Y, et al. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *Rna*. 2010;16(3):495-505.
47. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna*. 2004;10(12):1957-66.
48. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*. 2004;23(20):4051-60.
49. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology*. 2006;13(12):1097-101.
50. Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R, Sander C, Grässer FA, et al. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nature methods*. 2005;2(4):269-76.
51. Lee Y, Jeon K, Lee J-T, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal*. 2002;21(17):4663-70.

52. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415-9.
53. Han J, Lee Y, Yeom K-H, Kim Y-K, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development*. 2004;18(24):3016-27.
54. Shiohama A, Sasaki T, Noda S, Minoshima S, Shimizu N. Nucleolar localization of DGCR8 and identification of eleven DGCR8-associated proteins. *Experimental cell research*. 2007;313(20):4196-207.
55. Yeom K-H, Lee Y, Han J, Suh MR, Kim VN. Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic acids research*. 2006;34(16):4622-9.
56. Han J, Lee Y, Yeom K-H, Nam J-W, Heo I, Rhee J-K, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *cell*. 2006;125(5):887-901.
57. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004;432(7014):231-5.
58. Gregory RI, Yan K-p, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 2004;432(7014):235-40.
59. Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Current biology*. 2004;14(23):2162-7.
60. Auyeung VC, Ulitsky I, McGeary SE, Bartel DP. Beyond secondary structure: primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing. *Cell*. 2013;152(4):844-58.
61. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *The EMBO journal*. 2005;24(1):138-48.
62. Ma H, Wu Y, Choi J-G, Wu H. Lower and upper stem–single-stranded RNA junctions together determine the Drosha cleavage site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(51):20687-92.
63. Bohnsack MT, Czapinski K, Görlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna*. 2004;10(2):185-91.
64. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *science*. 2004;303(5654):95-8.
65. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*. 2003;17(24):3011-6.
66. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001;409(6818):363-6.
67. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*. 2001;106(1):23-34.

68. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint É, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. 2001;293(5531):834-8.
69. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & development*. 2001;15(20):2654-9.
70. Knight SW, Bass BL. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;293(5538):2269-71.
71. Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, et al. The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*. 1999;99(2):123-32.
72. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*. 2001;293(5532):1146-50.
73. Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes & development*. 2002;16(6):720-8.
74. Kawamata T, Tomari Y. Making risc. *Trends in biochemical sciences*. 2010;35(7):368-76.
75. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000;404(6775):293-6.
76. Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*. 2002;110(5):563-74.
77. Schwarz DS, Hutvagner G, Haley B, Zamore PD. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Molecular cell*. 2002;10(3):537-48.
78. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*. 2011;12(2):99-110.
79. Lee I, Ajay SS, Yook JI, Kim HS, Hong SH, Kim NH, et al. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome research*. 2009;19(7):1175-83.
80. Schnall-Levin M, Rissland OS, Johnston WK, Perrimon N, Bartel DP, Berger B. Unusually effective microRNA targeting within repeat-rich coding regions of mammalian mRNAs. *Genome research*. 2011;21(9):1395-403.
81. Kim DH, Sætrom P, Snøve Jr O, Rossi JJ. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(42):16230-5.
82. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*. 2009;19(1):92-105.
83. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews genetics*. 2004;5(7):522-31.

84. Hendrickson DG, Hogan DJ, McCullough HL, Myers JW, Herschlag D, Ferrell JE, et al. Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *PLoS biology*. 2009;7(11):e1000238.
85. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature cell biology*. 2005;7(7):719-23.
86. Andrei MA, Ingelfinger D, Heintzmann R, Achsel T, Rivera-Pomar R, Lührmann R. A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *Rna*. 2005;11(5):717-27.
87. Jakymiw A, Lian S, Eystathioy T, Li S, Satoh M, Hamel JC, et al. Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nature cell biology*. 2005;7(12):1267-74.
88. Teixeira D, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Brengues M, Parker R. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *Rna*. 2005;11(4):371-82.
89. Roberts V, Myatt L. Placental development and physiology. Up to date [internet]. 2010.
90. Malassiné A, Frendo JL, Evain-Brion D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Human reproduction update*. 2003;9(6):531-9.
91. Norwitz ER. Defective implantation and placentation: laying the blueprint for pregnancy complications. *Reproductive biomedicine online*. 2006;13(4):591-9.
92. Milunsky A, Milunsky JM. Genetic disorders and the fetus: diagnosis, prevention, and treatment: John Wiley & Sons; 2015.
93. Nugent BM, Bale TL. The omniscient placenta: metabolic and epigenetic regulation of fetal programming. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2015;39:28-37.
94. Mouillet JF, Chu T, Sadovsky Y. Expression patterns of placental microRNAs. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2011;91(8):737-43.
95. Barad O, Meiri E, Avniel A, Aharonov R, Barzilai A, Bentwich I, et al. MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome research*. 2004;14(12):2486-94.
96. Donker RB, Mouillet J-F, Nelson DM, Sadovsky Y. The expression of Argonaute2 and related microRNA biogenesis proteins in normal and hypoxic trophoblasts. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. 2007;13(4):273-9.
97. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, et al. Dicer is essential for mouse development. *Nature genetics*. 2003;35(3):215-7.
98. Chong MM, Zhang G, Cheloufi S, Neubert TA, Hannon GJ, Littman DR. Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery. *Genes & development*. 2010;24(17):1951-60.
99. Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Bluelloch R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nature genetics*. 2007;39(3):380-5.
100. Shiohama A, Sasaki T, Noda S, Minoshima S, Shimizu N. Molecular cloning and expression analysis of a novel gene DGCR8 located in the DiGeorge

syndrome chromosomal region. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;304(1):184-90.

