



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Α΄ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΟΥ**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Α. ΡΟΔΟΛΑΚΗΣ**

**ΜΟΝΑΔΑ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ**

**ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ**

**Διπλωματική εργασία**

**Μελέτη του πολυμορφισμού rs4977574 του γονιδίου ANRII σε  
γυναίκες με επανειλημμένες απώλειες κύησης**

**Παναγιώτης Χερουβείμ**

**ΑΘΗΝΑ**

**2022**

## Περίληψη

Έχουν εντοπιστεί πολλοί παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση επανειλημμένων απωλειών κύησης (ΕΑΚ). Οι πιο σημαντικοί από αυτούς τους παράγοντες είναι οι ανατομικές ανωμαλίες, οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες, οι ενδοκρινολογικές διαταραχές, οι θρομβοφιλίες και οι ιδιοπαθείς διαταραχές. Μεταξύ αυτών, κυρίαρχη θέση στην εμφάνιση ΕΑΚ κατέχουν οι θρομβώσεις/θρομβοφιλίες, είτε κληρονομούμενες είτε επίκτητες, οι οποίες αποτελούν και συχνό παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακές νόσους. Το γονίδιο ANRIL έχει προσελκύει ολοένα και αυξανόμενη προσοχή στην πρόσφατη βιβλιογραφία λόγω της συσχέτισης του με τις καρδιαγγειακές νόσους. Ωστόσο, πλέον το ενδιαφέρον εστιάζεται στο να καθοριστεί πιθανή συσχέτιση του ANRIL με τις ΕΑΚ. Αυτός είναι και ο στόχος της παρούσας μελέτης ασθενών-μαρτύρων, η οποία συμπεριλαμβάνει δείγματα περιφερικού αίματος από 56 γυναίκες με ΕΑΚ (ομάδα ΕΑΚ) και 69 γυναίκες μετά από τοκετό ζώντος νεογνού (ομάδα control). Έγινε απομόνωση του DNA από το περιφερικό αίμα και ο πολυμορφισμός ενισχύθηκε με την βοήθεια της PCR. Επίσης, έγινε διαστρωμάτωση της ομάδας ΕΑΚ αναλόγως με τον αριθμό των αποβολών. Το OR για το αλληλόμορφο A για τη σύγκριση μεταξύ των γυναικών με 2 και 3 αποβολές υπολογίστηκε, αφού λήφθηκε υπόψιν η ηλικία και το BMI της μητέρας. Συνολικά, τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν διαφορετικό επιπολασμό του πολυμορφισμού rs4977574 του γονιδίου του ANRIL στις γυναίκες με ΕΑΚ, ενώ μια συσχέτιση με τον αριθμό των αποβολών δεν μπορεί να αποκλειστεί. Επομένως, φαίνεται ότι είναι πιθανόν οι πολυμορφισμοί του γονιδίου του ANRIL παίζουν ρόλο στην εμφάνιση ΕΑΚ. Παρέχοντας έτσι επιπλέον υποστηρικτικά στοιχεία για την υπόθεση της συσχέτισης καρδιαγγειακών νόσων με ΕΑΚ. Περαιτέρω έρευνα χρειάζεται για να

επιβεβαιώσει ή να απορρίψει αυτή τη συσχέτιση καθώς επίσης και να εντοπίσει τους υπεύθυνους μηχανισμούς, εάν αυτοί υπάρχουν.

## **Abstract**

There are many risk factors for recurrent pregnancy loss (RPL). They range from anatomical abnormalities, chromosomal abnormalities, endocrinological dysfunction, thrombophilias, and idiopathic causes. Among them, thromboses/thrombophilias, either inherited or acquired play a major role in RPL development, which is also a common contributing factor to cardiovascular disease. ANRIL gene has attracted increasing attention recently because of its association with cardiovascular disease. However, the potential association of ANRIL with RPL, if any, remains to be established. Thus, the present case-control study involved women with RPL and women following livebirth from a university hospital to investigate this potential correlation. Peripheral blood samples were collected from 56 women with RPL (RPL group) and 69 women following livebirth (Control group). Their DNA was extracted from peripheral blood and polymorphism of interest was enhanced with PCR. RPL group was further stratified according to number of pregnancy losses. OR for the allele A between two and three pregnancy losses was adjusted for maternal age and BMI. Overall, study results suggest different prevalence of ANRIL rs4977574 polymorphism depending on the presence of RPL, while an association with number of RPL cannot be excluded. Consequently, ANRIL gene polymorphism might have a role in the development of RPL. Providing additional evidence for the shared pathophysiological mechanisms hypothesis between cardiovascular diseases and RPL. Further research is required to confirm or reject this correlation and shed light on the underlying mechanism, if one exists.

## Περιεχόμενα

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Γενικό Μέρος.....</b>   | <b>6</b>  |
| <b>1 Εισαγωγή .....</b>  | <b>7</b>  |
| 1.1 Φυσιολογία αναπαραγωγικού συστήματος .....                                       | 7         |
| 1.1.1 Άξονας υποθαλάμου υπόφυσης ωοθηκών.....  | 7         |
| 1.1.2 Εμμηνορρυσιακός Κύκλος.....  | 8         |
| 1.1.3 Κυκλικές αλλαγές του ενδομητρίου .....   | 9         |
| 1.2 Γονιμοποίηση, πρόωμη εμβρυϊκή ανάπτυξη και εμφύτευση .....                       | 12        |
| 1.2.1 Γονιμοποίηση και πρόωμη εμβρυϊκή ανάπτυξη .....                                | 12        |
| 1.2.2 Προετοιμασία ενδομητρίου και εμφύτευση .....                                   | 13        |
| 1.3 Επανειλημμένες απώλειες κύησης (EAK) .....                                       | 15        |
| 1.3.1 Ορισμός - Επιδημιολογία .....  | 15        |
| 1.3.2 Παθοφυσιολογία – Αίτια Επανειλημμένων Απωλειών Κύησης (EAK).....               | 16        |
| 1.4 ANRIL .....  | 25        |
| 1.4.1 Γενικά στοιχεία .....  | 25        |
| 1.4.2 Νοσολογικές συσχετίσεις ANRIL.....   | 26        |
| 1.5 Στόχος της μελέτης.....  | 28        |
| <b>Ειδικό Μέρος.....</b>   | <b>30</b> |
| <b>2 Υλικά και Μέθοδοι .....</b>   | <b>31</b> |
| 2.1 Δείγματα .....   | 31        |
| 2.2 Απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από ολικό αίμα .....                            | 31        |
| 2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....            | 34        |
| 2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτική αγαρόζης (Agarose gel electrophoresis) .....        | 36        |
| 2.5 Στατιστική ανάλυση.....  | 37        |
| <b>3 Αποτελέσματα .....</b>  | <b>39</b> |
| 3.1 Χαρακτηριστικά ασθενών με επανειλημμένες απώλειες κύησης (EAK).....              | 39        |
| 3.2 Αποτελέσματα ANRIL μεταξύ controls και επανειλημμένων απολειών κύησης (EAK)..... | 41        |
| 3.3 Αποτελέσματα ANRIL αναλόγως με τον αριθμό των αποβολών .....                     | 43        |
| <b>4 Συζήτηση .....</b>  | <b>46</b> |
| 4.1 Μοριακοί μηχανισμοί που πιθανόν εξηγούν τις συσχετίσεις με το ANRIL.....         | 49        |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.2 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί.....           | 54        |
| 4.3 Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές..... | 55        |
| <b>Βιβλιογραφία .....</b>                        | <b>56</b> |

# **Γενικό Μέρος**

# 1 Εισαγωγή

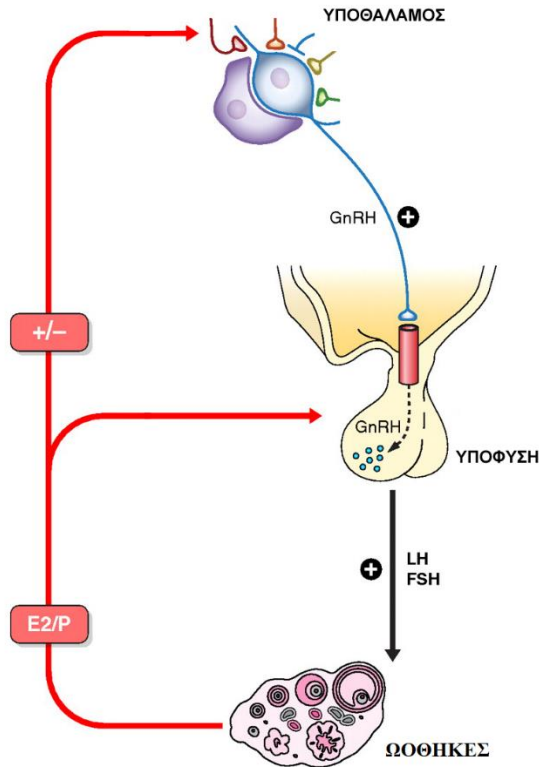
## 1.1 Φυσιολογία αναπαραγωγικού συστήματος

### 1.1.1 Άξονας υποθαλάμου υπόφυσης ωοθηκών

Το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα ρυθμίζεται κυρίως από το σύστημα υποθαλάμου-υπόφυσης-ωοθήκης. Οι νευρώνες που παράγουν γοναδοτροπίνες μετακινούνται περί τη δεύτερη εβδομάδα εμβρυϊκής ζωής από την οσφρητική περιοχή στον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου. Ο πρόσθιος λοβός της υπόφυσης σχηματίζεται αρχικά σαν ένα άνοιγμα στην οροφή του στόματος (Θύλακος Rathke) (1). Αυτή η στενή εμβρυολογική προέλευση και το εκτεταμένο αγγειακό δίκτυο που συνδέει τον υποθάλαμο και τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης εξηγεί την στενή αλληλεπίδραση τους στη λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος.

Ο υποθάλαμος θεωρείται η αρχή του αναπαραγωγικού άξονα. Από εκεί παράγεται ο παράγοντας απελευθέρωσης των γοναδοτροπινών (Gonadotropin releasing hormone, GnRH). Με την σειρά της η GnRH διεγείρει τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης να παράγει την θυλακιοτρόπο (Follicular stimulating hormone, FSH) και ωχρινοτρόπο ορμόνη (Luteinizing hormone, LH) (2). Οι FSH και LH στην συνέχεια δρουν σε συνέργεια, ρυθμίζοντας στενά τη διαδικασία της ωοθυλακιορρηξίας και την παραγωγή οιστρογόνων από την ωοθήκη. Τέλος, υπάρχει μηχανισμός αρνητικού feedback από τα οιστρογόνα στην παραγωγή GnRH και FSH/LH από τον υποθάλαμο και την υπόφυση αντίστοιχα (Εικόνα 1).





**Εικόνα 1.** Άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης ωοθηκών.

### 1.1.2 Εμμηνορρυσιακός Κύκλος

Η FSH και η LH είναι υπεύθυνες για τη ρύθμιση της ωοθυλακιορρηξίας και του εμμηνορρυσιακού κύκλου (3). Ο εμμηνορρυσιακός κύκλος χωρίζεται σε ωοθυλακική και ωχρινική φάση. Η ωοθυλακική φάση ξεκινά την πρώτη ημέρα του κύκλου ή την πρώτη ημέρα της εμμηνορυσίας και διαρκεί συνήθως 10-14 ημέρες μέχρι την ωορρηξία. Κατά την διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης γίνεται η επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου. Χαρακτηρίζεται από αύξηση της FSH λόγω της απώλειας του αρνητικού feedback των οιστρογόνων στην υπόφυση, μετά την εκφύλιση του ωχρού σωματίου από τον προηγούμενο κύκλο. Με την αύξηση της FSH, το κυρίαρχο ωοθυλάκιο ξεκινά να παράγει οιστρογόνα (4). Η αύξηση των

οιστρογόνων οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης υποδοχέων της FSH και της LH στα κοκκώδη κύτταρα της ωοθήκης (5). Αρχικά τα αυξανόμενα επίπεδα οιστρογόνων ασκούν αρνητικό feedback στην παραγωγή LH από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Παρόλα αυτά, στο μέσο του κύκλου παρατηρείται ένα μοναδικό φαινόμενο, όπου το αρνητικό feedback μεταβάλλεται σε θετικό feedback. Τα ολοένα και αυξανόμενα επίπεδα οιστρογόνων προκαλούν την αιχμή της LH, περίπου 10-12 ώρες μετά (3). Ως αποτέλεσμα της αιχμής αυτής προκαλείται η ωοθυλακιορρηξία κατά την οποία απελευθερώνεται το ωοκύτταρο, αφού ολοκληρώσει την πρώτη μειωτική διαίρεση.

Μετά την ωοθυλακιορρηξία, ξεκινά η ωχρινική φάση. Αυτή η φάση παίρνει το όνομα της από την μετατροπή των εναπομεινάντων κυττάρων του κυρίαρχου ωοθυλακίου σε ωχρο σωματίο. Αυτό παράγει προγεστερόνη σε απάντηση στην LH (6). Η προγεστερόνη με τη σειρά της αναστέλλει την έκκριση LH (7). Εάν μετά την ωορρηξία έχουμε γονιμοποίηση και εμφύτευση, η παραγωγή βήτα χοριακής γοναδοτροπίνης από την τροφοβλάστη θα οδηγήσει το ωχρο σωματίο στην παραγωγή προγεστερόνης (8). Ωστόσο, εάν δεν έχουμε γονιμοποίηση, το ωχρο σωματίο εκφυλίζεται και έχουμε πτώση της προγεστερόνης και των οιστρογόνων. Η πτώση αυτή διεγείρει την παραγωγή FSH μέσω του μηχανισμού αρνητικού feedback και την έναρξη του επόμενου κύκλου.

### **1.1.3 Κυκλικές αλλαγές του ενδομητρίου**

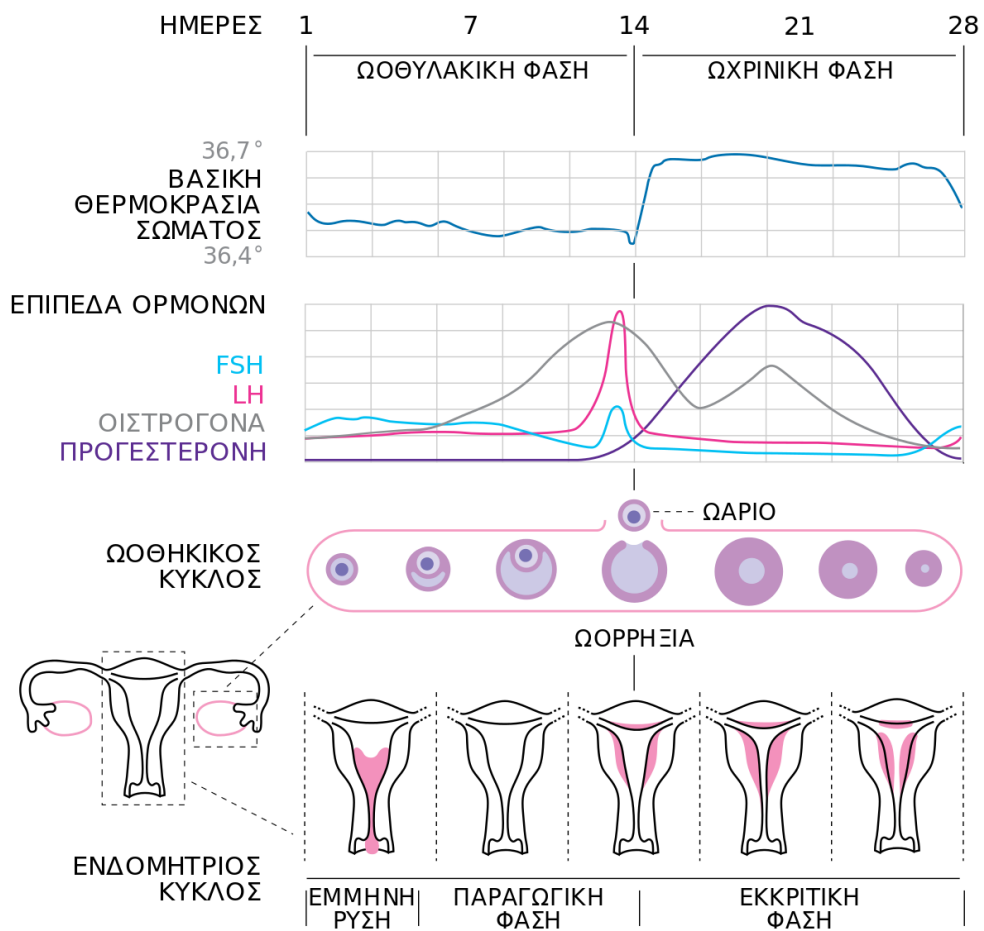
Οι ωοθηκικές ορμόνες προκαλούν τις κυκλικές αλλαγές του ενδομητρίου. Παρομοίως όπως και με τις φάσεις του κύκλου με βάση την ωοθήκη, υπάρχουν και δυο φάσεις με βάση το ενδομήτριο. Η παραγωγική φάση αντιστοιχεί στην

ωοθυλακική φάση της ωοθήκης. Η αύξηση των επιπέδων οιστρογόνων οδηγεί σε ανάπτυξη των αδένων, του διάμεσου ιστού και του ενδοθηλίου του ενδομητρίου. Οι αδένες του ενδομητρίου είναι αρχικά μικρές και στενές δομές αλλά η αύξηση των οιστρογόνων οδηγεί σε ανάπτυξη των αδένων και του διάμεσου ιστού καθώς επίσης και του αριθμού των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο διάμεσος ιστός του ενδομητρίου γίνεται λιγότερο πυκνός. Οι σπειροειδείς αρτηρίες αρχικά δεν έχουν διακλαδώσεις ούτε περιελίξεις, όμως με την δράση των οιστρογόνων αναπτύσσουν ένα εκτεταμένο δίκτυο ακριβώς κάτω από το ενδομήτριο (9).