101. Goldberg R, Motzkin B, Marion R, Scambler PJ, Shprintzen RJ. Velocardio-facial syndrome: A review of 120 patients. *American journal of medical genetics*. 1993;45(3):313-9.

102. Dai Y, Qiu Z, Diao Z, Shen L, Xue P, Sun H, et al. MicroRNA-155 inhibits proliferation and migration of human extravillous trophoblast derived HTR-8/SVneo cells via down-regulating cyclin D1. *Placenta*. 2012;33(10):824-9.

103. Fu G, Ye G, Nadeem L, Ji L, Manchanda T, Wang Y, et al. MicroRNA-376c impairs transforming growth factor- β and nodal signaling to promote trophoblast cell proliferation and invasion. *Hypertension*. 2013;61(4):864-72.

104. Li P, Guo W, Du L, Zhao J, Wang Y, Liu L, et al. microRNA-29b contributes to pre-eclampsia through its effects on apoptosis, invasion and angiogenesis of trophoblast cells. *Clinical Science*. 2013;124(1):27-40.

105. Zhang Y, Diao Z, Su L, Sun H, Li R, Cui H, et al. MicroRNA-155 contributes to preeclampsia by down-regulating CYR61. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2010;202(5):466. e1-. e7.

106. Zhu X-m, Han T, Sargent IL, Yin G-w, Yao Y-q. Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2009;200(6):661. e1-. e7.

107. Enquobahrie DA, Abetew DF, Sorensen TK, Willoughby D, Chidambaram K, Williams MA. Placental microRNA expression in pregnancies complicated by preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2011;204(2):178. e12-. e21.

108. Zhou X, Sasaki H, Lowe L, Hogan BL, Kuehn MR. Nodal is a novel TGF- β -like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature*. 1993;361(6412):543-7.

109. Nonaka S, Shiratori H, Saijoh Y, Hamada H. Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature*. 2002;418(6893):96-9.

110. Chea HK, Wright CV, Swalla BJ. Nodal signaling and the evolution of deuterostome gastrulation. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. 2005;234(2):269-78.

111. Eichner LJ, Perry M-C, Dufour CR, Bertos N, Park M, St-Pierre J, et al. miR-378* mediates metabolic shift in breast cancer cells via the PGC-1 β /ERR γ transcriptional pathway. *Cell metabolism*. 2010;12(4):352-61.

112. Winsel S, Mäki-Jouppila J, Tambe M, Aure M, Pruikkonen S, Salmela A, et al. Excess of miRNA-378a-5p perturbs mitotic fidelity and correlates with breast cancer tumorigenesis in vivo. *British journal of cancer*. 2014;111(11):2142-51.

113. Kawahara Y, Zinshteyn B, Sethupathy P, Iizasa H, Hatzigeorgiou AG, Nishikura K. Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs. *Science*. 2007;315(5815):1137-40.

114. Seitz H, Royo H, Bortolin M-L, Lin S-P, Ferguson-Smith AC, Cavaillé J. A large imprinted microRNA gene cluster at the mouse Dlk1-Gtl2 domain. *Genome research*. 2004;14(9):1741-8.

115. Tsai K-W, Kao H-W, Chen H-C, Chen S-J, Lin W-c. Epigenetic control of the expression of a primate-specific microRNA cluster in human cancer cells. *Epigenetics*. 2009;4(8):587-92.
116. Finnerty JR, Wang W-X, Hébert SS, Wilfred BR, Mao G, Nelson PT. The miR-15/107 group of microRNA genes: evolutionary biology, cellular functions, and roles in human diseases. *Journal of molecular biology*. 2010;402(3):491-509.
117. Oh SP, Yeo C-Y, Lee Y, Schrewe H, Whitman M, Li E. Activin type IIA and IIB receptors mediate Gdf11 signaling in axial vertebral patterning. *Genes & development*. 2002;16(21):2749-54.
118. Chang T-C, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Molecular cell*. 2007;26(5):745-52.
119. Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, Spector Y, Rosenfeld N, Moskovits N, et al. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Molecular cell*. 2007;26(5):731-43.
120. Doridot L, Houry D, Gaillard H, Chelbi ST, Barboux S, Vaiman D. miR-34a expression, epigenetic regulation, and function in human placental diseases. *Epigenetics*. 2014;9(1):142-51.
121. Zhao W-X, Lin J-H. Notch signaling pathway and human placenta. *International journal of medical sciences*. 2012;9(6):447.
122. Swiatek PJ, Lindsell CE, Del Amo FF, Weinmaster G, Gridley T. Notch1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes & development*. 1994;8(6):707-19.
123. Li N, Fu H, Tie Y, Hu Z, Kong W, Wu Y, et al. miR-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer letters*. 2009;275(1):44-53.
124. Pang RT, Leung CO, Ye T-M, Liu W, Chiu PC, Lam KK, et al. MicroRNA-34a suppresses invasion through downregulation of Notch1 and Jagged1 in cervical carcinoma and choriocarcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2010;31(6):1037-44.
125. Gu Y, Sun J, Groome LJ, Wang Y. Differential miRNA expression profiles between the first and third trimester human placentas. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2013;304(8):E836-E43.
126. Hua Z, Lv Q, Ye W, Wong C-KA, Cai G, Gu D, et al. MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PloS one*. 2006;1(1):e116.
127. Camps C, Buffa FM, Colella S, Moore J, Sotiriou C, Sheldon H, et al. hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clinical cancer research*. 2008;14(5):1340-8.
128. Giannakakis A, Sandaltzopoulos R, Greshock J, Liang S, Huang J, Hasegawa K, et al. miR-210 links hypoxia with cell cycle regulation and is deleted in human epithelial ovarian cancer. *Cancer biology & therapy*. 2008;7(2):255-64.
129. Guimbellot JS, Erickson SW, Mehta T, Wen H, Page GP, Sorscher EJ, et al. Correlation of microRNA levels during hypoxia with predicted target mRNAs through genome-wide microarray analysis. *BMC medical genomics*. 2009;2(1):1-17.

130. Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *Journal of biological chemistry*. 2008;283(23):15878-83.
131. Pulkkinen K, Malm T, Turunen M, Koistinaho J, Ylä-Herttuala S. Hypoxia induces microRNA miR-210 in vitro and in vivo: Ephrin-A3 and neuronal pentraxin 1 are potentially regulated by miR-210. *FEBS letters*. 2008;582(16):2397-401.
132. Wang GL, Jiang B-H, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the national academy of sciences*. 1995;92(12):5510-4.
133. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, et al. A microRNA signature of hypoxia. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(5):1859-67.
134. Chan SY, Loscalzo J. MicroRNA-210: a unique and pleiotropic hypoxamir. *Cell cycle*. 2010;9(6):1072-83.
135. Lee D-C, Romero R, Kim J-S, Tarca AL, Montenegro D, Pineles BL, et al. miR-210 targets iron-sulfur cluster scaffold homologue in human trophoblast cell lines: siderosis of interstitial trophoblasts as a novel pathology of preterm preeclampsia and small-for-gestational-age pregnancies. *The American journal of pathology*. 2011;179(2):590-602.
136. Zhang Y, Fei M, Xue G, Zhou Q, Jia Y, Li L, et al. Elevated levels of hypoxia-inducible microRNA-210 in pre-eclampsia: new insights into molecular mechanisms for the disease. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2012;16(2):249-59.
137. Morales-Prieto D, Chaiwangyen W, Ospina-Prieto S, Schneider U, Herrmann J, Gruhn B, et al. MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells. *Placenta*. 2012;33(9):725-34.
138. Hu Y, Li P, Hao S, Liu L, Zhao J, Hou Y. Differential expression of microRNAs in the placenta of Chinese patients with severe pre-eclampsia. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2009;47(8):923-9.
139. Fu G, Brkić J, Hayder H, Peng C. MicroRNAs in human placental development and pregnancy complications. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(3):5519-44.
140. No RG-tG. The investigation and treatment of couples with recurrent first-trimester and second-trimester miscarriage. *RCOG: London, UK*. 2011.
141. Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, et al. Incidence of early loss of pregnancy. *New England Journal of Medicine*. 1988;319(4):189-94.
142. Obstetricians ACo, Gynecologists. ACOG Practice Bulletin No. 200: early pregnancy loss. *Obstetrics and gynecology*. 2018;132(5):e197-e207.
143. Griebel CP, Halvorsen J, Golemon TB, Day AA. Management of spontaneous abortion. *American family physician*. 2005;72(7):1243-50.
144. Soler A, Morales C, Mademont-Soler I, Margarit E, Borrell A, Borobio V, et al. Overview of chromosome abnormalities in first trimester miscarriages: a series of 1,011 consecutive chorionic villi sample karyotypes. *Cytogenetic and genome research*. 2017;152(2):81-9.

145. Smits MA, van Maarle M, Hamer G, Mastenbroek S, Goddijn M, van Wely M. Cytogenetic testing of pregnancy loss tissue: a meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online*. 2020;40(6):867-79.
146. Levy B, Sigurjonsson S, Pettersen B, Maisenbacher MK, Hall MP, Demko Z, et al. Genomic imbalance in products of conception: single-nucleotide polymorphism chromosomal microarray analysis. *Obstetrics & Gynecology*. 2014;124(2 PART 1):202-9.
147. Warren JE, Silver RM. Genetics of pregnancy loss. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2008;51(1):84-95.
148. Stephenson M, Awartani K, Robinson W. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Human reproduction*. 2002;17(2):446-51.
149. Tong L, Xue H, Xiong L, Xiao J, Zhou Y. Improved RT-PCR assay to quantitate the pri-, pre-, and mature microRNAs with higher efficiency and accuracy. *Molecular biotechnology*. 2015;57(10):939-46.
150. Craig KK, Wood GA, Keller SM, Mutsaers AJ, Wood RD. MicroRNA profiling in canine multicentric lymphoma. *PloS one*. 2019;14(12):e0226357.
151. Pinar MH, Gibbins K, He M, Kostadinov S, Silver R. Early pregnancy losses: review of nomenclature, histopathology, and possible etiologies. *Fetal and pediatric pathology*. 2018;37(3):191-209.
152. Karami N, Mirabutalebi SH, Montazeri F, Kalantar SM, Sheikhha MH, Eftekhari M. Aberrant expression of microRNAs 16 and 21 and gene targets in women with unexplained recurrent miscarriage: A case-control study. *International journal of reproductive biomedicine*. 2018;16(10):617.
153. Zhao W, Shen Ww, Cao Xm, Ding Wy, Yan Lp, Gao Lj, et al. Novel mechanism of miRNA-365-regulated trophoblast apoptosis in recurrent miscarriage. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2017;21(10):2412-25.
154. Wang P, Chen X, Chang Y, Wang Y, Xu X, Guo Y, et al. Inhibition of microRNA-149 protects against recurrent miscarriage through upregulating RUNX2 and activation of the PTEN/Akt signaling pathway. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2020;46(12):2534-46.
155. Tang H, Pan L, Xiong Y, Wang L, Cui Y, Liu J, et al. Down-regulation of the Sp1 transcription factor by an increase of microRNA-4497 in human placenta is associated with early recurrent miscarriage. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2021;19(1):1-12.
156. Zhang Q, Tian P, Xu H. MicroRNA-155-5p regulates survival of human decidua stromal cells through NF- κ B in recurrent miscarriage. *Reproductive Biology*. 2021;21(3):100510.
157. Henrich K-O, Schwab M, Westermann F. 1p36 tumor suppression—a matter of dosage? *Cancer research*. 2012;72(23):6079-88.
158. Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death & Differentiation*. 2010;17(2):193-9.
159. Chen Y, Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic acids research*. 2020;48(D1):D127-D31.
160. Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, et al. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel

sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell cycle*. 2007;6(13):1586-93.

161. Siemens H, Jackstadt R, Hüntten S, Kaller M, Menssen A, Götz U, et al. miR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions. *Cell cycle*. 2011;10(24):4256-71.

162. Sun M, Chen H, Liu J, Tong C, Meng T. MicroRNA-34a inhibits human trophoblast cell invasion by targeting MYC. *BMC cell biology*. 2015;16(1):1-9.

163. Lim J, Kim D, Lee D, Han J, Chung J, Ahn H, et al. Genome-wide microRNA expression profiling in placentas of fetuses with Down syndrome. *Placenta*. 2015;36(3):322-8.

164. Modi BP, Washington S, Walsh SW, Jackson-Cook C, Archer KJ, Strauss III JF. Expression patterns of the chromosome 21 MicroRNA cluster (miR-99a, miR-125b and let-7c) in chorioamniotic membranes. *Placenta*. 2017;49:1-9.

165. Siew W-H, Tan K-L, Babaei MA, Cheah P-S, Ling K-H. MicroRNAs and intellectual disability (ID) in Down syndrome, X-linked ID, and Fragile X syndrome. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2013;7:41.

166. Xu Y, Li W, Liu X, Chen H, Tan K, Chen Y, et al. Identification of dysregulated microRNAs in lymphocytes from children with Down syndrome. *Gene*. 2013;530(2):278-86.

167. Xu Y, Li W, Liu X, Ma H, Tu Z, Dai Y. Analysis of microRNA expression profile by small RNA sequencing in Down syndrome fetuses. *International journal of molecular medicine*. 2013;32(5):1115-25.

168. Sethupathy P, Borel C, Gagnebin M, Grant GR, Deutsch S, Elton TS, et al. Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes. *The American Journal of Human Genetics*. 2007;81(2):405-13.

169. Elton TS, Sansom SE, Martin MM. Trisomy-21 gene dosage over-expression of miRNAs results in the haploinsufficiency of specific target proteins. *RNA biology*. 2010;7(5):540-7.

170. Li YY, Alexandrov PN, Pogue AI, Zhao Y, Bhattacharjee S, Lukiw WJ. miRNA-155 up-regulation and complement factor H (CFH) deficits in Down's Syndrome. *Neuroreport*. 2012;23(3):168.

171. Hassold T, Chiu D. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Human genetics*. 1985;70(1):11-7.

172. McCallie BR, Parks JC, Strieby AL, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Human blastocysts exhibit unique microrna profiles in relation to maternal age and chromosome constitution. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2014;31(7):913-9.

173. Chen Y, Gorski DH. Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2008;111(3):1217-26.

174. Fasanaro P, Greco S, Lorenzi M, Pescatori M, Brioschi M, Kulshreshtha R, et al. An integrated approach for experimental target identification of hypoxia-induced miR-210. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(50):35134-43.

175. Doebele C, Bonauer A, Fischer A, Scholz A, Reiss Y, Urbich C, et al. Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2010;115(23):4944-50.
176. Anand S, Majeti BK, Acevedo LM, Murphy EA, Mukthavaram R, Scheppke L, et al. MicroRNA-132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis. *Nature medicine*. 2010;16(8):909-14.
177. Lee DY, Deng Z, Wang C-H, Yang BB. MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(51):20350-5.
178. Linsley PS, Schelter J, Burchard J, Kibukawa M, Martin MM, Bartz SR, et al. Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(6):2240-52.
179. Rodríguez Santa LM, González Teshima LY, Forero Forero JV, Castillo Giraldo AO. AngiomiRs: potential biomarkers of pregnancy's vascular pathologies. *Journal of Pregnancy*. 2015;2015.
180. Myatt L, Kossenjans W, Sahay R, Eis A, Brockman D. Oxidative stress causes vascular dysfunction in the placenta. *The Journal of Maternal-Fetal Medicine*. 2000;9(1):79-82.
181. Huppertz B. Traditional and new routes of trophoblast invasion and their implications for pregnancy diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;21(1):289.
182. Lal A, Thomas MP, Altschuler G, Navarro F, O'Day E, Li XL, et al. Capture of microRNA-bound mRNAs identifies the tumor suppressor miR-34a as a regulator of growth factor signaling. *PLoS genetics*. 2011;7(11):e1002363.
183. Jain CV, Jessmon P, Kilburn BA, Jodar M, Sandler E, Krawetz SA, et al. Regulation of HBEGF by micro-RNA for survival of developing human trophoblast cells. *PloS one*. 2016;11(10):e0163913.
184. Glazov EA, McWilliam S, Barris WC, Dalrymple BP. Origin, evolution, and biological role of miRNA cluster in DLK-DIO3 genomic region in placental mammals. *Molecular biology and evolution*. 2008;25(5):939-48.
185. Capalbo A, Ubaldi FM, Cimadomo D, Noli L, Khalaf Y, Farcomeni A, et al. MicroRNAs in spent blastocyst culture medium are derived from trophectoderm cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment. *Fertility and sterility*. 2016;105(1):225-35. e3.
186. Rosenbluth EM, Shelton DN, Wells LM, Sparks AE, Van Voorhis BJ. Human embryos secrete microRNAs into culture media—a potential biomarker for implantation. *Fertility and sterility*. 2014;101(5):1493-500.
187. Kalousek DK, Barrette IJ, Gärtner AB. Spontaneous abortion and confined chromosomal mosaicism. *Human genetics*. 1992;88(6):642-6.