Μετά την ωοθυλακιορρηξία, τα αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων και προγεστερόνης οδηγούν στην εκκριτική φάση του ενδομητρίου, η οποία αντιστοιχεί στην ωχρινική φάση της ωοθήκης. Η περαιτέρω ανάπτυξη του ενδομητρίου αναστέλλεται από την προγεστερόνη (10). Κατά τη διάρκεια της εκκριτικής φάσης οι σπειροειδείς αρτηρίες εμφανίζουν περισσότερες περιελίξεις, οι αδένες αρχίζουν να αποδομούνται και ο διάμεσος ιστός γίνεται οίδηματώδης.

Με την εκφύλιση του ωχρού σωματίου, τα επίπεδα οιστρογόνων και προγεστερόνης μειώνονται, οδηγώντας σε αποδόμηση το ενδομητρίου. Ο διάμεσος ιστός και οι αδένες ξεκινούν την διαδικασία της απόπτωσης, οδηγώντας σε μείωση του πάχους του ενδομητρίου. Το γεγονός αυτό οδηγεί στη μείωση της αιματικής παροχής στις σπειροειδείς αρτηρίες και τον επακόλουθο αγγειόσπασμο. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η διακοπή της αιματικής παροχής και η ιστική ισχαιμία. Η ισχαιμία οδηγεί σε μια φλεγμονώδη κατάσταση και αύξηση των προσταγλανδινών. Οι προσταγλανδίνες προκαλούν συσπάσεις του μυομητρίου (κράμπες περιόδου) οι οποίες βοηθούν την εκκένωση του ενδομητρίου (11). Επιπλέον, η απόσυρση από την προγεστερόνη οδηγεί σε απελευθέρωση λυσοσωματικών ενζύμων στο κυτταρόπλασμα, εντείνοντας την ιστική νέκρωση (12). Ακολουθώντας, οδηγούμαστε σε

λύση του ενδομητρικού ιστού και εξαγγείωση ερυθρών αιμοσφαιρίων στον διάμεσο ιστό. Η πτώση των επιπέδων προγεστερόνης οδηγεί επίσης στην απελευθέρωση μεταλοπρωτεΐνών, που κατόπιν οδηγούν σε περαιτέρω κυτταρικό θάνατο (13). Το τελικό αποτέλεσμα όλων αυτών των γεγονότων είναι η αποδόμηση του ενδομητρίου καθώς το στρώμα του ενδομητρίου αποβάλλεται από την ενδομητρική κοιλότητα κατά την εμμηνορρυσία. Η *Εικόνα 2* απεικονίζει μια σύνοψη των φάσεων και των γεγονότων του εμμηνορρυσιακού κύκλου.



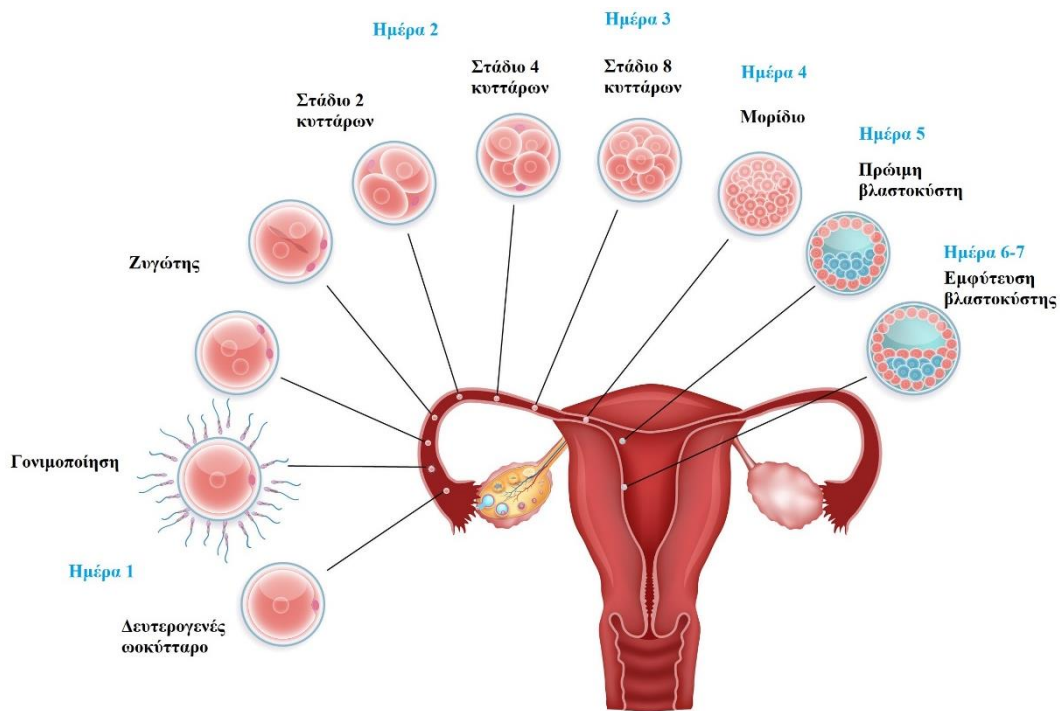
**Εικόνα 2.** Απεικόνιση των φάσεων του εμμηνορρυσιακού κύκλου.

## 1.2 Γονιμοποίηση, πρόιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη και εμφύτευση

### 1.2.1 Γονιμοποίηση και πρόιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη

Μετά την ωοθυλακιορρηξία, το ώριο απελευθερώνεται από την ωοθήκη και προσλαμβάνεται από τους κροσσούς του κώδωνος στην σάλπιγγα. Έπειτα προχωρά μέσα στην σάλπιγγα από τις συσπάσεις των λείων μυϊκών ινών, καθώς επίσης και από την κίνηση των βλεφαρίδων το επιθηλίου των σαλπίγγων, προωθώντας το προς την ενδομητρική κοιλότητα (14).

Η γονιμοποίηση συνήθως συμβαίνει στην λήκυθο του ωαγωγού. Εκεί το σπερματοζώριο εισέρχεται μέσα στο ώριο και εκεί γίνεται συνένωση των δυο πυρήνων, σχηματίζοντας τον ζυγώτη. Η συνένωση των δυο πυρήνων του σπερματοζωαρίου και του ωαρίου αποκαθιστά τον φυσιολογικό διπλοειδικό αριθμό χρωμοσωμάτων στο κύτταρο (15). Ο ζυγώτης φτάνει μετά από περίπου 3 ημέρες στην ενδομητρική κοιλότητα. Κατά τη διάρκεια αυτής της πορείας, ξεκινούν οι κυτταρικές διαιρέσεις και η αρχική ανάπτυξη του εμβρύου. Ο ζυγώτης εμφανίζει ταχείες διαδοχικές κυτταρικές διαιρέσεις (αυλάκωση). Το αποτέλεσμα αυτών των διαιρέσεων είναι ο σχηματισμός της μούρουλας, η οποία αποτελείται από 8-32 κύτταρα. Αυτή συνεχίζει να αναπτύσσεται και σχηματίζει την βλαστοκύστη. Στο στάδιο της βλαστοκύστης, τα κύτταρα διαφοροποιούνται στην τροφοβλάστη, που θα σχηματίσουν τον πλακούντα και την έσω κυτταρική μάζα που τελικά θα σχηματίσουν το έμβρυο (16). Στην *Εικόνα 3* συνοψίζεται η διαδικασία της γονιμοποίησης και της πρόιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης.



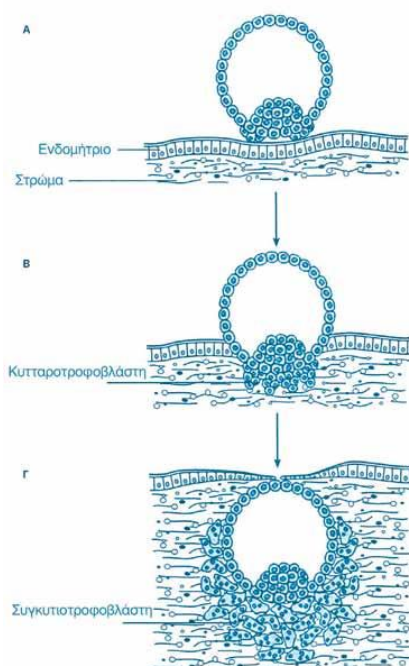
**Εικόνα 3.** Γονιμοποίηση και πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη.

## 1.2.2 Προετοιμασία ενδομητρίου και εμφύτευση

Σε περίπτωση που υπάρξει γονιμοποίηση το ενδομήτριο ξεκινά μια σειρά νέων μορφολογικών και λειτουργικών αλλαγών, για να προετοιμαστεί για την εμφύτευση του εμβρύου. Με την παρουσία του ωχρού σωματίου, τα υψηλά επίπεδα προγεστερόνης οδηγούν σε μια διαδικασία γνωστή ως φθαρτοποίηση του ενδομητρίου. Η παρουσία της προγεστερόνης εμποδίζει την απόπτωση του ενδομητρίου και προκαλεί τη μετατροπή των στρωματικών κυττάρων σε φθαρτικά κύτταρα, τα οποία απελευθερώνουν προλακτίνη, αυξητικό παράγοντα που μοιάζει με ινσουλίνη (insulin-like growth factor), ρελαξίνη και ρενίνη (17). Επομένως, η φθαρτοποίηση είναι μείζονος σημασίας για την αλληλεπίδραση εμβρύου, πλακούντα

και μητέρας. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ευνοϊκού περιβάλλοντος για την εμφύτευση και την ανάπτυξη του εμβρύου.

Μεταξύ της 4<sup>ης</sup> και 6<sup>ης</sup> ημέρας μετά τη γονιμοποίηση, η βλαστοκύστη εμφυτεύεται στη βασική στιβάδα του ενδομητρίου (Εικόνα 4). Η τροφοβλάστη ξεκινά να διαφοροποιείται σε δυο είδη κυττάρων (18). Η εσωτερική στοιβάδα μετατρέπεται σε κυτταροτροφοβλάστη και η εξωτερική στοιβάδα σε συγκυτιοτροφοβλάστη. Η συγκυτιοτροφοβλάστη είναι υπεύθυνη για την παραγωγή προγεστερόνης και βήτα χοριακής γοναδοτροπίνης. Εννέα μέρες μετά τη γονιμοποίηση, η συγκυτιοτροφοβλάστη σχηματίζει τις χοριακές λάχνες, οι οποίες επεκτείνονται προς τη βασική στοιβάδα. Στις λάχνες αυτές θα σχηματιστούν χώροι γεμάτοι με υγρό που τελικά θα ενωθούν με τις φλεβικές κοιλότητες της μητέρας. Μέχρι τη 17<sup>η</sup> ημέρα έχει ολοκληρωθεί η διαδικασία της εμφύτευσης και ξεκινά η μητροπλακουντιακή κυκλοφορία (16). Η εμβρυϊκή κυκλοφορία εγκαθίσταται, όταν τα εμβρυϊκά αγγεία συνδέονται με τα αγγεία της κυτταροτροφοβλάστης.



**Εικόνα 4.** Διαδικασία εμφύτευσης της βλαστοκύστης.

## **1.3 Επανειλημμένες απώλειες κύησης (ΕΑΚ)**

### **1.3.1 Ορισμός - Επιδημιολογία**

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Εταιρίας Ανθρώπινης Αναπαραγωγής και Εμβρυολογίας (European Society of Human Reproduction and Embryology, ESHRE) ως **Επανειλημμένες Απώλειες Κύησης (ΕΑΚ)** ορίζεται η παρουσία δύο ή περισσότερων επαναλαμβανόμενων αποβολών (19). Ως αποβολή ορίζεται η αυτόματη απώλεια της κύησης, πριν το κύημα φτάσει την βιωσιμότητα και πιο συγκεκριμένα από τη στιγμή της σύλληψης μέχρι τις 24 εβδομάδες της κύησης.

Ο προσδιορισμός της επίπτωσης των ΕΑΚ αποτελεί μια πρόκληση και εξαρτάται από το πόσο νωρίς αναγνωρίζουν οι γυναίκες την κύηση. Επιπλέον μέχρι το 2017 δεν υπήρχε συμφωνία στον ορισμό των ΕΑΚ με αποτέλεσμα να δυσκολεύει η σύνοψη αποτελεσμάτων από τις εκάστοτε μελέτες. Υπολογίζεται ότι περίπου το 50% των κυήσεων χάνεται, πριν εντοπιστούν κλινικά (19,20). Βασιζόμενοι σε δεδομένα από μεγάλες μελέτες στην Ευρώπη και στις ΗΠΑ, η μέση επίπτωση των ΕΑΚ υπολογίζεται μεταξύ 1% και 4% των γυναικών που προσπαθούν να πετύχουν εγκυμοσύνη (21,22). Σε μια πρόσφατη μετα-ανάλυση δεν φάνηκε να υπάρχει γεωγραφική διαφορά στην επίπτωση των ΕΑΚ (23). Ωστόσο η αλλαγή της επίπτωσης με τον χρόνο είναι δύσκολο να προσδιοριστεί καθώς όπως προαναφέρθηκε δεν υπήρχε μέχρι πριν λίγα χρόνια συμφωνία για τον ορισμό (19).



## 1.3.2 Παθοφυσιολογία – Αίτια Επανειλημμένων Απωλειών

### Κύησης (ΕΑΚ)

Κάθε κύηση αποτελεί ένα μοναδικό γεγονός αλληλεπίδρασης εμβρύου και ενδομητρίου. Υπάρχουν συγκεκριμένοι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που μπορούν να προκαλέσουν αυτόματη αποβολή, παρόλο που μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των γυναικών. Έχουν αναγνωριστεί διάφοροι παράγοντες κινδύνου για ΕΑΚ (Πίνακας 1).

#### **Πίνακας 1.** Παράγοντες κινδύνου για ΕΑΚ\*.

- Ηλικία μητέρας
- Αριθμός προηγούμενων αποβολών
- Συγγενείς/ επίκτητες δυσμορφίες της μήτρας
- Χρόνια ενδομητρίτιδα
- Βαρύς υποθυρεοειδισμός
- Μη φυσιολογικός καρυότυπος γονέων
- Παχυσαρκία (BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>)

Στο 50-70% των περιπτώσεων ΕΑΚ δεν αναγνωρίζεται κάποιος παράγοντας κινδύνου.

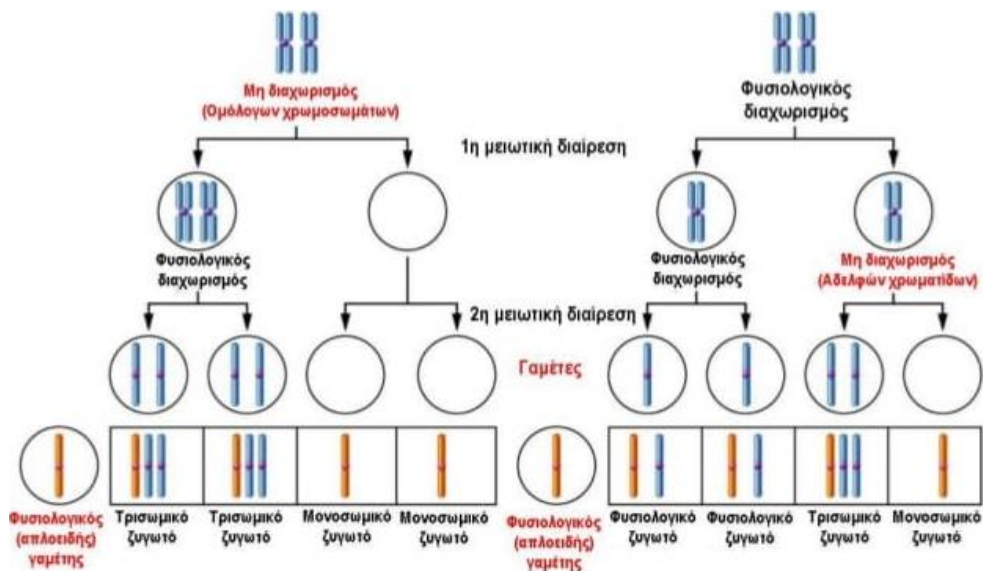
\*Δεδομένα από Αμερικανική Εταιρεία Αναπαραγωγικής Ιατρικής (American Society for Reproductive Medicine, ASRM) (20) και Ευρωπαϊκή Εταιρεία Ανθρώπινης Αναπαραγωγής και Εμβρυολογίας (European Society of Human Reproduction and Embryology, ESHRE) (19).

#### **Γενετικοί παράγοντες**

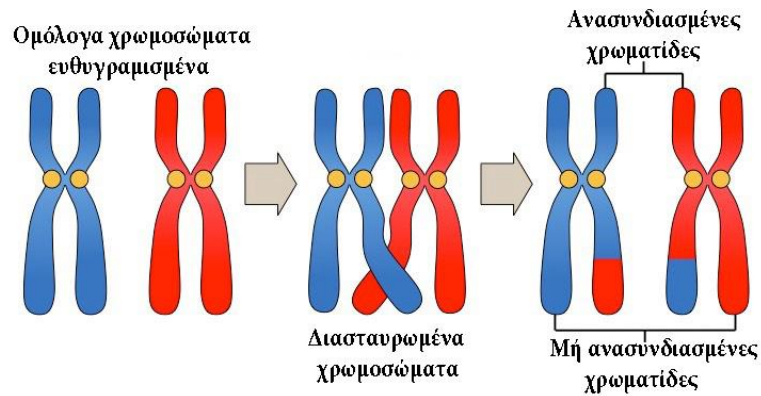
Η ανευπλοειδία του εμβρύου είναι μια συχνή αιτία αποβολής σε γυναίκες με ΕΑΚ (24). Βάση του τυπικού γενετικού ελέγχου, κυρίως με καρυότυπο, η συχνότητα

χρωμοσωματικών ανωμαλιών σε γυναίκες με ΕΑΚ είναι μικρότερη από αυτές με μεμονωμένες αποβολές (25–27). Ωστόσο, πιο ευαίσθητες μέθοδοι, όπως το next-generation sequencing, δείχνουν ότι πιθανόν τα ποσοστά ανευπλοειδίας σε γυναίκες είτε με μεμονωμένες αποβολές είτε με ΕΑΚ είναι παρόμοια (28–30). Κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων θα πρέπει να λαμβάνουμε υπόψιν τον μωσαϊκισμό, καθώς στις περιπτώσεις αυτές μπορεί να έχουμε φυσιολογικές κυήσεις (31).