8. ÖZET

“Kendiliğinden düşük ile sonuçlanan kromozomal olarak normal veya sayısal anomaliye sahip trofoblastik dokularda, plasentogenezde aktivatör ve inhibitör etkili miRNA’ların ekspresyon seviyelerinin araştırılması”

İnsan plasental dokularında farklı ekspresyon düzeyleri olan pek çok mikroRNA (miRNA) tanımlanmıştır. *In vitro* çalışmalar ile miRNA’ların trofoblast hücre proliferasyonunu, göçünü, invazyonunu ve apoptozunu ve anjiyogenezi düzenlediği gösterilmiştir. Riskli gebeliklerde, plasentada miRNA ekspresyonunda farklılıklar bildirilmiştir. Bu nedenle, miRNA’ların plasentanın normal gelişimi için gerekli olması ve ekspresyon farklılıklarının da hatalı plasantasyon ve riskli gebeliklerle ilişkili olması muhtemeldir. Bu çalışmada spontan abortus etiyojisine katkı sağlamak amacıyla plasental gelişim üzerine etkileri bilinen beş miRNA’nın ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir. Çalışma için gerçek fetal karyotipi yansıtan dizomik (XY karyotip) trofoblastik dokular ile sayısal kromozomal anomalili (anöploidi/triploidi) trofoblastik dokular seçilmiştir. Ekspresyon analizi sonucunda spontan abortus materyallerinin tamamında plasenta gelişimi üzerine aktivatör etkili MIR378a-5p, MIR376c ve MIR195 ekspresyonunda azalma, inhibitör etkili MIR34a ve MIR210 ekspresyonunda artış saptanmıştır. İnhibitör etkili MIR34a ekspresyon seviyeleri, dizomik dokular ile karşılaştırıldığında trizomik dokularda daha yüksek oranda bulunmuştur. Ayrıca MIR195 ve MIR34a ekspresyonunda, ileri anne yaşı kaydedilen sitogenetik anomalili trofoblastik dokularda, dizomik dokulara kıyasla artış görülmüştür. Özetle bu tez çalışması,

hatalı plasantasyon ve düşük patofizyolojisinde epigenetik bir yaklaşım olarak miRNA ekspresyon anlizlerinin önemini göstermesi açısından değerli olmakla beraber, bu konuda yapılacak farklı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: kendiliğinden düşük, mikroRNA ekspresyonu, MIR34a

9. SUMMARY

“Investigation of expression levels of activator and inhibitor miRNAs in placentogenesis in trophoblastic tissues with chromosomally normal or numerical anomalies that result in spontaneous abortion”

In placental tissues, various numbers of micro RNAs (miRNAs) and different ranges of their expression have been identified. *In vitro* studies are demonstrated that miRNAs regulate trophoblast cell proliferation, migration, invasion and apoptosis, and angiogenesis. In high-risk pregnancies, different levels of miRNAs expression have been reported. Thus, miRNAs are likely to be essential for normal development of placenta, and differences in miRNA expression are also associated with defective placentation and high-risk pregnancies. In this study, the expression levels of five miRNAs with known effects on placental development had evaluated in order to contribute to the etiology of abortion. For the study, trophoblastic tissues reflecting the true fetal karyotype (disomic XY and aneuploidy/triploidy) were selected. Low level of expression, namely MIR378a-5p, MIR376c, and MIR195 which have activator effect on placental development and high level of expression,

namely MIR34a and MIR210 which have inhibitory effect on placental development, had determined in all of the specimens of abortion tissues. Inhibitory MIR34a expression levels were detected in high level in trisomic trophoblastic tissues compared to disomic trophoblastic tissues. In addition, an increase in MIR195 and MIR34a expression levels was observed in trophoblastic tissues with cytogenetic anomalies with advanced maternal age compared to disomic tissues. In sum, this thesis has value to demonstrate the importance of miRNA expression levels in defective placentation and abort pathophysiology as an epigenetic approach, there is a need for more research on this topic.

Keywords: spontaneous abortion, miRNA expression, MIR34a

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Elvin

Soyadı: Kazancıoğlu

Doğum Yeri ve Tarihi:

Eğitimi:

- Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik (2019-2023)
- Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi (2012-2018)
- Nazilli Anadolu Öğretmen Lisesi (2008-2012)
- Nazilli Fatih Ortaokulu İlköğretim Okulu (2005-2008)
- Nazilli Atatürk İlköğretim Okulu (2000-2005)

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

- Tıbbi Genetik Derneği
- European Society of Human Genetics

Bilimsel Etkinlikleri:

Yayınlar:

- M. Yirmibes Karaoguz (2022). A PARTIAL TRISOMY 9 CASE WITH DICENTRIC CHROMOSOME DUE TO THE ADJACENT-2 SEGREGATION OF MATERNAL RECIPROCAL TRANSLOCATION. Journal of Istanbul Faculty of Medicine, 85(2), 279-284.

Bildiriler:

- Kazancıoğlu E., Tuğ E., Ergün M.A., Kazan H.H., Meral Yirmibeş Karaoğuz. Spontan abortus etiyojisine epigenetik yaklaşım: Trizomik gebeliklerde artmış MIR34a ekspresyonu. 15. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Dalaman, Türkiye. Kasım 2022 [Sözlü Bildiri]
- Kazancıoğlu E., Kayhan G. Duplike CYP21A2 Geni Üzerinde Yerleşen c.955C>T Varyantının Prenatal Danışmadaki Önemi. 7. Uluslararası Erciyes Tıp Tıbbi Genetik Kongresi, Kayseri, Türkiye. Mayıs 2022 [Sözlü Bildiri]
- Kazancıoğlu E., Kayhan G., Ergün M.A. Herediter kolorektal kanser sendromu düşünülen hastalarda multigen panel sonuçlarının değerlendirilmesi. 1. Ulusal HematoOnkoGenetik Kongresi, Belek, Türkiye. Kasım 2021 [Poster Bildiri]
- Kazancıoğlu E., Yirmibeş Karaoğuz M., Tuğ E. Is I-FISH competing with metaphase FISH and cytogenetics, in the diagnosis of prenatal interchange trisomy 21. V. Uluslararası Katılımlı Erciyes Tıp Genetik Günleri Kongresi, Nevşehir, Türkiye. Şubat 2020 [Sözlü Bildiri]
- Sezer A., Kazancıoğlu E., Kayhan G., Türkyılmaz C., Perçin E. F. A new patient with dual diagnosis: not as rare as assumed. 13. Balkan Congress of Human Genetics Organization and Scientific Committees, Edirne, Türkiye. Nisan 2019 [Poster Bildiri]

E-mail: kazanciogluelvin@gmail.com

11. EKLER

11.1. Ek-1: Bilgilendirilmiş Onam Formu-2



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU-2

Tarih:

Aşağıdaki bilgileri okudum,

1- Biyolojik örnek vermeyi ve bu örnekten konvansiyonel kromozom analizi yapılmasını,

☐ Kabul ediyorum

☐ Kabul etmiyorum

Örnek:

- ☐ Periferik venöz kan
- ☐ Cilt materyali
- ☐ İntrakardiyak kan
- ☐ Plasenta

- ☐ Düşük materyali
- ☐ Kemik iliği
- ☐ Solid doku materyali
- ☐ Diğer

2- Verdiğim örnekten doğrulama ve/veya daha ileri tanı için moleküler sitogenetik analizlerin (FISH, mikroarray) yapılmasını,

☐ Kabul ediyorum

☐ Kabul etmiyorum

3- Verdiğim örnekten daha ileri tanı için moleküler analizlerin (DNA dizi analizi vs.) yapılmasını,

☐ Kabul ediyorum

☐ Kabul etmiyorum

***Hastanın
İsim ve imzası***

***Ebeveynin
İsim ve imzası***

***Aile adına sorumlu
kişinin isim ve imzası***

Elde edilen sonuçların kimlik bilgilerim açık olarak kullanılmadan eğitim / araştırma amaçlı bilimsel olarak kullanılmasını,

☐ Kabul ediyorum

☐ Kabul etmiyorum

***Hastanın
İsim ve imzası***

***Ebeveynin
İsim ve imzası***

***Aile adına sorumlu
kişinin isim ve imzası***

- Verdiğiniz örnekten direkt çalışma ve/veya kısa/uzun dönem doku kültürü yapılacak ve sitogenetik/ moleküler sitogenetik / moleküler genetik çalışma sonucu, seçilen yöntemle ilgili olarak 2-8 hafta içinde raporlandırılacaktır.

- Kültürde  reme olmadığı takdirde veya teyit edilmesi gereken patolojik bir sonuç veya mozaik bir sonuç elde edildiğinde, yeniden örnek alınması istenebilir.
- Biyolojik  rnek alımında, girişime bağlı olarak düşük oranda da olsa enfeksiyon, kanama gibi komplikasyonlar gelişebilir.
- Bazı durumlarda ebeveyn ve/veya ailede çalışma istenebilir.
- Sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler genetik analiz sonuçlarını yorumlamak bazen güç olabilir veya alınan sonuçlar örnekteki gerçek durumu yansıtmayabilir. Ayrıca kromozom analizinde küçük yapısal değişimler ve düşük orandaki mozaisizmler değerlendirilemeyebilir.
- Yapılan test var olan riske yönelik olup, sadece riskli hastalık hakkında bilgi verir. Diğer hastalıklarla ilgili bir bilgi veya fikir vermez. Burada yapılan sitogenetik moleküler sitogenetik ve moleküler genetik testlerin normal bulunmasına karşın çocukta genetik veya genetik olmayan başka hastalıklar veya anomaliler ortaya çıkabilir.

11.2. Ek-2: Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar İçin Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (BGOF)



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

**GENETİK MATERYAL ÜZERİNDE YAPILACAK ÇALIŞMALAR İÇİN
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU**

Araştırma Projesinin Adı: *Kendiliğinden düşük ile sonuçlanan kromozomal olarak normal veya sayısal anomaliye sahip trofoblastik dokularda, plasentogenezde aktivatör ve inhibitör etkili miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin araştırılması*

Sorumlu Araştırmacının Adı: Prof. Dr. Meral Yirmibeş Karaoğuz

Diğer Araştırmacıların Adı: Prof. Dr. Mehmet Ali Ergün, Doç. Dr. Esra Tuğ , Arş. Gör. Dr. Elvin Kazancıoğlu, Dr. Hasan Hüseyin Kazan, Ph.D

Destekleyici (varsa): Gazi Üniversitesi BAP destek birimine başvuru yapılacaktır.