Η πιο συχνή αιτία εμβρυϊκών χρωμοσωμικών ανωμαλιών είναι ο μη διαχωρισμός κατά τη διάρκεια της μείωσης και οι δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Στην περίπτωση του μη διαχωρισμού υπάρχει αποτυχία διαμοιρασμού ίσου αριθμού χρωμοσωμάτων στα θυγατρικά κύτταρα, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται μονοσωμίες και τρισωμίες. Στην περίπτωση των ανασυνδυασμένων δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών έχουμε μεταφορά γενετικού υλικού είτε στο ίδιο είτε σε διαφορετικά χρωμοσώματα (32) (Εικόνα 5 & 6).



**Εικόνα 5.** Μη διαχωρισμός χρωμοσωμάτων κατά την μείωση.

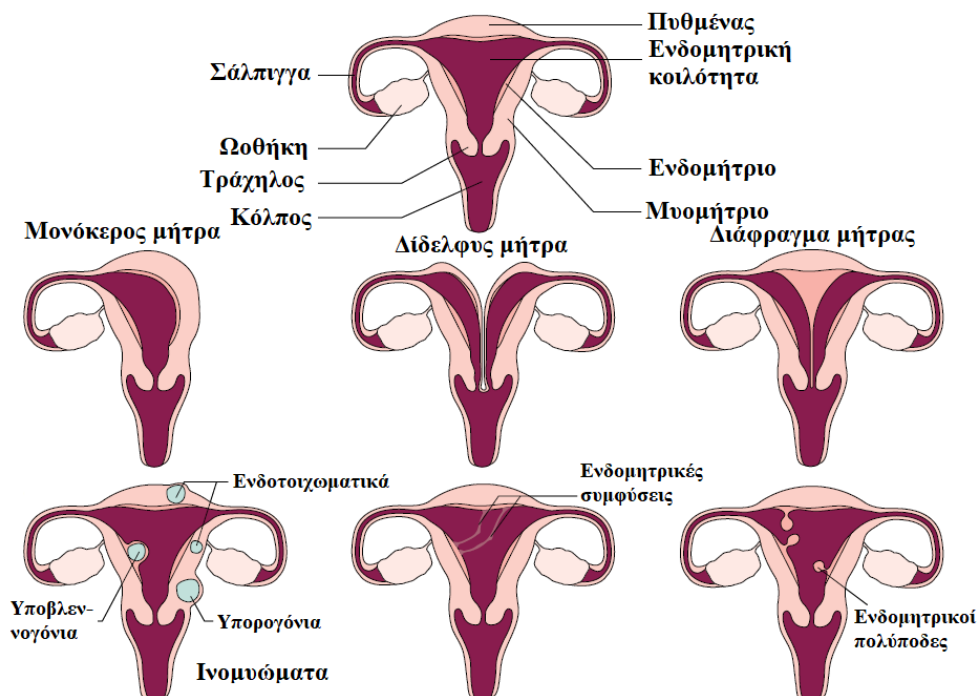


**Εικόνα 6.** Ανασυνδυασμός χρωμοσωμάτων.

Ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση ανευπλοειδιών είναι η μεγάλη ηλικία της μητέρας (33), αλλά, όμως, δεν είναι σαφές κατά πόσο η αύξηση των ανευπλοειδιών με την αύξηση της ηλικίας της μητέρας συμβάλλει στις ΕΑΚ (29,34,35). Το ποσοστό αποβολών που οφείλονταν σε χρωμοσωματικές ανωμαλίες ήταν υψηλότερο στις αποβολές μεταξύ 9 και 14 εβδομάδων κύησης (36). Ανασυνδυασμός χρωμοσωμάτων μπορεί να συμβεί de novo ή μπορεί να προϋπάρχει στους γονείς. Οι δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες στους γονείς είναι συχνότερες στις ΕΑΚ (2-5%), σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό (0.7%) (37,38). Επίσης, αποτελεί σημείο διαμάχης το κατά πόσο ανωμαλίες του σπερματοζωαρίου συμβάλλουν στην εμφάνιση ΕΑΚ. Μερικές μελέτες έχουν βρει ότι οι επιγενετικές τροποποιήσεις του DNA του σπερματοζωαρίου (39) και η αυξημένη κατάτμηση του DNA μπορεί να συμβάλουν στην εμφάνιση ΕΑΚ (40,41). Παρόλα αυτά σε μια μεγάλη μελέτη σε γυναίκες που υποβάλλονταν σε εξωσωματική γονιμοποίηση και ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίου δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ αυξημένης κατάτμησης DNA και κίνδυνου αποβολής (42).

## Διαταραχές της μήτρας

Πολλοί παράγοντες που συμβάλλουν στην εμφάνιση ΕΑΚ συσχετίζονται με τη λειτουργία του ενδομητρίου. Αρχικά οι δομικές ανωμαλίες της μήτρας διαγιγνώσκονται συχνά κατά τη διερεύνηση της υπογονιμότητας και ΕΑΚ. Συγγενείς ανωμαλίες μήτρας (Εικόνα 7) εμφανίζονται συχνότερα σε γυναίκες με ιστορικό αποβολής (13.3%) από ότι στον γενικό πληθυσμό (5.5%) (43). Επιπλέον έχουν γίνει προσπάθειες συσχέτισης επίκτητων ανωμαλιών της μήτρας με εμφάνιση ΕΑΚ. Τα υποβλεννογόνια ινομυώματα, αλλά όχι τα ενδοτοιχωματικά ή τα υπορογόνια, έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο αποβολών. Επιπλέον άλλες καταστάσεις όπως οι ενδομητρικοί πολύποδες και οι ενδομητρικές συμφύσεις έχουν διαγνωστεί σε γυναίκες με ΕΑΚ και υπάρχει η υπόθεση ότι διαταράσσουν την πλακουντοποίηση, χωρίς ακόμα να υπάρχουν καθοριστικά δεδομένα (44) (Εικόνα 7).



**Εικόνα 7.** Συγγενείς και επίκτητες ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας.

### **Χρόνια ενδομητρίτιδα**

Χρόνια ενδομητρίτιδα είναι η τοπική φλεγμονή του ενδομητρίου, που προκαλείται συνήθως από λοιμώξεις. Στις περισσότερες περιπτώσεις είναι ασυμπτωματική ή με ήπια, μη ειδικά συμπτώματα (45). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ποικίλο εύρος των πλασματοκυττάρων που απαιτούνται για την διάγνωση (46) καθιστά δυσχερή την ακριβή εκτίμηση της επίπτωσης στον πληθυσμό. Έχει προταθεί ότι η χρόνια ενδομητρίτιδα προκαλεί αποβολές μέσω της διήθησης του ενδομητρίου από κύτταρα του ανοσοποιητικού. Ωστόσο δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα, που να αποδεικνύουν αιτιολογική σχέση της διήθησης του ενδομητρίου από κύτταρα του ανοσοποιητικού και την εμφάνιση ΕΑΚ. Τα διαθέσιμα δεδομένα είναι περιορισμένα και προέρχονται από μελέτες παρατήρησης που δείχνουν βελτίωση των αποτελεσμάτων σε γυναίκες με ΕΑΚ μετά τη θεραπεία με αντιβιοτικά (47–49). Παρόλα αυτά, δεν υπάρχει σαφές συμπέρασμα, καθώς υπάρχει έλλειψη τυχαιοποιημένων κλινικών δοκιμών.

### **Ανεπάρκεια ωχρινικής φάσης**

Η χαμηλή παραγωγή προγεστερόνης κατά την ωχρινική φάση του εμμηνορροϊκού κύκλου, γνωστή και ως ανεπάρκεια ωχρινικής φάσης, θεωρείται σημαντική αιτία αποβολών, λόγω του κρίσιμου ρόλου της προγεστερόνης για την εμφύτευση και την εγκυμοσύνη. Μια μετα-ανάλυση δύο μεγάλων κλινικών δοκιμών έδειξε ότι η κολπικά χορηγούμενη προγεστερόνη βελτιώνει τα αποτελέσματα σε γυναίκες που παρουσιάζουν κολπική αιμορραγία στην εγκυμοσύνη και έχουν ιστορικό μιας ή περισσότερων αποβολών (50). Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας ήταν μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερος ήταν ο αριθμός των αποβολών.

### Ανοσολογικοί παράγοντες

Το έμβρυο αποτελεί ένα ημι-αλλομόσχευμα και η ανοσολογική ανοχή από την πλευρά της μητέρας είναι απαραίτητη για την επιτυχημένη έκβαση μιας κύησης. Η ανακάλυψη του μηχανισμού ανοσολογικής ανοχής κατά τη διάρκεια της κύησης αποτελεί για δεκαετίες αντικείμενο έρευνας κυρίως σε ό,τι αφορά την αιτιολογία και την αντιμετώπιση ΕΑΚ σχετιζόμενων με ανοσολογικούς μηχανισμούς (51).

Τα λεμφοκύτταρα της βασικής στοιβάδας του ενδομητρίου διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στην αρχή της κύησης, ελέγχοντας και διατηρώντας τη φθαρτοποίηση, προάγοντας τη διείσδυση της τροφοβλάστης, την τοπική αγγειογένεση και αναδιαμόρφωση των σπειροειδών αρτηριών, καθώς επίσης, και καθαρίζοντας τα κυτταρικά θραύσματα μετά την απόπτωση (51). Η ανεπαρκής φθαρτοποίηση και διάφορες καταστάσεις που προκαλούν συστηματική φλεγμονή, όπως η παχυσαρκία (52), μπορούν να προκαλέσουν μια προ-φλεγμονώδη κατάσταση στο ενδομήτριο, που επηρεάζει διάφορες λειτουργίες των λεμφοκυττάρων κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων της κύησης (53).

Τα NK κύτταρα αναγνωρίζουν τα αντιγόνα επιφανείας HLA-G στην τροφοβλάστη και εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες για το έμβρυο (54). Ωστόσο δεν είναι ξεκάθαρο, αν υπάρχει διαταραχή του αριθμού ή της λειτουργίας των NK κυττάρων σε γυναίκες με ΕΑΚ (55). Γι' αυτό το λόγο χρειάζονται περαιτέρω μελέτες, ώστε να καθοριστεί η επίπτωση και ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός, εάν υπάρχει, με τον οποίον συσχετίζονται με τις ΕΑΚ.

Τα T-ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση ανοσολογικής ανοχής μεταξύ μητέρας και εμβρύου (56). Αυτό το συμπέρασμα υποστηρίζεται από μελέτες σε ποντίκια (51), ενώ αντίθετα μελέτες και σε ιστούς από αποβολές ανθρώπινων εμβρύων έχουν δείξει λιγότερα T-ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα και αυξημένα T1- και T17-βοηθητικά λεμφοκύτταρα (57,58).

Τα δενδριτικά κύτταρα με ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες μπορούν να προάγουν τη διαφοροποίηση των T-ρυθμιστικών κυττάρων στο ενδομήτριο αλλά και σε άλλους ιστούς (59). Επιπλέον μειώνονται σημαντικά στη μέση ωχρινική φάση στις γυναίκες με ΕΑΚ (60). Συμπερασματικά, τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι είναι πιθανό η διαταραχή της ανοσολογικής λειτουργίας του ενδομητρίου να παίζει κάποιο ρόλο στις ΕΑΚ.

### **Ενδοκρινικοί παράγοντες**

Διάφορες ενδοκρινολογικές διαταραχές μπορούν να συμβάλουν στην εμφάνιση αποβολών. Ο βαρύς υποθυρεοειδισμός μπορεί να προκαλέσει αποβολή, καθώς επίσης επηρεάζει τη νευρολογική ανάπτυξη του εμβρύου (61,62). Από την άλλη πλευρά ο υποκλινικός υποθυρεοειδισμός δεν φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο για ΕΑΚ (63).

Το σύνδρομο πολυκυστικών ωθηκών ορίζεται σύμφωνα με τα κριτήρια Rotterdam (64), και έχει συσχετιστεί με ένα εύρος επιπλοκών της κύησης, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης κύησης και η προεκλαμψία (65). Ωστόσο δεν υπάρχουν σαφή στοιχεία που να συσχετίζουν το σύνδρομο πολυκυστικών ωθηκών με ΕΑΚ (66,67). Ο επιπολασμός του συνδρόμου πολυκυστικών ωθηκών σε γυναίκες με ΕΑΚ είναι

παρόμοιος με τον γενικό πληθυσμό (66) και η διάγνωση του συνδρόμου δεν επηρεάζει την πρόγνωση των γυναικών με ΕΑΚ (67).

Η παχυσαρκία ( $BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση ΕΑΚ (68,69). Παχύσαρκες γυναίκες με ΕΑΚ έχουν περισσότερες ευπλειδικές αποβολές σε σχέση με τις μη παχύσαρκες γυναίκες (70). Επιπλέον η παχυσαρκία έχει συσχετιστεί με πολλές ενδοκρινικές διαταραχές, όπως το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, ο υποθυρεοειδισμός και ο σακχαρώδης διαβήτης. Παρόλα αυτά όμως αυτές οι συννοσηρότητες μεμονωμένα δεν έχουν σαφείς συσχετίσεις με τις ΕΑΚ (63,66,67). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η παχυσαρκία είναι πιθανόν να επηρεάζει το ενδομήτριο (71), καθώς οι παχύσαρκες γυναίκες φαίνεται να έχουν λιγότερα μεσεγγυματικά βλαστικά κύτταρα στην μέση ωχρινική φάση (72), ενώ επίσης εμφανίζουν και αυξημένα προϊόντα γλυκοζυλίωσης, τα οποία εμποδίζουν την φθαρτοποίηση και τη διείσδυση της βλαστοκύστης (52).

Επιπλέον, για την έλλειψη βιταμίνης D δεν υπάρχουν αρκετά κλινικά δεδομένα για να τη συσχετίσουν με τις ΕΑΚ (73,74). Τέλος, παρόλο που έχουν προταθεί μερικοί πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους η βιταμίνη D μπορεί να οδηγήσει σε αποβολές, όπως η αύξηση των αυτό-αντισωμάτων, συμπεριλαμβανομένου των αντιθυρεοειδικών και των αντιφωσφολιπιδικών (74), ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός δεν είναι ξεκάθαρος.

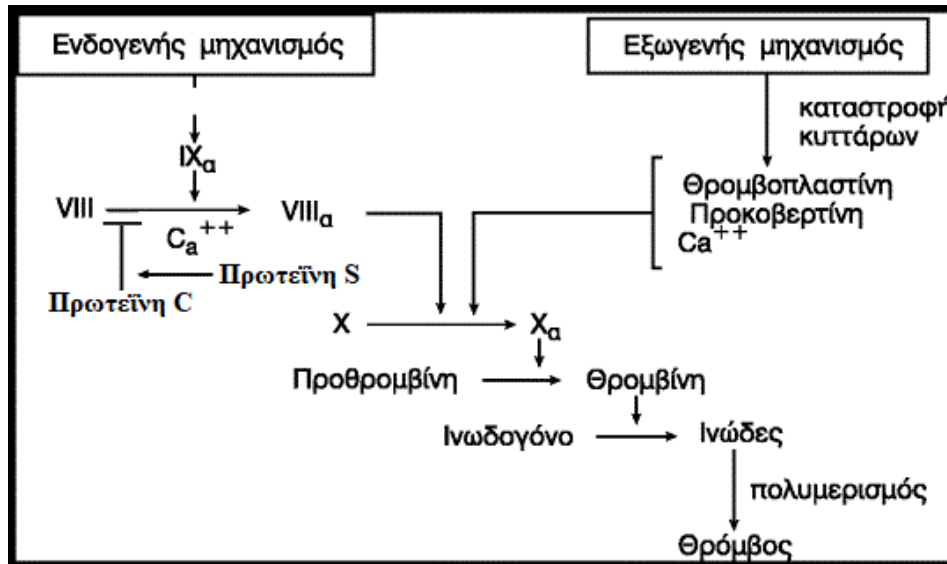
### **Θρομβωτικοί παράγοντες**

Η θρομβοφιλία είναι μια επίκτηση ή κληρονομούμενη διαταραχή που επηρεάζει την πήξη του αίματος και αυξάνει τον κίνδυνο φλεβικής ή αρτηριακής



θρόμβωσης. Επιπλέον η εγκυμοσύνη αποτελεί μια προθρομβωτική κατάσταση και ο συνδυασμός με μια άλλη κατάσταση αυξημένης πήκτικότητας μπορεί να οδηγήσει σε αποβολή καθώς επίσης και σε επιπλοκές που σχετίζονται με διαταραχές του πλακούντα (75). Ο μηχανισμός αυτός θα είναι το επίκεντρο αυτής της εργασίας καθώς όπως θα γίνει εμφανές και παρακάτω το γονίδιο του ANRIL συσχετίζεται με διάφορα καρδιαγγειακά συμβάματα (76–78).