“Kendiliğinden düşük ile sonuçlanan kromozomal olarak normal veya sayısal anomaliye sahip trofoblastik dokularda, plasentogenezde aktivatör ve inhibitör etkili miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin araştırılması” isimli bir çalışmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmaya davet edilmenizin nedeni mevcut gebeliğinizin kendiliğinden düşükle sonlanmış olmasıdır. Bu çalışma, araştırma amaçlı olarak yapılmaktadır ve katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Çalışmaya katılma konusunda karar vermeden önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir. Bu araştırma, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda, Prof. Dr. Meral Yirmibeş Karaoğuz'un sorumluluğu altındadır.

Genetik çalışmanın amacı ve dayanağı nelerdir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?

Bu çalışmaya davet edilmenizin nedeni mevcut gebeliğinizin kendiliğinden düşükle sonlanmış olmasıdır. Kendiliğinden düşüklere çoğu kez kromozom sayı kusurları (anomalileri) neden olmaktadır. Daha az oranda da kromozomlar normal olmasına rağmen düşük yine oluşabilmektedir. O nedenle düşük gelişimini etkileyen ifadelenme (ekspresyon) farklılıkları gibi başka genetik nedenler veya genetik dışı

nedenler de söz konusu olabilmektedir. Bu araştırmada da sizin sonucunuz gibi sayısal kromozom anomalisi veya normal kromozom kuruluşu (XY normal) belirlenen düşüklerde bir ifadenme (ekspresyon) çalışması planlanmaktadır.

İfadenme çalışması mikroRNA (miRNA) denilen kalıtsal materyal üzerinde yapılacaktır. Mikro RNA'lar DNA'nın öncülleri olan RNA grubuna dahildir. DNA hücrenin kalıtsal materyalidir ve göz rengi, zeka, kişilik gibi çok sayıda özelliğin oluşmasından sorumludur. RNA'lar DNA'da taşınan genetik bilginin proteine dönüşümünde ara moleküllerdir. Farklı farklı RNA'lar vardır. Çok küçük (mikro) yapıdaki mikroRNA'lar, organizmamızdaki plasentanın gelişimi de dahil olmak üzere pek çok gelişimsel sürece olumlu olumsuz katkı sağlarlar. Bu araştırmada da sizin sonucunuz gibi normal kromozom analizi (XY normal) olan veya sayısal kromozom anomalisi saptanan düşüklerde miRNA ifadenme düzeyleri belirlenerek, kromozomal olarak normal ve anomali olan grupların birbirleri ile karşılaştırılması hedeflenmektedir. Bu amaçla sizin düşük materyalinizin de dahil olduğu toplam **100 hastanın** çalışması planlanmaktadır.

Bu genetik çalışmaya katılmalı mıyım? (Bu bölüm aynen korunacaktır)

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Eğer katılmaya karar verirsiniz bu yazılı bilgilendirilmiş olur formu imzalanmak için size verilecektir. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Böyle bir karar vermeniz durumunda tıbbi bakımınız bu durumdan etkilenmeyecektir.

Genetik araştırma nasıl yapılacaktır?

a. Hangi örnek (ler) alınacak ve nasıl alınacak ?

Gebeliğinizin kendiliğinden düşükle sonuçlanmış olması nedeniyle, Kadın Hastalıkları ve Doğum doktorunuz tarafından daha önce size küretaj işleminin tüm riskleri anlatılıp, onamınız alındıktan sonra düşük materyalinizi laboratuvarımıza getirdiniz. Çalışmamız, kromozom analizi yapıldıktan sonra arta kalan ve -80°C'de dondurularak bekletilen düşük materyali dokusundan yapılacağı için, planlanan çalışma için sizden yeni bir örnek alınmayacaktır.

b. Örnekte neler araştırılacaktır ?

Normal kromozom analizi (XY normal) olan veya sayısal kromozom anomalisi saptanan düşüklerde miRNA ifadenme düzeyleri arasındaki farklılık araştırılacaktır.

c. Örnekler nerede çalışılacaktır ?

Örnekler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Moleküler Laboratuvarı'nda tetkik edilecektir.

d. Genetik örneğin gelecekte nasıl imha edilmesi planlanıyor ?

Örnek uygun saklama koşulları altında laboratuvarımızda muhafaza edilecektir. Sağlık Bakanlığı ve ilgili birimlerin yayınladığı kılavuzlarda yer alan öneriler ve yönergeler doğrultusunda örnekler saklanmaktadır. Örneklerin imhası bu kılavuzlarda yer alan bilgiler doğrultusunda yapılmaktadır.

Tarafımdan alınan örnekler gelecekte de kullanılabilecek mi?

(Bu bölümde katılımcıdan “Tabakalandırılmış olur” olarak isimlendirilen bir onay alınmalıdır. Aşağıda yazılı olan bölüm aynen korunarak katılımcının aşağıdaki 4 seçenekten birini işaretlemesi istenmelidir.)

Tarafınızdan alınan örneğin saklanması ve ileride yapılacak diğer çalışmalarda kullanımı ancak sizin izninize tabidir. Bu örnekler uzun yıllar isminiz (kimlik bilgileriniz) korunmak ya da yok edilmek kaydı ile saklanabilir. Lütfen aşağıdaki seçeneklerden size uygun olan bir tanesini işaretleyiniz.