Το ενδιαφέρον για το ρόλο της θρομβοφιλίας στις ΕΑΚ είναι εμφανές για περισσότερα από 25 χρόνια (79). Ο κίνδυνος για αποβολή αυξάνεται στις γυναίκες με θρομβοφιλία (80). Πιο συγκεκριμένα υπάρχει αυξημένος κίνδυνος σε περιπτώσεις μεταλλάξεων που επηρεάζουν τους παράγοντες που συμμετέχουν στην πήξη του αίματος όπως στην πρωτεΐνη C, την πρωτεΐνη S και άλλους παράγοντες που συμμετέχουν στον μηχανισμό πήξης (80–82) (Εικόνα 8).



**Εικόνα 8.** Διάφοροι παράγοντες που συμμετέχουν στον μηχανισμό πήξης

Άλλες καταστάσεις, όπως τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα, μέχρι πριν κάποια χρόνια θεωρούνταν ότι προκαλούσαν ανεξήγητης αιτιολογίας ΕΑΚ. Τα αντισώματα αυτά μπορεί να είναι είτε σε συσχέτιση με συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο (αντιπηκτικό του λύκου), είτε αντισώματα κατά της καρδιολιπίνης (83). Παρόλα αυτά, σε πιο πρόσφατες μελέτες δεν έχουν παρουσιαστεί ξεκάθαρα στοιχεία για αυτές τις συσχετίσεις μεταξύ θρομβοφιλίας και εμφάνιση ΕΑΚ (80–82,84).

## **1.4 ANRIL**

### **1.4.1 Γενικά στοιχεία**

Το γονίδιο του **ANRIL** (**Antisense Non-coding RNA in the INK4 Locus**) είναι μια πολύ πρόσφατη ανακάλυψη από την ανάπτυξη των μελετών συσχέτισης σε όλο το γονιδίωμα (**Genome-Wide Association Studies, GWAS**), μια πρωτοποριακή τεχνική για την μελέτη των γενετικών της αθηρωμάτωσης (85). Η πρώτη δημοσιευμένη μελέτη που συσχετίζει το ANRIL με την αθηρωμάτωση είναι λιγότερο από 15 χρόνια πριν (86). Η ανακάλυψη του έγινε, όταν η μελέτη GWAS αναγνώρισε μια περιοχή στο χρωμόσωμα 9 (9p21), η οποία περιλαμβάνει πολλούς πολυμορφισμούς μονού νουκλεοτιδίου (**Single Nucleotide Polymorphism, SNP**) σε μια περιοχή που δεν περιέχει γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (87–90). Η περιοχή κλειδί των SNPs για τον συσχετισμό αυτό αλληλεπικαλύπτεται με τα εξόνια 13-19 του ANRIL (91,92). Το ANRIL, γνωστό και ως CDKN2B-AS ή CDKN2B-AS1, μεταγράφεται σε αντίθετη κατεύθυνση από το γονιδιακό σύνολο

INK4b-ARF-INK4a, γεγονός από το οποίο προέκυψε και το όνομα του (Antisense Non-coding RNA in the INK4 Locus, ANRIL) (93,94).

## 1.4.2 Νοσολογικές συσχετίσεις ANRIL

Η ανακάλυψη του ANRIL είναι πολλά υποσχόμενη με πιθανές συσχετίσεις και εφαρμογές σε πολλές νοσολογικές οντότητες. Η πιο ισχυρή συσχέτιση φαίνεται να υπάρχει με την τις καρδιαγγειακές νόσους (85,86) αλλά υπάρχουν συσχετίσεις και με μεγάλο εύρος άλλων νόσων, όπως ο τύπου 2 διαβήτης (86,95), η νόσος Alzheimer (96), το γλαύκωμα (97,98), η ενδομητρίωση (99), η περιοδοντίτιδα (100), αλλά και διάφορες μορφές καρκίνου (101) (Πίνακας 2).

### **Πίνακας 2.** Νοσολογικές οντότητες που συσχετίζονται με το ANRIL.

- Καρδιαγγειακά νοσήματα (π.χ. οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και οξύ εγκεφαλικό επεισόδιο) (85,86)
- Σακχαρώδης διαβήτης (86,95)
- Γλαύκωμα (97,98)
- Νόσος Alzheimer (96)
- Πολλαπλή σκλήρυνση (102)
- Ενδομητρίωση (99)
- Περιοδοντίτιδα (100)
- Διάφορες μορφές καρκίνου (101)

Αξιοσημείωτο είναι το μεγάλο εύρος των μορφών καρκίνου που συσχετίζονται με διάφορους πολυμορφισμούς του ANRIL. Αυτό συμβαίνει λόγω της συμμετοχής των μεταγραφών της περιοχής αυτής σε διαφορετικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος που συσχετίζονται με την καρκινογένεση, όπως το ATM-E2F1 (103), PI3K/Akt (104), TGF-β1/ Smad (105), Notch και mTOR (106,107). Μέσω όλων αυτών των σηματοδοτικών μονοπατιών διάφοροι πολυμορφισμοί του ANRIL συσχετίζονται με το πολλούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς με διαφορετικές μορφές καρκίνου, όπως αναφέρονται στον Πίνακα 3.

| <b>Πίνακας 3.</b> Συσχετίσεις ANRIL με διάφορες μορφές καρκίνου. |  |
|--|--|
| <b>Τύπος καρκίνου</b>  | <b>Μηχανισμός συσχέτισης</b>   |
| Μελάνωμα (108)   | Κυτταρική μετανάστευση   |
| Καρκίνος τραχήλου μήτρας (104,109)                               | Κυτταρικός πολλαπλασιασμός, μετανάστευση και διείσδυση                                     |
| Καρκίνος μαστού (110,111)  | Κυτταρικός πολλαπλασιασμός, απόπτωση, κυτταρική γήρανση, αναδιαμόρφωση εξωκυττάριας ουσίας |
| Καρκίνος στοματικής κοιλότητας (112)                             | Κυτταρικός πολλαπλασιασμός, μετανάστευση και διείσδυση                                     |
| Καρκίνος του στομάχου (106,113)                                  | Κυτταρική επιβίωση, μετανάστευση, διείσδυση και απόπτωση                                   |
| Καρκίνος του προστάτη (105)                                      | Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και μετανάστευση  |
| Καρκίνος ρινοφάρυγγα (114,115)                                   | Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και απόπτωση  |

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| Καρκίνος παχέος εντέρου (116,117) | Κυτταρικός πολλαπλασιασμός, μετανάστευση και διείσδυση |
| Οξεία μυελογενής λευχαιμία (118)  | Κυτταρική επιβίωση                                     |
| Ηπατοκυτταρικός καρκίνος (119)    | Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και μετανάστευση            |
| Καρκίνος χοληδόχου κύστης (120)   | Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και απόπτωση                |
| Ωοθηκικός καρκίνος (121)          | Κυτταρικός πολλαπλασιασμός και απόπτωση                |

Τέλος, υπάρχουν ολοένα και περισσότερα δεδομένα που δείχνουν ότι το ANRIL εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα (ΕΚ) των αγγείων, τα λεία μυϊκά κύτταρα (ΛΜΚ), τα μονοπύρρηνα κύτταρα (ΜΚ) και παίζει σημαντικό ρόλο στην δημιουργία και την εξέλιξη των αθηρωματικών πλακών (122–125). Λόγω εναλλακτικού ματίσματος, το ANRIL μπορεί να σχηματίσει τουλάχιστον 20 μετάγραφα, είτε γραμμικά είτε κυκλικά (126–128). Τα δεδομένα που δείχνουν την συμμετοχή του ANRIL στον παθοφυσιολογικό μηχανισμό των αρτηριακών θρομβώσεων θεωρείται ο συνδετικός κρίκος με τις ΕΑΚ.

## 1.5 Στόχος της μελέτης

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι να εξετάσει εάν η παρουσία του πολυμορφισμού rs4977574 στο γονιδίου **ANRIL** (**Antisense Non-coding RNA in the**

**INK4 Locus**) διαφέρει ανάμεσα σε γυναίκες με ή χωρίς ΕΑΚ, καθώς επίσης και αναλόγως με τον αριθμό των αποβολών. Το ενδιαφέρον για την διερεύνηση αυτής της συσχέτισης προέκυψε από τα δεδομένα για τη σύνδεση του ANRIL με διάφορες μορφές καρδιαγγειακών νόσων, οι οποίες πιθανόν να μοιράζονται κοινούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς με τις ΕΑΚ. Επίσης, μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν δεδομένα για την παραπάνω σύνδεση μεταξύ πολυμορφισμών του γονιδίου ANRIL και την εμφάνιση ΕΑΚ.

# **Ειδικό Μέρος**

## **2 Υλικά και Μέθοδοι**

### **2.1 Δείγματα**

Στους συμμετέχοντες συμπεριλαμβάνονται 125 γυναίκες, εκ των οποίων οι 69 συνιστούν την ομάδα ελέγχου της δειγματοληψίας που αποτελείται από γυναίκες που έχουν ολοκληρώσει τουλάχιστον μία επιτυχημένη εγκυμοσύνη και δεν αναφέρεται καμία απώλεια κύησης στο ατομικό τους αναμνηστικό και οι 56 αποτελούν την πειραματική ομάδα, η οποία περιλαμβάνει τις γυναίκες με ιστορικό τουλάχιστον δύο αυτόματων αποβολών, οι οποίες προσήλθαν στο Τμήμα των Επανειλημμένων Αποβολών της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου Αλεξάνδρα.

### **2.2 Απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από ολικό αίμα**

Για την απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από το περιφερικό αίμα των γυναικών χρησιμοποιήσαμε το εμπορικό σκεύασμα PureLink Genomic DNA Kits for purification of genomic DNA της invitrogen by life technologies. Το kit αυτό επιτρέπει τη γρήγορη και αποτελεσματική απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από κύτταρα και ιστούς θηλαστικών, φρέσκα ή κατεψυγμένα δείγματα αίματος, βαμβακοφόρους στυλεούς και ιστούς μονιμοποιημένους με φορμαλίνη και εγκλεισμένους σε παραφίνη (formalin-fixed paraffin-embedded tissues). Το περιφερικό αίμα λαμβάνεται με απλή αιμοληψία περιφερικού αίματος (2-3 ml) και



τοποθετείται σε σωληνάριο που περιέχει αντιπηκτικό, συγκεκριμένα ηπαρίνη ή EDTA, για να αποφευχθεί η πήξη (φιαλίδιο γενικής αίματος).

Αναλυτικά χρησιμοποιήθηκε το προτεινόμενο από τον κατασκευαστή πρωτόκολλο που περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

1. Προσθέτουμε 200 μl φρέσκου ή κατεψυγμένου αίματος σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρησης (Eppendorf tube του 1.5 ml).
2. Προσθέτουμε 20 μl πρωτεΐνάσης K.
3. Προσθέτουμε 20 μl RNAάσης A, αναδεύουμε καλά με αυτόματο αναδευτήρα τύπου δίνης (Vortex) και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
4. Προσθέτουμε 200 μl PureLink Genomic Lysis/ Binding Buffer και αναδεύουμε καλά με αυτόματο αναδευτήρα τύπου δίνης (Vortex), για να αποκτήσουμε ένα ομογενοποιημένο διάλυμα.
5. Επωάζουμε στο υδατόλουτρο στους 55°C για 10 λεπτά για να προωθήσουμε την πέψη των πρωτεϊνών.
6. Προσθέτουμε 200 μl 96-100% αιθανόλη.
7. Αναδεύουμε καλά με αυτόματο αναδευτήρα τύπου δίνης (Vortex) για 5 δευτερόλεπτα, για να παραχθεί ένα ομογενοποιημένο διάλυμα.
8. Μεταφέρουμε το διάλυμα (~640 μl) στην περιστρεφόμενη στήλη PureLink Spin Column.

9. Φυγοκεντρούμε τη στήλη σε 10.000 x g (12.500 rpm) για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Απορρίπτουμε το σωλήνα συλλογής και τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωλήνα συλλογής.
11. Προσθέτουμε 500 μl Wash Buffer 1 στη στήλη.
12. Φυγοκεντρούμε τη στήλη σε 10.000 x g (12.500 rpm) για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
13. Απορρίπτουμε τον σωλήνα συλλογής και τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωλήνα συλλογής.
14. Προσθέτουμε 500 μl Wash Buffer 2 στη στήλη.
15. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στη μέγιστη ταχύτητα για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Απορρίπτουμε τον σωλήνα συλλογής.
16. Τοποθετούμε τη στήλη σε έναν αποστειρωμένο σωλήνα μικροφυγοκέντρησης του 1,5 ml.
17. Προσθέτουμε 150 μl PureLink Elusion Buffer απευθείας στο κέντρο της μεμβράνης της στήλης.
18. Φυγοκεντρούμε τη στήλη στη μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
19. Απορρίπτουμε τη στήλη και πωματίζουμε το σωλήνα φυγοκέντρησης του 1,5 ml.

20. Αποθηκεύουμε το σωλήνα φυγοκέντρισης του 1,5 ml, που περιέχει το απομονωμένο DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα στους -20°C.

Το απομονωμένο DNA που προκύπτει έχει μέγεθος 20-50 kb και είναι κατάλληλο, για να ενισχυθεί με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

## 2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια μέθοδος της μοριακής βιολογίας, η οποία επιτρέπει την αντιγραφή τμήματος αλληλουχίας του DNA σε πολλαπλά αντίγραφα, διευκολύνοντας την περαιτέρω μελέτη του. Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα της θερμοανθεκτικής *Taq* πολυμεράσης, που προέρχεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*, να διατηρεί τη δραστηριότητά της κατά την αποδιάταξη στους 95°C και να έχει τη βέλτιστη δυνατότητα πολυμερισμού στους 72°C, κατά τα διαδοχικά στάδια θέρμανσης και ψύξης, κάτι το οποίο επιτρέπει την αυτοματοποίηση της μεθόδου.

Η PCR περιλαμβάνει επαναλήψεις κύκλων αντιγραφής καθένας εκ των οποίων αποτελείται από τρία στάδια: (1) την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (DNA denaturation) στους 95°C, (2) την αναδιάταξη των εκκινητών (primer annealing) στη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών και (3) την επιμήκυνση των εκκινητών (primer extension) στους 72°C.

Η αντίδραση στηρίζεται στην επέκταση δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers), οι οποίοι υβριδίζονται με αλληλουχίες που βρίσκονται εκατέρωθεν της αλληλουχίας - στόχου του DNA, που επιθυμούμε να ενισχυθεί.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του πολυμορφισμού ANRIL A>G (rs4977574) είναι ο forward 5'-TTGAGGGTACATCAAAAGCATTCCTATATCG-3' και ο reverse 5'-TTTATTAGAGTGACTTGAACATCCCGT-3', οι οποίοι υβριδοποιούνται στους 53°C. Για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης χρησιμοποιούμε ένα πήκτωμα ηλεκτροφόρησης και αναμένουμε 87bp/20bp, 107bp/87bp/20bp και 107bp ολιγονουκλεοτίδια για τους GG, GA και AA γονοτύπους αντίστοιχα.

Τα μείγματα της αντίδρασης προθερμαίνονται στους 95°C για 15 min για να ενεργοποιηθεί η DNA πολυμεράση (1<sup>ος</sup> κύκλος). Το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται στους 95°C, για να διαχωριστούν οι συμπληρωματικές αλυσίδες. Έπειτα η θερμοκρασία ελαττώνεται για να επιτρέψει στους εκκινητές να υβριδοποιηθούν στις συμπληρωματικές αλληλουχίες των αλυσίδων του DNA, ενώ αυτή η θερμοκρασία ποικίλει ανάλογα με τους εκκινητές.

Για να ενισχύσουμε το δείγμα του DNA, είναι απαραίτητο να επαναληφθεί ο κύκλος εναλλαγής θερμοκρασίας 25-40 φορές, κάτι το οποίο επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας έναν θερμοκυκλοποιητή (thermal cycler), ο οποίος είναι προγραμματισμένος να εναλλάσσει τη θερμοκρασία στιγμιαία και ικανός να διατηρεί τα δείγματα στην επιθυμητή θερμοκρασία για το ενδεδειγμένο χρονικό διάστημα που απαιτείται, για να ολοκληρωθεί η αντίδραση.

Το πρωτόκολλο της PCR που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου του ANRIL περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

1. Σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρισης του 0,5 mL προσθέτουμε 2,5μl 10X PCR Buffer minus Mg<sup>2+</sup>, 1μl 10 mM dNTP

mixture, 1  $\mu$ l 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 $\mu$ l Primer Sense mix, 1 $\mu$ l Primer Antisense mix, 2  $\mu$ l Template DNA, 0,3  $\mu$ l Taq DNA polymerase, 16,2  $\mu$ l απεσταγμένο νερό.

2. Τοποθετούμε τα σωληνάρια στον θερμικό κυκλοποιητή, όπου επωάζουμε στους 95°C για 15 λεπτά.
3. Εκτελούμε τα ακόλουθα βήματα για 29 κύκλους: 95°C για 1 λεπτό, 65°C για 1 λεπτό και 72°C για 1 λεπτό.
4. Επωάζουμε τα σωληνάρια στους 72°C για 10 λεπτά και διατηρούμε την αντίδραση στους 4° C.
5. Τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Για να αξιολογήσουμε την επιτυχία της συμβατικής PCR πρέπει να οπτικοποιήσουμε το αποτέλεσμα της, κάτι το οποίο επιτυγχάνεται με post-PCR analysis όπως ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης, η οποία δίνει τη δυνατότητα για την ανίχνευση και την αδρή ποσοτικοποίηση της ενισχυμένης αλληλουχίας.