☐ Tarafımdan alınan kodlanmış* örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.

☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileri çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin, araştırma konusuyla bağlantılı diğer çalışmalarda kullanımını onaylıyorum, ancak farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum, ve gelecekte de her türlü genetik çalışmada anonim (kimliğim ile bağlantısız) olarak kullanılmasını onaylıyorum.

***Kodlanmış örnek:** Sizden alınan örneğe bir kod numarası verilir. Kod numarasını yalnızca araştırmacı bilir ve sizin kimlik bilgilerinize yalnızca araştırmacı ulaşabilir. Böylece kimlik bilgileriniz gizli tutulmuş olur.

Çalışmanın riskleri nelerdir?

Gebeliğinizin kendiliğinden düşükle sonuçlanmış olması nedeniyle, Kadın Hastalıkları ve Doğum doktorunuz tarafından daha önce size küretaj işleminin tüm riskleri anlatılıp, onamınız alındıktan sonra gebelik tahliye materyalinizi bizim

laboratuvarımıza getirdiniz. Çalışmamız bu tahliye materyalinin kromozom analizi yapıldıktan sonra arta kalan ve dondurularak bekletilen bir kısımdan yapılacağı için, planlanan çalışma nedeniyle herhangi bir risk söz konusu değildir.

Çalışmanın yararları nelerdir?

Materyaller arasında mikro RNA ifadelenme seviyelerinde farklılık bulunduğu takdirde bu çalışma, plasenta gelişimi ve düşük oluşumu arasında ilişki kurulabilmesine ve düşük oluşumu ile ilgili farklı çalışmalar planlanmasına olanak sağlayabilecektir. Bu gibi çalışmalar gebelik kayıplarının erken dönemde tespiti veya önlemi konusunda yeni yöntem ve testlerin gelişmesi için faydalı/öncü olabilme potansiyeli taşımaktadır.

Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak? (Bu bölüm aynen korunacaktır)

Çalışma doktorunuz kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır. Çalışmanın sonunda, size ait tüm sonuçlar hakkında bilgi istemeye hakkınız olduğu gibi böyle bir bilgiyi öğrenmeyi reddetme hakkınız da vardır. Lütfen aşağıdaki kutucuklardan size uygun olanı işaretleyiniz:

- ☐ Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri öğrenmek istiyorum
- ☐ Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri öğrenmek istemiyorum.

Çalışma sonuçları çalışma bitiminde tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır. İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik Kurul, Sağlık Bakanlığı ve diğer ilgili sağlık otoriteleri orijinal tıbbi kayıtlarınıza doğrudan erişebilir. Bu yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu imzalayarak yalnızca adı geçen kişi ve kurumlara erişim izni vermiş olacaksınız. Ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacak, kamuoyuna açıklanamayacak; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi kimliğiniz gizli kalacaktır.

(Çalışma için eğer gerekiyorsa aşağıdaki standart durumlar açıklanmalıdır)

- Örnek: Kanınız genetik faktörler açısından test edilecek ve elde edilen bilgi sizin hakkınızda bize genetik bilgi verecektir. Genetik testler, bu araştırma ile ilgisi olmayan size ait çok özel başka bilgiler de verebilir. Böyle bir durumda da gizlilik ilkesine bağlı kalınacak ve bilgiler üçüncü şahıslara sizin onayınız olmaksızın açıklanmayacaktır.)

Bu çalışmaya katılmamanın maliyeti nedir?

Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Çalışmanın ticari bir yönü var mıdır? (Bu bölüm aynen korunacaktır)

Gönüllülerden elde edilen bilgilerden, tıbbi testler ya da tedaviler geliştirilebilmesi gibi ticari bir fayda sağlanabilir. Böyle bir durum olursa, gönüllüler herhangi bir şekilde ticari gelir temin etmeyeceklerdir.

Göreceğim olası bir zarar durumunda ne yapılacak?

Çalışmamız kromozom analizi yapıldıktan sonra arta kalan ve -80 °C dondurularak bekletilen düşük materyalinize ait dokudan yapılacağı için, planlanan çalışma nedeniyle şahsınıza yönelik bir zarar söz konusu değildir.

Daha fazla bilgi, yardım ve iletişim için kime başvurabilirim ?

Araştırma ile ilgili bir sorunuz olduğunda ya da çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksinim duyduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI : Prof. Dr. Meral Yirmibeş Karaoguz
GÖREVİ : Araştırma Yöneticisi
TELEFON :

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

GÜTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalında, Prof. Dr. Meral Yirmibeş Karaoguz/ Dr. Elvin Kazancıoğlu tarafından “*Kendiliğinden düşük ile sonuçlanan kromozomal olarak normal veya sayısal anomaliye sahip trofoblastik dokularda, plasentogenezde aktivatör ve inhibitör etkili miRNA’ların ekspresyon seviyelerinin araştırılması*” isimli tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (*Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim*). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırmadan elde edilen benimle ilgili kişisel bilgilerin gizliliğinin korunacağını biliyorum.

Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin

sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr. Meral Yirmibeş Karaoğuz'u / Dr.Elvin Kazancıoğlu'nu bulabileceğimi ve 0312 202 4644 / 0312 202 4636 numaralı telefonlardan arayabileceğimi biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

AYDINLATMA ve KATILIMCININ BEYANI KESİNLİKLE BİRBİRLERİNİN DEVAMI ŞEKLİNDE OLACAKTIR. AYRI AYRI SAYFALARDA YER ALMAYACAKTIR.