## **2.4 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης (Agarose gel electrophoresis)**

Η ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης εφαρμόζεται σε όλες εκείνες τις περιπτώσεις που απαιτείται διαχωρισμός και εντοπισμός ή και απομόνωση διακριτών τμημάτων DNA ενός δείγματος. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή ότι η κινητικότητα

των νουκλεϊκών οξέων σε ηλεκτρικό πεδίο καθορίζεται από το μέγεθος και τη δομή τους.

Για τον έλεγχο του αποτελέσματος της αντίδρασης PCR πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR. Το πήκτωμα αγαρόζης που χρησιμοποιείται στο πείραμα έχει περιεκτικότητα 3%, και σε αυτήν προστίθενται 5  $\mu$ L βρωμιούχο αιθίδιο, συγκέντρωσης 5 mg/mL, το οποίο είναι μια φθορίζουσα χρωστική, που καθιστά ορατά τα μόρια DNA κάτω από υπεριώδες φως.

## 2.5 Στατιστική ανάλυση

Για τις αριθμητικές μεταβλητές αναφέρονται μέση τιμή, τυπική απόκλιση, διάμεσος, 25<sup>ο</sup> και 75<sup>ο</sup> εκατοστημόριο. Οι κατηγορικές μεταβλητές αναφέρονται ως απόλυτες τιμές και ποσοστά.

Για τις συγκρίσεις αριθμητικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε T-test, Mann-Whitney U-test, ANOVA και Kruskal-Wallis H-test αναλόγως με τον αριθμό των συγκρινόμενων ομάδων και την κανονικότητα της κατανομής της μεταβλητής. Για τη σύγκριση κατηγορικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε το  $\chi^2$  και το Fisher exact test αναλόγως.

Τα αποτελέσματα για το ANRIL υπολογίστηκαν τόσο μεταξύ controls και ΕΑΚ όσο και μετά από διαστρωμάτωση, αναλόγως με τον αριθμό των αποβολών.

Χρησιμοποιήθηκε λογιστική παλινδρόμηση για να υπολογιστεί ο λόγος odds (Odds Ratio, OR) και το 95% διάστημα εμπιστοσύνης (95% Confidence Interval, 95%CI) για τη σύγκριση της πιθανότητας παρουσίας του αλληλομόρφου A μεταξύ

των γυναικών με 2 και 3 αποβολές. Τα αποτελέσματα του OR προσαρμόστηκαν για την ηλικία και το BMI της μητέρας.

Επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε ως  $p < 0.05$ . Για τη στατιστική ανάλυση έγινε χρήση του στατιστικού λογισμικού SPSS 28.0.

## **3 Αποτελέσματα**

### **3.1 Χαρακτηριστικά ασθενών με επανειλημμένες απώλειες κύησης (ΕΑΚ)**

Στον Πίνακα 4 αναφέρονται τα χαρακτηριστικά των ασθενών με ΕΑΚ. Συνολικά είχαμε δείγματα από 56 γυναίκες με ΕΑΚ. Αυτές είχαν μέση ηλικία 35 έτη και 37.9 έτη οι σύντροφοι τους, ενώ το BMI τους ήταν κατά μέσο όρο 23. Μετά τη διαστρωμάτωση με τον αριθμό των αποβολών, τα αντίστοιχα αποτελέσματα ήταν 33.1, 36.7, και 35.8 έτη για την ηλικία των γυναικών, 34.5, 40.7, και 36.5 έτη για την ηλικία των συντρόφων και 23.1, 22.8, και 24.7 για το BMI, για αριθμό αποβολών 2, 3, και 4. Τέλος, φάνηκε ότι οι γυναίκες με 2 αποβολές είχαν μεγαλύτερη ηλικία (33.1 vs 36.7 έτη,  $p=0.019$ ) καθώς επίσης και οι σύντροφοι τους (34.5 vs 40.7 έτη,  $p=0.027$ ) σε σχέση με τις γυναίκες με 3 αποβολές.

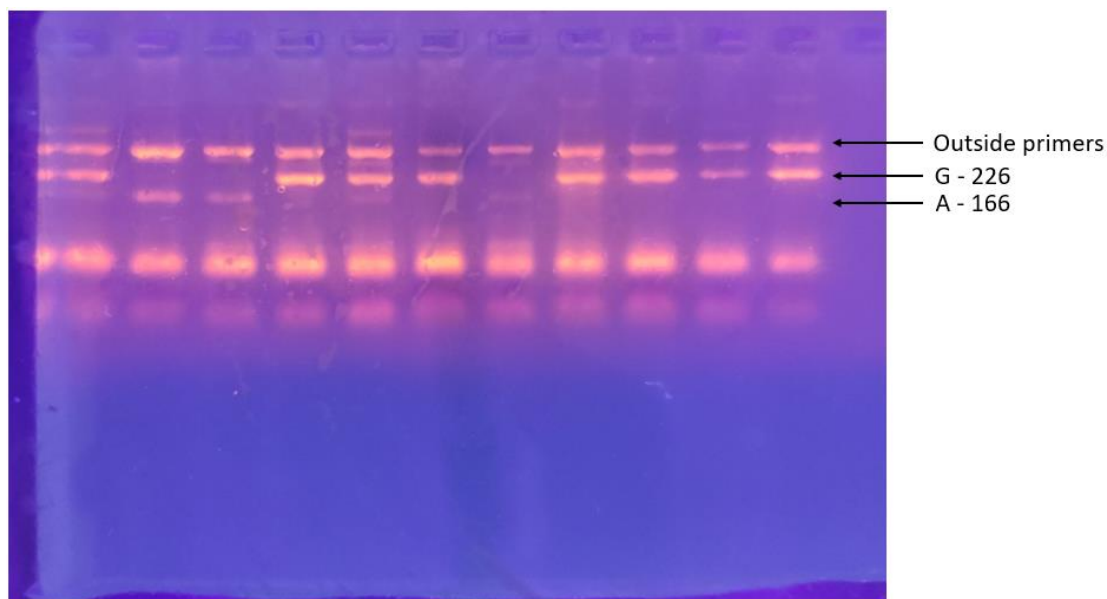


**Πίνακας 4.** Χαρακτηριστικά ασθενών με ΕΑΚ.

| Μεταβλητή   | Σύνολο ΕΑΚ (N=56)                     | 2 Αποβολές (N=26)                     | 3 Αποβολές (N=26)                     | 4 Αποβολές (N=4)                     | p-value (2 vs 3 Αποβολές) |
|---|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| <b>Ηλικία γυναίκας (έτη)</b><br>Μέση τιμή (Τυπική απόκλιση)<br>Διάμεσος (25 <sup>ο</sup> , 75 <sup>ο</sup> εκατοστημόριο)<br>N  | 35.0 (5.7)<br>35.0 (31.0, 40.0)<br>56 | 33.1 (5.6)<br>33.0 (30.0, 38.0)<br>26 | 36.7 (5.2)<br>38.0 (32.0, 41.0)<br>26 | 35.8 (7.3)<br>34.0 (30.0, 43.3)<br>4 | 0.019                     |
| <b>ΒΜΙ</b><br>Μέση τιμή (Τυπική απόκλιση)<br>Διάμεσος (25 <sup>ο</sup> , 75 <sup>ο</sup> εκατοστημόριο)<br>N                    | 23.0 (3.1)<br>22.5 (20.3, 25.1)<br>50 | 23.1 (3.2)<br>22.7 (20.7, 24.2)<br>24 | 22.8 (3.1)<br>22.1 (20.2, 25.7)<br>24 | 24.7 (0.4)<br>24.7 (24.7, -)<br>2    | 0.914                     |
| <b>Ηλικία συντρόφου (έτη)</b><br>Μέση τιμή (Τυπική απόκλιση)<br>Διάμεσος (25 <sup>ο</sup> , 75 <sup>ο</sup> εκατοστημόριο)<br>N | 37.9 (5.8)<br>37.0 (34.0, 40.0)<br>23 | 34.5 (3.7)<br>34.5 (31.8, 38.5)<br>10 | 40.7 (6.7)<br>37 (36, 46)<br>11       | 36.5 (0.7)<br>36.5 (36.0, -)<br>2    | 0.027                     |

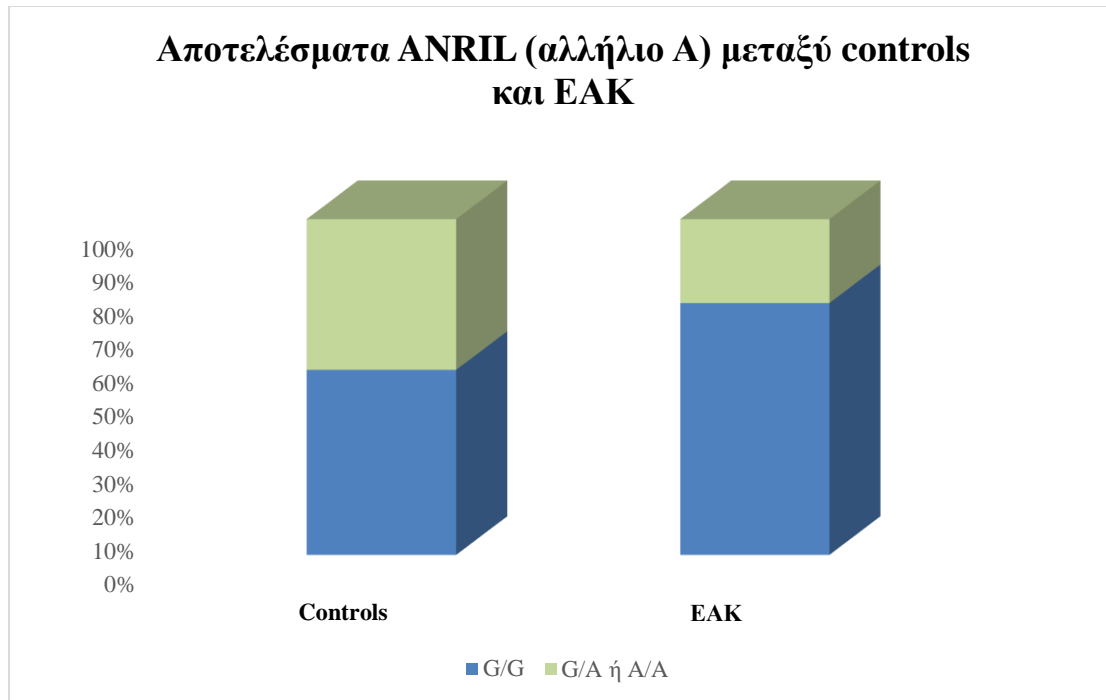
### 3.2 Αποτελέσματα ANRIL μεταξύ controls και επανειλημμένων απωλειών κύησης (ΕΑΚ)

Τα αποτελέσματα υπολογίστηκαν με βάση τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε συγκεκριμένες ζώνες (Εικόνα 9). Τα αποτελέσματα των πολυμορφισμών του ANRIL μεταξύ των control και των ΕΑΚ βρίσκονται στον Πίνακα 5. Οι γυναίκες στην ομάδα των controls εμφάνιζαν στατιστικά σημαντική υψηλότερη συχνότητα το αλληλόμορφο Α σε σχέση με τις γυναίκες με ΕΑΚ [31 (44.9%) controls vs 14 (25%) ΕΑΚ,  $p=0.021$ ] (Εικόνα 10). Από αυτές, 9 γυναίκες στην ομάδα των controls και 3 (5.4%) ήταν ομόζυγες για το αλληλόμορφο Α (Α/Α). Όταν η ανάλυση έγινε με βάση το γονότυπο τα αποτελέσματα δεν έφτασαν το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ( $p=0.062$ ) (Εικόνα 11).

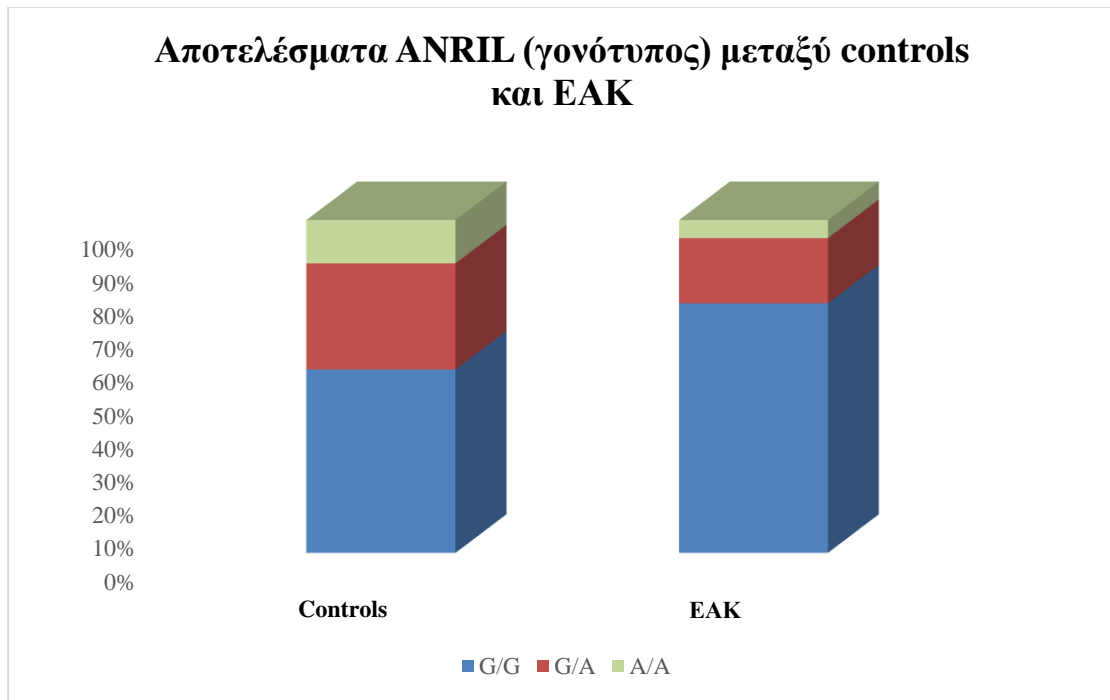


**Εικόνα 9.** Έλεγχος του αποτελέσματος της PCR με την χρήση βρωμιούχο αιθιδίου μετά από ηλεκτροφόρηση.

| <b>Πίνακας 5.</b> Αποτελέσματα πολυμορφισμών του ANRIL μεταξύ controls και ΕΑΚ. |                        |                   |  |
|---|------------------------|-------------------|--|
| <b>Πολυμορφισμός ANRIL</b>  | <b>Controls (n=69)</b> | <b>ΕΑΚ (n=56)</b> | <b>p-value</b>   |
| G/G   | 38 (55.1%)             | 42 (75%)          | 0.062, για τον γονότυπο<br>0.021, για την παρουσία (A) |
| G/A   | 22 (31.9%)             | 11 (19.6%)        |  |
| A/A   | 9 (13%)                | 3 (5.4%)          |  |



**Εικόνα 10.** Αποτελέσματα αλληλομόρφου A για το ANRIL μεταξύ των controls και των ΕΑΚ.



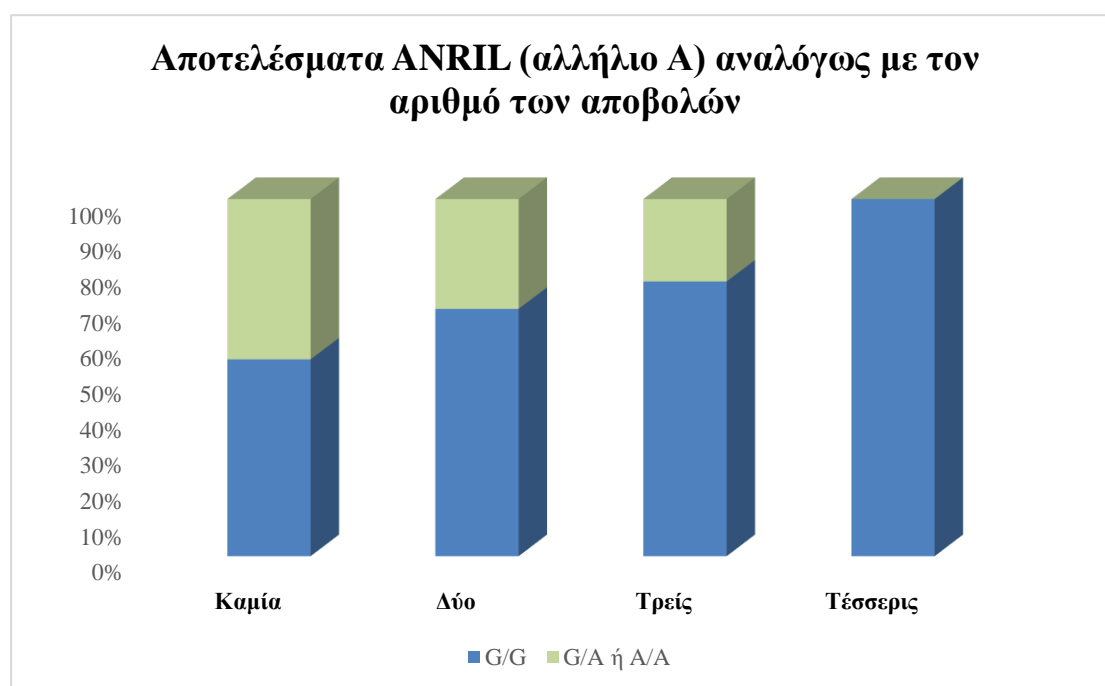
**Εικόνα 11.** Αποτελέσματα γονοτύπων για το ANRIL μεταξύ των controls και των ΕΑΚ.

### 3.3 Αποτελέσματα ANRIL αναλόγως με τον αριθμό των αποβολών

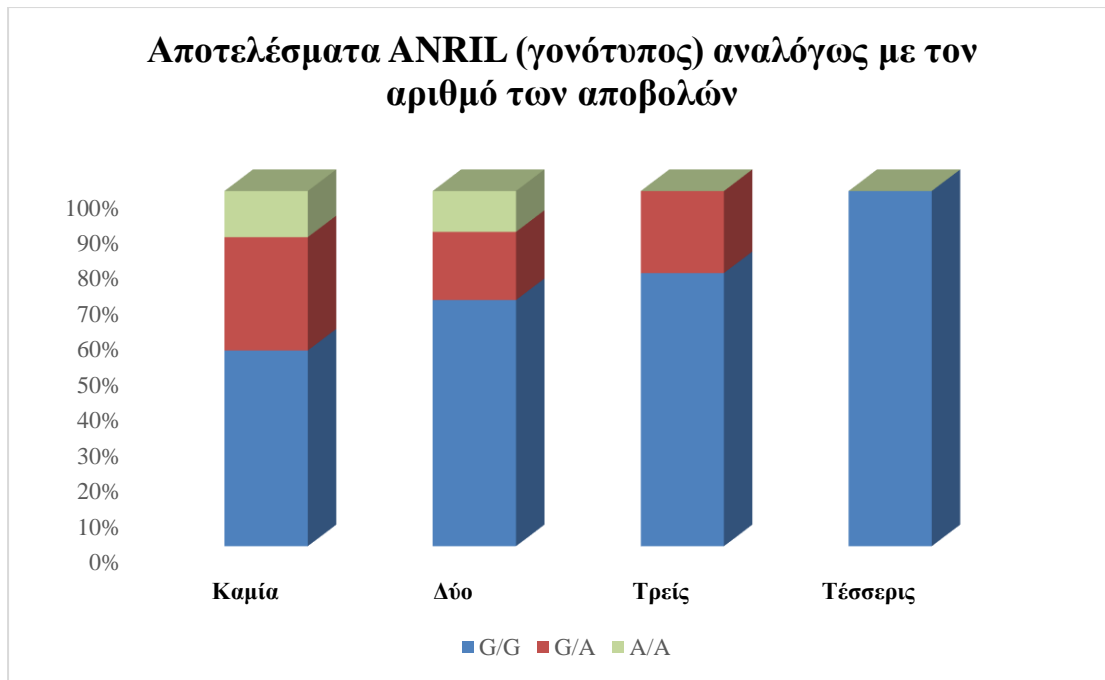
Ο Πίνακας 6 παρουσιάζει τα αποτελέσματα μετά τη διαστρωμάτωση, αναλόγως με τον αριθμό των αποβολών. Η πρώτη ομάδα χωρίς αποβολές ισοδυναμεί με την ομάδα των controls. Αναλόγως με τον αριθμό των αποβολών βρέθηκε να υπάρχει μια διαφοροποίηση στο ποσοστό των γυναικών που είχαν το αλληλόμορφο A. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση του ποσοστού των γυναικών που είχαν το αλληλόμορφο A με την αύξηση του αριθμού των αποβολών, ωστόσο οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Τριάντα μια (44.9%) γυναίκες χωρίς

εμφάνιση αποβολών είχαν το αλληλόμορφο A, 8 (30.7%) γυναίκες με δυο αποβολές, 6 (23.1%) με 3 αποβολές, και καμία με τέσσερις αποβολές ( $p=0.078$ ) (Εικόνα 12). Όταν έγινε η ανάλυση με βάση το γονότυπο, 9 (13%) γυναίκες χωρίς αποβολή, 3 (11.5%) με δυο αποβολές και καμία με τρεις αποβολές ήταν ομόζυγες για το παθολογικό αλληλόμορφο (A/A) ( $p=0.188$ ) (Εικόνα 13).

| <b>Πίνακας 6.</b> Αποτελέσματα πολυμορφισμών του ANRIL μεταξύ controls και ΕΑΚ μετά την διαστρωμάτωση αναλόγως με τον αριθμό των αποβολών. |                     |                   |                     |                       |   |
|--|---------------------|-------------------|---------------------|-----------------------|---|
| <b>Πολυμορφισμός ANRIL</b>   | <b>Καμία (n=69)</b> | <b>Δύο (n=26)</b> | <b>Τρεις (n=26)</b> | <b>Τέσσερις (n=4)</b> | <b>p-value</b>  |
| G/G  | 38 (55.1%)          | 18 (69.3%)        | 20 (76.9%)          | 4 (100%)              | 0.188, για τον γονότυπο<br>0.078, για την παρουσία<br>(A) |
| G/A  | 22 (31.9%)          | 5 (19.2%)         | 6 (23.1%)           | 0 (0%)                |   |
| A/A  | 9 (13%)             | 3 (11.5%)         | 0 (0%)              | 0 (0%)                |   |



**Εικόνα 12.** Αποτελέσματα αλληλομόρφου A για το ANRIL αναλόγως με τον αριθμό των αποβολών.



**Εικόνα 13.** Αποτελέσματα γονοτύπων για το ANRIL αναλόγως με τον αριθμό των αποβολών.

Τέλος, υπολογίστηκε ο λόγος των odds (OR) για την παρουσία του αλληλομόρφου A μεταξύ των γυναικών με 2 και 3 αποβολές. Πριν ληφθεί υπόψιν η ηλικία και το BMI της μητέρας το OR ήταν 0.675, με 95% διάστημα εμπιστοσύνης (95%CI) 0.196-2.322 ( $p=0.533$ ). Αφού ληφθεί υπόψιν η ηλικία και το BMI της μητέρας, τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια και μη στατιστικά σημαντικά [adjOR(95%CI): 0.535(0.135-2.131),  $p=0.375$ ] (Πίνακας 7).

| <b>Πίνακας 7.</b> Λογιστική παλινδρόμηση για την παρουσία του αλληλομόρφου A μεταξύ των γυναικών με 2 και 3 αποβολές. |                     |
|---|---------------------|
| <b>OR (95%CI)</b>   |                     |
| <b>Μη προσαρμοσμένο</b>   | 0.675 (0.196-2.322) |
| p-value   | 0.533               |
| <b>Προσαρμοσμένο*</b>   | 0.535 (0.135-2.131) |
| p-value   | 0.375               |

\*Προσαρμοσμένο για την ηλικία και το BMI της μητέρας.

## 4 Συζήτηση

Η μελέτη αυτή εξέτασε εάν η παρουσία του πολυμορφισμού rs4977574 στο γονίδιο ANRIL διαφέρει ανάμεσα σε γυναίκες με ή χωρίς ΕΑΚ, καθώς και με τον αριθμό των αποβολών. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι γυναίκες με ΕΑΚ εμφανίζουν λιγότερο συχνά το αλληλόμορφο Α σε σχέση με αυτές χωρίς, με μεγαλύτερο ποσοστό αυτών να είναι ετερόζυγες (G/A). Όταν έγινε ανάλυση με βάση τον αριθμό των αποβολών, οι γυναίκες με μεγαλύτερο αριθμό αποβολών φάνηκε να έχουν σε μικρότερο ποσοστό το αλληλόμορφο Α, παρόλο που οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Αφού λήφθηκαν υπόψη η ηλικία και το BMI της μητέρας, τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια. Φαίνεται επομένως ότι υπάρχει μια συσχέτιση του πολυμορφισμού rs4977574 στο γονίδιο του ANRIL με την παρουσία ΕΑΚ, ενώ μια συσχέτιση με τον αριθμό των αποβολών με βάση τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν δεδομένα για τον επιπολασμό πολυμορφισμών του γονιδίου του ANRIL σε γυναίκες με ΕΑΚ. Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που διερευνά την παρουσία πολυμορφισμών του γονιδίου του ANRIL σε γυναίκες με ΕΑΚ. Από την άλλη πλευρά είναι φανερό ότι πολυμορφισμοί του γονιδίου του ANRIL συσχετίζονται με εμφάνιση καρδιαγγειακών νόσων (85,86). Πιο συγκεκριμένα ο πολυμορφισμός rs4977574 έχει φανεί από δυο πρόσφατες μετα-αναλύσεις ότι συσχετίζεται με αύξηση του κινδύνου για στεφανιαία νόσο (129,130). Και οι δυο μελέτες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το αλληλόμορφο G του πολυμορφισμού συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο (129,130). Τα αποτελέσματα μας δείχνουν αυξημένο ποσοστό του αλληλομόρφου G σε γυναίκες με καθ' ἑξιν αποβολές. Υποθέτουμε επομένως ότι είναι πιθανόν να υπάρχει ένας κοινός

παθοφυσιολογικός μηχανισμός που συνδέει τις δυο νοσολογικές οντότητες. Το ενδιαφέρον θα εστιαστεί στη σύνδεση των αποτελεσμάτων μας με όσα είναι γνωστά μέχρι σήμερα για τις ΕΑΚ και τους μηχανισμούς με τους οποίους πιθανόν να συνδέεται το ANRIL με την εμφάνιση καρδιαγγειακών νόσων.

Φαίνεται πως ο κύριος ο υποκείμενος μηχανισμός που εξηγεί αυτή την συσχέτιση είναι η εμφάνιση και η εξέλιξη της αθηρωμάτωσης, η οποία έχει συσχετιστεί με τον πολυμορφισμό rs4977574 τόσο στα στεφανιαία αγγεία (131), όσο και στις καρωτίδες (132,133), και η οποία πιθανόν είναι ανεξάρτητη της υπέρτασης (134). Επίσης φαίνεται ότι η κατανάλωση λαχανικών, κρασιού (135) και το κάπνισμα (136) αλληλοεπιδρούν με τον πολυμορφισμό αυτόν τροποποιώντας τον κίνδυνο για την εμφάνιση καρδιαγγειακών νόσων. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας και η θρόμβωση του αγγείου (131). Αναλόγως με το αγγείο που θα προσβληθεί, εξηγείται η συσχέτιση που παρατηρείται μεταξύ του πολυμορφισμού rs4977574 και του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου (129,137) ή του οξέος ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου (138).

Από την άλλη πλευρά, στη σύγχρονη βιβλιογραφία έχουν ταυτοποιηθεί διάφοροι παράγοντες κινδύνου που προδιαθέτουν για την εμφάνιση ΕΑΚ (139). Μεταξύ αυτών προεξέχουσα θέση κατέχουν οι θρομβώσεις/θρομβοφιλίες. Συχνά κατά την διερεύνηση των αιτιών αυτών η προσοχή μας εστιάζεται στις φλεβικές θρομβώσεις. Στα αίτια των φλεβικών θρομβώσεων συγκαταλέγονται οι μεταλλάξεις παραγόντων που συμμετέχουν στον καταρράκτη της πήξης, όπως ο παράγοντας V Leiden και η προθρομβίνη (140), οι οποίες συχνά αναφέρονται ως κληρονομήσιμες θρομβοφιλίες. Παρόλα αυτά, αυτές ίσως να μην αποτελούν τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα, καθώς υπάρχουν μελέτες οι οποίες δεν κατάφεραν να δείξουν σημαντική συσχέτιση (141,142). Η ESHRE (European Society of Human Reproduction and



Embryology) και ο ASRM (American Society for Reproductive Medicine) συστήνουν να μην γίνεται διερεύνηση για κληρονομήσιμες θρομβοφιλίες σε γυναίκες με ΕΑΚ (19,143). Ακόμα και σε περιπτώσεις που υπάρχει φλεβική θρομβοεμβολική νόσος η αξία της διερεύνησης και αντιμετώπισης αυτών των αιτιών δεν είναι ξεκάθαρη (144). Από την άλλη πλευρά συστήνεται και από τους δυο οργανισμούς να γίνεται έλεγχος για επίκτητες θρομβοφιλίες, όπως το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (19,143). Ένα από τα κύρια κριτήρια για τη διάγνωση του συνδρόμου είναι η παρουσία θρόμβωσης, η οποία μπορεί να είναι αρτηριακή (145). Η θεραπεία αυτών των καταστάσεων σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις περιλαμβάνει χαμηλή δόση ασπιρίνης (146). Παρομοίως, η πρόληψη και η θεραπεία πολλών καρδιαγγειακών νόσων βασίζεται μεταξύ άλλων στη χορήγηση χαμηλής δόσης ασπιρίνης (147). Ο κύριος στόχος της ασπιρίνης είναι η πρόληψη της συγκόλλησης των αιμοπεταλίων και της δημιουργίας θρόμβου μετά από ρήξη της αθηρωματικής πλάκας (148). Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, γίνεται εμφανής η σημασία της αρτηριακής θρόμβωσης στην παθοφυσιολογία των ΕΑΚ.

Όλα αυτά τα στοιχεία είναι υποστηρικτικά της υπόθεσης μας ότι οι ΕΑΚ και οι καρδιαγγειακές νόσοι μοιράζονται κάποιους κοινούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς, στους οποίους εμπλέκεται το γονίδιο του ANRIL και οι πολυμορφισμοί του, εξηγώντας τις συσχετίσεις που παρατηρούνται. Μια πιθανή ερμηνεία είναι ότι το αλληλόμορφο G στον πολυμορφισμό rs4977574 αυξάνει τον κίνδυνο για αθηρωμάτωση (131–133) και κατ' επέκταση της αρτηριακής θρόμβωσης, οδηγώντας αναλόγως με την θέση του αγγείου που προσβάλλεται σε οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (129,137), οξύ ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο (138), ή ΕΑΚ.

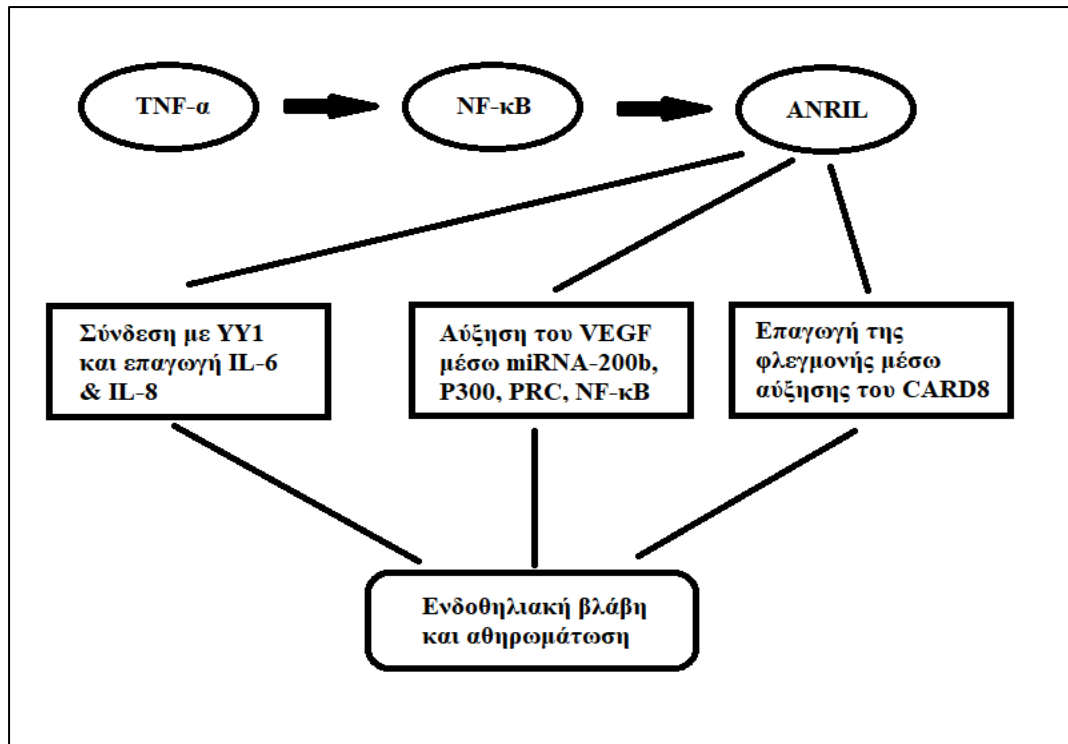
Διερευνώντας τον κοινό παθοφυσιολογικό μηχανισμό που υποθέτουμε ότι υπάρχει πιο διεξοδικά, αναλύονται παρακάτω διαφορετικοί μοριακοί μηχανισμοί με

τους οποίους πιθανόν το ANRIL να συμμετέχει στον σχηματισμό, τη ρήξη και τη θρόμβωση της αθηρωματικής πλάκας. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της έκφρασης του ANRIL στα ενδοθηλιακά κύτταρα (ΕΚ) των αγγείων, τα λεία μυϊκά κύτταρα (ΛΜΚ), τα μονοκύτταρα κύτταρα (ΜΚ) (122–125).

#### **4.1 Μοριακοί μηχανισμοί που πιθανόν εξηγούν τις συσχετίσεις με το ANRIL**

Διάφορες μελέτες έχουν διαλευκάνει πολλούς μοριακούς μηχανισμούς με τους οποίους μπορούν να συσχετιστούν διαφοροποιήσεις του γονιδίου του ANRIL με τις καρδιαγγειακές νόσους. Κατά προέκταση, οι μηχανισμοί αυτοί μπορεί να εξηγούν την συσχέτιση που βρέθηκε στην παρούσα μελέτη με τις ΕΑΚ. Η μεταβολή της έκφρασης του ANRIL στα ΕΚ των αγγείων συμμετέχει στη φλεγμονώδη αντίδραση και επιταχύνει την ενδοθηλιακή βλάβη που συσχετίζεται με την αθηρωμάτωση. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω του μονοπατιού TNF- $\alpha$ -NF- $\kappa$ B-ANRIL/YY1-IL6/8 (149), την αύξηση της έκφρασης του CARD8 (CAspase **R**ecruitment **D**omain-containing protein **8**) (150) και του VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (151). Ο προφλεγμονώδης παράγοντας TNF- $\alpha$  επάγει την έκφραση του ANRIL, η οποία μειώνεται μετά τη σίγαση του NF- $\kappa$ B (149,152). Επιπλέον, με την παρουσία του TNF- $\alpha$ , ο NF- $\kappa$ B φαίνεται να συνδέεται στον εκκινητή του ANRIL, ρυθμίζοντας την έκφραση του γονιδίου. Ο μεταγραφικός παράγοντας YY1 (Yin Yang 1) αποτελεί και γνωστό μεσολαβητή του μονοπατιού NF- $\kappa$ B (153,154), καθώς μπορεί να συνδεθεί στον εκκινητή των γονιδίων IL6/IL8 (155,156). Το ANRIL σχηματίζει σύμπλοκο με το YY1, το οποίο αυξάνει την έκφραση της IL6 και IL8. Μάλιστα φαίνεται να είναι τόσο σημαντικός μεσολαβητής αυτού του μονοπατιού που μετά από knock-out του

ANRIL αναστέλλεται την έκφραση των IL6 και IL8 από τον TNF-α (149). Ο παράγοντας CARD8, που αποτελεί μέρος του φλεγμονοσώματος, προάγει την φλεγμονώδη αντίδραση μέσω της καταστολής της εξαρτώμενης από την caspase-1 έκκρισης IL-1β και την ενεργοποίηση του NF-κB (157,158). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι ο CARD8 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού και των καρδιαγγειακών νόσων (150,159). Ο Bai και οι συνεργάτες του βρήκαν ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του ANRIL και του CARD8, καθώς επίσης η αυξημένη έκφραση του CARD8 επιταχύνει την ενδοθηλιακή βλάβη στα αγγεία (157,160). Ο VEGF είναι ένας κύριος αγγειογενετικός παράγοντας που εμπλέκεται στην ενδοθηλιακή βλάβη, μέσω προαγωγής της κυτταρικής μετανάστευσης και του πολλαπλασιασμού των ΕΚ (161,162). Έχει βρεθεί ότι το ANRIL ρυθμίζει την έκφραση του VEGF μέσω του μονοπατιού NF-κB (163,164) και της κινητοποίησης του PRC2, p300 και miRNA-200b (165–167). Ο Thomas και οι συνεργάτες του βρήκαν ότι το ANRIL αυξάνει την έκφραση του VEGF μέσω της αλληλεπίδρασης με τους ανωτέρω παράγοντες (p300, PRC2 και miRNA-200b), οδηγώντας τελικά σε ενδοθηλιακή βλάβη (151,168–171) (Εικόνα 14). Τέλος, η υπερέκφραση του ANRIL βρέθηκε ότι αυξάνει τους δείκτες φλεγμονής του πλάσματος (IL-1, IL-6, MMP-9, CRP, caspase-3, κλπ), επάγοντας με αυτόν τον τρόπο την απόπτωση των ΕΚ (160,172,173).

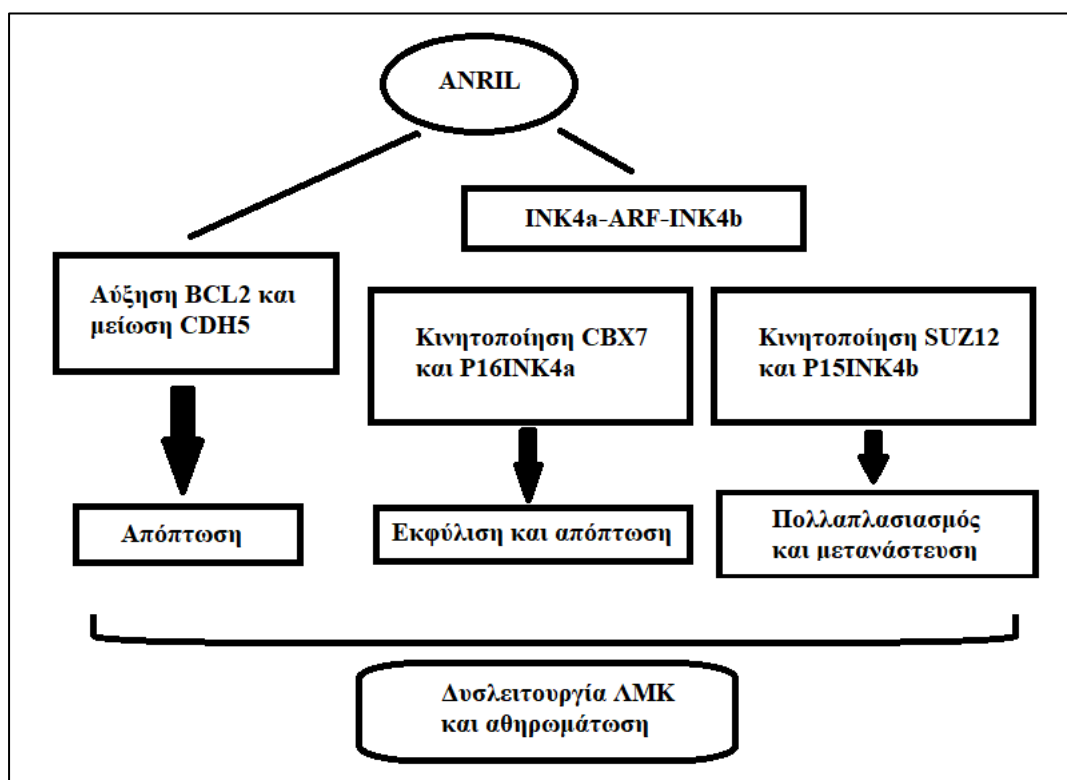


**Εικόνα 14.** Μηχανισμοί με τους οποίους το ANRIL οδηγεί σε ενδοθηλιακή βλάβη.

Η ανώμαλη έκφραση του ANRIL έχει αποδειχτεί από πολλές μελέτες ότι εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, τη γήρανση και την απόπτωση των ΛΜΚ των αγγείων, τα οποία συνδέονται άμεσα με την παθοφυσιολογία της αθηρωμάτωσης (Εικόνα 10) (164,174–176). Το ANRIL ρυθμίζει την έκφραση των CDKN2A και CDKN2B (Cyclin-Dependent Kinase iNhibitor 2A & 2B), τα οποία έχουν καίριο ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την απόπτωση και τη γήρανση των κυττάρων (176,177). Το CDKN2B με τη σειρά του κωδικοποιεί το p15<sup>INK4b</sup>, που είναι ένας μεσολαβητής της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου από τον TGF-β, ο οποίος επάγει τον κυτταρικό θάνατο μέσω συσσώρευσης νεκρωτικών κυτταρικών υπολειμμάτων εντός της εξελισσόμενης πλάκας (178). Επιπλέον, ο CDKN2A κωδικοποιεί το p16<sup>INK4a</sup>, που είναι ένας αναστολέας των cdk4 και cdk6 (Cycle-Dependent Kinases 4 and 6). Οι τελευταίοι παράγοντες αποτελούν κύριους ρυθμιστές της απόπτωσης των κυττάρων μέσω αλληλεπίδρασης του μονοπατιού p53

(174,179). Το ANRIL εμπλέκεται στη θρομβογένεση, την αγγειακή αναδιαμόρφωση, και τη σταθεροποίηση της πλάκας μέσω της τροποποίησης της έκφρασης των CDKN2A και CDKN2B (180). Επιπλέον, ο συνδυασμός ANRIL και του SUZ12 (βασικό τμήμα του συμπλέγματος PRC2) απενεργοποιεί το p15<sup>INK4</sup> μέσω μεθυλίωσης της ιστόνης H3 στη λυσίνη 27 (H3K27), προωθώντας με αυτό τον τρόπο τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ΛΜΚ (176). Επιπλέον, η αλληλεπίδραση μεταξύ του ANRIL και τμήματος του CBX7 (ChromoBoX 7, μια υπομονάδα του PRC1) είχε ως αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση του PRC1 και P16<sup>INK4</sup> μέσω μεθυλίωσης στην H3K27, καταλήγοντας σε γήρανση και απόπτωση των ΛΜΚ. Το ANRIL μπορεί και συμβάλλει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μέσω της προαγωγής της αλληλεπίδρασης του PRC1 και του PRC2 με σύμπλεγμα γονιδίων INK4b-ARF-INK4a. Αυτό με την σειρά του συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, τη εκφύλιση και την απόπτωση των ΛΜΚ. Τα μετάγραφα του ANRIL οδήγησαν στον πολλαπλασιασμό και την εκφύλιση των ΛΜΚ μέσω της αναστολής της γονιδιακής έκφρασης που συσχετίζονται με τα μονοπάτια NF-κB. Οι Congrains και οι συνεργάτες έδειξαν ότι το εξώνιο 1-siRNA και το 19-siRNA του ANRIL μείωσαν τον πολλαπλασιασμό και τη εκφύλιση των ΛΜΚ μέσω της καταστολής της έκφρασης της CDKN2B (181). Επιπλέον, σε μετέπειτα μελέτη οι ίδιοι ερευνητές κατέδειξαν επίσης ότι η μείωση της έκφρασης των αντίστοιχων εξονίων (17-18) του ANRIL στα ΛΜΚ περιόρισε την έκφραση αντίστοιχων μεταγραφών του ANRIL (NR003529.3 και DQ485454.1) που σχετίζονταν με την αθηρωμάτωση (175). Το BCL2-A1 (B-Cell CLL/lymphoma 2-related protein A1), ένα από τα γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση και κωδικοποιεί πολλαπλά μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών BCL-2, μειώνει την απελευθέρωση του προ-αποπτωτικού κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια και μπλοκάρει την ενεργοποίηση της caspase-3, αναστέλλοντας

έτσι την απόπτωση των ΛΜΚ (182). Η CDH5 (CaDHerin 5), ένας από τους υποδοχείς προσκόλλησης, μεσολαβεί στις εξαρτώμενες από το ασβέστιο αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων και δρα ως μόριο σηματοδότης, που προάγει τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των ΛΜΚ (183). Η μείωση της έκφρασης του ANRIL αύξησε την έκφραση του BCL2A1 και μείωσε την έκφραση του CDH5 στα ΛΜΚ, γεγονός που εξασθένησε την απόπτωση των ΛΜΚ (184) (Εικόνα 15).



**Εικόνα 15.** Μηχανισμοί με τους οποίους το ANRIL οδηγεί σε δυσλειτουργία λείων μυϊκών κυττάρων (ΛΜΚ) και αθηρωμάτωση.

Τα ΜΚ λόγω των προ-φλεγμονωδών ιδιοτήτων τους, προσκολλώνται σε ενεργοποιημένα ΕΚ, διεισδύουν στο ενδοθηλιακό στρώμα και διαφοροποιούνται σε μακροφάγα, τα οποία προάγουν την αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας και οδηγούν σε επιφανειακή διάβρωση ή ρήξη των αθηρωματικών πλακών (185). Τα στοιχεία ALU αποτελούν μια οικογένεια ειδικών για τα SINEs (Short Interspersed

**Repeat Elements**) και συνδέονται με την αθηρωμάτωση μέσω της διευκόλυνσης της προσκόλλησης και του πολλαπλασιασμού των ΜΚ (186). Η λειτουργική συνάφεια των μοτίβων ALU με το ANRIL επιβεβαιώθηκε με μελέτες knock-out (187,188). Επίσης, βρέθηκε ότι το ANRIL (μαζί με τα στοιχεία ALU) διευκόλυne την προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό των ΜΚ, επιδεινώνοντας έτσι την ανάπτυξη αθηρωμάτωσης (189). Γίνεται επομένως κατανοητό ότι το ANRIL μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές πτυχές της παθοφυσιολογίας των καρδιαγγειακών νόσων. Αυτό πιθανόν να αποτελεί και τον συνδετικό κρίκο μεταξύ του ANRIL και των ΕΑΚ.

## **4.2 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί**

Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη μελέτη που ερευνά πολυμορφισμούς του γονιδίου ANRIL σε γυναίκες με ΕΑΚ, συμπεριλαμβάνοντας περισσότερα από 120 δείγματα από γυναίκες με ή χωρίς ΕΑΚ. Υπήρχαν στοιχεία για τον αριθμό των αποβολών που είχε η κάθε γυναίκα, επιτρέποντας την διαστρωμάτωση αναλόγως με τον αριθμό των αποβολών. Επιπλέον, υπήρχαν διαθέσιμα στοιχεία για τις γυναίκες που εμφάνισαν ΕΑΚ, όπως η ηλικία και το ΒΜΙ της μητέρας. Αυτοί οι παράγοντες θεωρείται ότι συσχετίζονται με την εμφάνιση ΕΑΚ (21,69) και λαμβάνοντας τα υπόψιν αυξάνεται η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Όλα τα πειράματα διεξάχθηκαν στο ίδιο εργαστήριο, ελαχιστοποιώντας τις μεταβολές στις συνθήκες μεταξύ των πειραμάτων.

Η μελέτη δεν είναι ελεύθερη περιορισμών. Παρόλο το μέγεθος του πληθυσμού που εξυπηρετεί το κέντρο και τον συνολικό αριθμό των δειγμάτων,

κάποιες υπο-ομάδες, όπως οι γυναίκες με τέσσερις αποβολές, συμπεριελάμβαναν μικρό αριθμό δειγμάτων, περιορίζοντας έτσι τη δύναμη των στατιστικών ελέγχων να δείξουν μια σημαντική διαφορά. Ωστόσο, παρά την παρουσία του τελευταίου περιορισμού κάποια αποτελέσματα ήταν ή άρχισαν να θεωρούνται στατιστικά σημαντικά. Τέλος, δεν υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα για τις γυναίκες στην ομάδα των controls, όπως ήταν για την ομάδα των ΕΑΚ, περιορίζοντας με αυτό τον τρόπο την προσαρμογή στις αντίστοιχες συγκρίσεις.

### **4.3 Συμπεράσματα και μελλοντικές προοπτικές**

Συμπερασματικά, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που ερευνά πολυμορφισμούς του γονιδίου ANRIL σε γυναίκες με ΕΑΚ. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο πολυμορφισμός rs4977574 του γονιδίου του ANRIL συσχετίζεται με την παρουσία ΕΑΚ, ενώ μια συσχέτιση με τον αριθμό των αποβολών με βάση τα παρόντα αποτελέσματα δεν μπορεί να αποκλειστεί. Η μελέτη αυτή έρχεται να προσθέσει υποστηρικτικά στοιχεία για την υπόθεση παρουσίας κοινού παθοφυσιολογικού μηχανισμού μεταξύ καρδιαγγειακών νόσων και ΕΑΚ, πιθανόν μέσω της αθηρωμάτωσης και της αγγειακής θρόμβωσης. Καθώς έχει βρεθεί στην βιβλιογραφία ότι καρδιαγγειακές νόσοι (129,130) και αθηρωμάτωση (131–133) συσχετίζονται με τον πολυμορφισμό rs4977574 του γονιδίου του ANRIL. Μελλοντικές προκλήσεις αποτελούν την περαιτέρω διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην συσχέτιση του ANRIL με την εμφάνιση ΕΑΚ. Καλά σχεδιασμένες μελέτες θα μπορούν να συμπεριλάβουν λεπτομερή στοιχεία των γυναικών, τα οποία θα μπορούν να ληφθούν υπόψιν κατά την ανάλυση των δεδομένων, οδηγώντας σε πιο ασφαλή συμπεράσματα.



## Βιβλιογραφία

1. Thompson IE. Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology. *JAMA* 1997;277(16):1328.
2. Sam S, Frohman LA. Normal physiology of hypothalamic pituitary regulation. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2008;37(1):1–22, vii.
3. Pauerstein CJ, Eddy CA, Croxatto HD, Hess R, Siler-Khodr TM, Croxatto HB. Temporal relationships of estrogen, progesterone, and luteinizing hormone levels to ovulation in women and infrahuman primates. *Am J Obstet Gynecol* 1978;130(8):876–86.
4. Goodman AL, Hodgen GD. The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res* 1983;39:1–73.
5. Richards JS, Jahnsen T, Hedin L, Lifka J, Ratoosh S, Durica JM, et al. Ovarian follicular development: from physiology to molecular biology. *Recent Prog Horm Res* 1987;43:231–76.
6. Vande Wiele RL, Bogumil J, Dyrenfurth I, Ferin M, Jewelewicz R, Warren M, et al. Mechanisms regulating the menstrual cycle in women. *Recent Prog Horm Res* 1970;26:63–103.
7. Filicori M, Santoro N, Merriam GR, Crowley WF. Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62(6):1136–44.
8. Catt KJ, Dufau ML, Vaitukaitis JL. Appearance of hCG in pregnancy plasma following the initiation of implantation of the blastocyst. *J Clin Endocrinol Metab* 1975;40(3):537–40.
9. Ludwig H, Spornitz UM. Microarchitecture of the human endometrium by scanning electron microscopy: menstrual desquamation and remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 1991;622:28–46.
10. Kirkland JL, Murthy L, Stancel GM. Progesterone inhibits the estrogen-induced expression of c-fos messenger ribonucleic acid in the uterus. *Endocrinology* 1992;130(6):3223–30.
11. Markee JE. Menstruation in intraocular endometrial transplants in the Rhesus monkey. *Am J Obstet Gynecol* 1978;131(5):558–9.
12. Tabibzadeh S. The signals and molecular pathways involved in human menstruation, a unique process of tissue destruction and remodelling. *Mol Hum Reprod* 1996;2(2):77–92.
13. Irwin JC, Kirk D, Gwatkin RB, Navre M, Cannon P, Giudice LC. Human endometrial matrix metalloproteinase-2, a putative menstrual proteinase. Hormonal regulation in cultured stromal cells and messenger RNA expression during the menstrual cycle. *J Clin Invest* 1996;97(2):438–47.

14. Crow J, Amso NN, Lewin J, Shaw RW. Morphology and ultrastructure of fallopian tube epithelium at different stages of the menstrual cycle and menopause. *Hum Reprod* 1994;9(12):2224–33.
15. Iwashita M, Evans MI, Catt KJ. Characterization of a gonadotropin-releasing hormone receptor site in term placenta and chorionic villi. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62(1):127–33.
16. Sandler TW, Langman J. *Langman’s medical embryology*. 11th ed. Lippincott William & Wilkins; 2010.
17. Wetendorf M, DeMayo FJ. Progesterone receptor signaling in the initiation of pregnancy and preservation of a healthy uterus. *Int J Dev Biol* 2014;58(2–4):95–106.
18. Burrows TD, King A, Loke YW. Trophoblast migration during human placental implantation. *Hum Reprod Update* 1996;2(4):307–21.
19. ESHRE Guideline Group on RPL, Bender Atik R, Christiansen OB, Elson J, Kolte AM, Lewis S, et al. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod Open* 2018;2018(2):hoy004.
20. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Electronic address [asm.org](http://asm.org), Practice Committee of the American Society for Reproductive M. Evidence-based treatments for couples with unexplained infertility: a guideline. *Fertil Steril* 2020;113(2):305–22.
21. Magnus MC, Wilcox AJ, Morken N-H, Weinberg CR, Håberg SE. Role of maternal age and pregnancy history in risk of miscarriage: prospective register based study. *BMJ* 2019;364:l869.
22. Rasmak Roepke E, Matthiesen L, Rylance R, Christiansen OB. Is the incidence of recurrent pregnancy loss increasing? A retrospective register-based study in Sweden. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2017;96(11):1365–72.
23. van Dijk MM, Kolte AM, Limpens J, Kirk E, Quenby S, van Wely M, et al. Recurrent pregnancy loss: diagnostic workup after two or three pregnancy losses? A systematic review of the literature and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2020;26(3):356–67.
24. Zhang T, Sun Y, Chen Z, Li T. Traditional and molecular chromosomal abnormality analysis of products of conception in spontaneous and recurrent miscarriage. *BJOG* 2018;125(4):414–20.
25. Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Hum Reprod* 2002;17(2):446–51.
26. Sullivan AE, Silver RM, LaCoursiere DY, Porter TF, Branch DW. Recurrent fetal aneuploidy and recurrent miscarriage. *Obstet Gynecol* 2004;104(4):784–8.
27. Ozawa N, Ogawa K, Sasaki A, Mitsui M, Wada S, Sago H. Maternal age, history of miscarriage, and embryonic/fetal size are associated with cytogenetic results of spontaneous early miscarriages. *J Assist Reprod Genet* 2019;36(4):749–57.

28. Segawa T, Kuroda T, Kato K, Kuroda M, Omi K, Miyauchi O, et al. Cytogenetic analysis of the retained products of conception after missed abortion following blastocyst transfer: a retrospective, large-scale, single-centre study. *Reprod Biomed Online* 2017;34(2):203–10.
29. Popescu F, Jaslow CR, Kutteh WH. Recurrent pregnancy loss evaluation combined with 24-chromosome microarray of miscarriage tissue provides a probable or definite cause of pregnancy loss in over 90% of patients. *Hum Reprod* 2018;33(4):579–87.
30. Rajcan-Separovic E. Next generation sequencing in recurrent pregnancy loss—approaches and outcomes. *Eur J Med Genet* 2020;63(2):103644.
31. Starostik MR, Sosina OA, McCoy RC. Single-cell analysis of human embryos reveals diverse patterns of aneuploidy and mosaicism. *Genome Res* 2020;30(6):814–25.
32. Kaser D. The Status of Genetic Screening in Recurrent Pregnancy Loss. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2018;45(1):143–54.
33. Saravelos SH, Li T-C. Unexplained recurrent miscarriage: how can we explain it? *Hum Reprod* 2012;27(7):1882–6.
34. Nikitina TV, Sazhenova EA, Zhigalina DI, Tolmacheva EN, Sukhanova NN, Lebedev IN. Karyotype evaluation of repeated abortions in primary and secondary recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet* 2020;37(3):517–25.
35. Wang H, Yuan D, Wang S, Luo L, Zhang Y, Ye J, et al. Cytogenetic and genetic investigation of miscarriage cases in Eastern China. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2020;33(20):3385–90.
36. Hardy K, Hardy PJ, Jacobs PA, Lewallen K, Hassold TJ. Temporal changes in chromosome abnormalities in human spontaneous abortions: Results of 40 years of analysis. *Am J Med Genet A* 2016;170(10):2671–80.
37. Stephenson MD, Sierra S. Reproductive outcomes in recurrent pregnancy loss associated with a parental carrier of a structural chromosome rearrangement. *Hum Reprod* 2006;21(4):1076–82.
38. Priya PK, Mishra VV, Roy P, Patel H. A Study on Balanced Chromosomal Translocations in Couples with Recurrent Pregnancy Loss. *J Hum Reprod Sci* 2018;11(4):337–42.
39. Ibrahim Y, Johnstone E. The male contribution to recurrent pregnancy loss. *Transl Androl Urol* 2018;7(Suppl 3):S317–27.
40. Carlini T, Paoli D, Pelloni M, Faja F, Dal Lago A, Lombardo F, et al. Sperm DNA fragmentation in Italian couples with recurrent pregnancy loss. *Reprod Biomed Online* 2017;34(1):58–65.
41. Zidi-Jrah I, Hajlaoui A, Mougou-Zerelli S, Kammoun M, Meniaoui I, Sallem A, et al. Relationship between sperm aneuploidy, sperm DNA integrity, chromatin packaging, traditional semen parameters, and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2016;105(1):58–64.

42. Kirkman-Brown J, Pavitt S, Khalaf Y, Lewis S, Hooper R, Bhattacharya S, et al. Sperm selection for assisted reproduction by prior hyaluronan binding: the HABSelect RCT [Internet]. Southampton (UK): NIHR Journals Library; 2019 [cited 2021 Nov 14]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537400/>
43. Chan YY, Jayaprakasan K, Zamora J, Thornton JG, Raine-Fenning N, Coomarasamy A. The prevalence of congenital uterine anomalies in unselected and high-risk populations: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2011;17(6):761–71.
44. Turocy JM, Rackow BW. Uterine factor in recurrent pregnancy loss. *Semin Perinatol* 2019;43(2):74–9.
45. Puente E, Alonso L, Laganà AS, Ghezzi F, Casarin J, Carugno J. Chronic Endometritis: Old Problem, Novel Insights and Future Challenges. *Int J Fertil Steril* 2020;13(4):250–6.
46. Li Y, Yu S, Huang C, Lian R, Chen C, Liu S, et al. Evaluation of peripheral and uterine immune status of chronic endometritis in patients with recurrent reproductive failure. *Fertil Steril* 2020;113(1):187-196.e1.
47. Cicinelli E, Matteo M, Tinelli R, Pinto V, Marinaccio M, Indraccolo U, et al. Chronic endometritis due to common bacteria is prevalent in women with recurrent miscarriage as confirmed by improved pregnancy outcome after antibiotic treatment. *Reprod Sci* 2014;21(5):640–7.
48. McQueen DB, Bernardi LA, Stephenson MD. Chronic endometritis in women with recurrent early pregnancy loss and/or fetal demise. *Fertil Steril* 2014;101(4):1026–30.
49. McQueen DB, Perfetto CO, Hazard FK, Lathi RB. Pregnancy outcomes in women with chronic endometritis and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2015;104(4):927–31.
50. Coomarasamy A, Devall AJ, Brosens JJ, Quenby S, Stephenson MD, Sierra S, et al. Micronized vaginal progesterone to prevent miscarriage: a critical evaluation of randomized evidence. *Am J Obstet Gynecol* 2020;223(2):167–76.
51. Ticconi C, Pietropolli A, Di Simone N, Piccione E, Fazleabas A. Endometrial Immune Dysfunction in Recurrent Pregnancy Loss. *Int J Mol Sci* 2019;20(21):E5332.
52. Bhandari HM, Tan BK, Quenby S. Superfertility is more prevalent in obese women with recurrent early pregnancy miscarriage. *BJOG* 2016;123(2):217–22.
53. Marron K, Walsh D, Harrity C. Detailed endometrial immune assessment of both normal and adverse reproductive outcome populations. *J Assist Reprod Genet* 2019;36(2):199–210.
54. Fu B, Zhou Y, Ni X, Tong X, Xu X, Dong Z, et al. Natural Killer Cells Promote Fetal Development through the Secretion of Growth-Promoting Factors. *Immunity* 2017;47(6):1100-1113.e6.
55. Gamliel M, Goldman-Wohl D, Isaacson B, Gur C, Stein N, Yamin R, et al. Trained Memory of Human Uterine NK Cells Enhances Their Function in Subsequent Pregnancies. *Immunity* 2018;48(5):951-962.e5.

56. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 2004;5(3):266–71.
57. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010;63(6):601–10.
58. Inada K, Shima T, Nakashima A, Aoki K, Ito M, Saito S. Characterization of regulatory T cells in decidua of miscarriage cases with abnormal or normal fetal chromosomal content. *J Reprod Immunol* 2013;97(1):104–11.
59. Lu Y, Giver CR, Sharma A, Li JM, Darlak KA, Owens LM, et al. IFN- $\gamma$  and indoleamine 2,3-dioxygenase signaling between donor dendritic cells and T cells regulates graft versus host and graft versus leukemia activity. *Blood* 2012;119(4):1075–85.
60. Liu S, Wei H, Li Y, Huang C, Lian R, Xu J, et al. Downregulation of ILT4+ dendritic cells in recurrent miscarriage and recurrent implantation failure. *Am J Reprod Immunol* 2018;80(4):e12998.
61. Kutteh WH, Yetman DL, Carr AC, Beck LA, Scott RT. Increased prevalence of antithyroid antibodies identified in women with recurrent pregnancy loss but not in women undergoing assisted reproduction. *Fertil Steril* 1999;71(5):843–8.
62. van den Boogaard E, Vissenberg R, Land JA, van Wely M, van der Post JAM, Goddijn M, et al. Significance of (sub)clinical thyroid dysfunction and thyroid autoimmunity before conception and in early pregnancy: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2011;17(5):605–19.
63. Dong AC, Morgan J, Kane M, Stagnaro-Green A, Stephenson MD. Subclinical hypothyroidism and thyroid autoimmunity in recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2020;113(3):587-600.e1.
64. Legro RS, Arslanian SA, Ehrmann DA, Hoeger KM, Murad MH, Pasquali R, et al. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(12):4565–92.
65. Palomba S, de Wilde MA, Falbo A, Koster MPH, La Sala GB, Fauser BCJM. Pregnancy complications in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 2015;21(5):575–92.
66. Cocksedge KA, Saravelos SH, Metwally M, Li TC. How common is polycystic ovary syndrome in recurrent miscarriage? *Reprod Biomed Online* 2009;19(4):572–6.
67. Sugiura-Ogasawara M, Sato T, Suzumori N, Kitaori T, Kumagai K, Ozaki Y. The polycystic ovary syndrome does not predict further miscarriage in Japanese couples experiencing recurrent miscarriages. *Am J Reprod Immunol* 2009;61(1):62–7.
68. Lashen H, Fear K, Sturdee DW. Obesity is associated with increased risk of first trimester and recurrent miscarriage: matched case-control study. *Hum Reprod* 2004;19(7):1644–6.
69. Boots C, Stephenson MD. Does obesity increase the risk of miscarriage in spontaneous conception: a systematic review. *Semin Reprod Med* 2011;29(6):507–13.

70. Boots CE, Bernardi LA, Stephenson MD. Frequency of euploid miscarriage is increased in obese women with recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril* 2014;102(2):455–9.
71. Rhee JS, Saben JL, Mayer AL, Schulte MB, Asghar Z, Stephens C, et al. Diet-induced obesity impairs endometrial stromal cell decidualization: a potential role for impaired autophagy. *Hum Reprod* 2016;31(6):1315–26.
72. Murakami K, Bhandari H, Lucas ES, Takeda S, Gargett CE, Quenby S, et al. Deficiency in clonogenic endometrial mesenchymal stem cells in obese women with reproductive failure--a pilot study. *PLoS One* 2013;8(12):e82582.
73. Gonçalves DR, Braga A, Braga J, Marinho A. Recurrent pregnancy loss and vitamin D: A review of the literature. *Am J Reprod Immunol* 2018;80(5):e13022.
74. Ota K, Dambaeva S, Han A-R, Beaman K, Gilman-Sachs A, Kwak-Kim J. Vitamin D deficiency may be a risk factor for recurrent pregnancy losses by increasing cellular immunity and autoimmunity. *Hum Reprod* 2014;29(2):208–19.
75. Kutteh WH, Triplett DA. Thrombophilias and recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2006;24(1):54–66.
76. Cheng J, Cai M-Y, Chen Y-N, Li Z-C, Tang S-S, Yang X-L, et al. Variants in ANRIL gene correlated with its expression contribute to myocardial infarction risk. *Oncotarget* 2017;8(8):12607–19.
77. Vausort M, Wagner DR, Devaux Y. Long noncoding RNAs in patients with acute myocardial infarction. *Circ Res* 2014;115(7):668–77.
78. Zhao Q, Liao S, Wei H, Liu D, Li J, Zhang X, et al. CDKN2BAS polymorphisms are associated with coronary heart disease risk a Han Chinese population. *Oncotarget* 2016;7(50):82046–54.
79. Preston FE, Rosendaal FR, Walker ID, Briët E, Berntorp E, Conard J, et al. Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet* 1996;348(9032):913–6.
80. Robertson L, Wu O, Langhorne P, Twaddle S, Clark P, Lowe GDO, et al. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *Br J Haematol* 2006;132(2):171–96.
81. Bradley LA, Palomaki GE, Bienstock J, Varga E, Scott JA. Can Factor V Leiden and prothrombin G20210A testing in women with recurrent pregnancy loss result in improved pregnancy outcomes?: Results from a targeted evidence-based review. *Genet Med* 2012;14(1):39–50.
82. Mitriuc D, Popușoi O, Catrinici R, Friptu V. The obstetric complications in women with hereditary thrombophilia. *Med Pharm Rep* 2019;92(2):106–10.
83. Jauniaux E, Farquharson RG, Christiansen OB, Exalto N. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2006;21(9):2216–22.
84. Homer HA. Modern management of recurrent miscarriage. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2019;59(1):36–44.

85. Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med* 2007;357(5):443–53.
86. Broadbent HM, Peden JF, Lorkowski S, Goel A, Ongen H, Green F, et al. Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p. *Hum Mol Genet* 2008;17(6):806–14.
87. Iaconetti C, Gareri C, Polimeni A, Indolfi C. Non-coding RNAs: the “dark matter” of cardiovascular pathophysiology. *Int J Mol Sci* 2013;14(10):19987–20018.
88. Wahlestedt C. Targeting long non-coding RNA to therapeutically upregulate gene expression. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12(6):433–46.
89. Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 2005;309(5740):1559–63.
90. Cheng J, Kapranov P, Drenkow J, Dike S, Brubaker S, Patel S, et al. Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science* 2005;308(5725):1149–54.
91. Holdt LM, Beutner F, Scholz M, Gielen S, Gäbel G, Bergert H, et al. ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30(3):620–7.
92. Visel A, Zhu Y, May D, Afzal V, Gong E, Attanasio C, et al. Targeted deletion of the 9p21 non-coding coronary artery disease risk interval in mice. *Nature* 2010;464(7287):409–12.
93. Skroblin P, Mayr M. “Going long”: long non-coding RNAs as biomarkers. *Circ Res* 2014;115(7):607–9.
94. Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res* 2012;22(9):1775–89.
95. Cugino D, Gianfagna F, Santimone I, de Gaetano G, Donati MB, Iacoviello L, et al. Type 2 diabetes and polymorphisms on chromosome 9p21: a meta-analysis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012;22(8):619–25.
96. Emanuele E, Lista S, Ghidoni R, Binetti G, Cereda C, Benussi L, et al. Chromosome 9p21.3 genotype is associated with vascular dementia and Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging* 2011;32(7):1231–5.
97. Burdon KP, Macgregor S, Hewitt AW, Sharma S, Chidlow G, Mills RA, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for open angle glaucoma at TMCO1 and CDKN2B-AS1. *Nat Genet* 2011;43(6):574–8.
98. Ramdas WD, van Koolwijk LME, Lemij HG, Pasutto F, Cree AJ, Thorleifsson G, et al. Common genetic variants associated with open-angle glaucoma. *Hum Mol Genet* 2011;20(12):2464–71.

99. Uno S, Zembutsu H, Hirasawa A, Takahashi A, Kubo M, Akahane T, et al. A genome-wide association study identifies genetic variants in the CDKN2BAS locus associated with endometriosis in Japanese. *Nat Genet* 2010;42(8):707–10.
100. Schaefer AS, Richter GM, Groessner-Schreiber B, Noack B, Nothnagel M, El Mokhtari N-E, et al. Identification of a shared genetic susceptibility locus for coronary heart disease and periodontitis. *PLoS Genet* 2009;5(2):e1000378.
101. Kong Y, Hsieh C-H, Alonso LC. ANRIL: A lncRNA at the CDKN2A/B Locus With Roles in Cancer and Metabolic Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;9:405.
102. Rezazadeh M, Gharesouran J, Moradi M, Noroozi R, Omrani MD, Taheri M, et al. Association Study of ANRIL Genetic Variants and Multiple Sclerosis. *J Mol Neurosci* 2018;65(1):54–9.
103. Chen S, Zhang J-Q, Chen J-Z, Chen H-X, Qiu F-N, Yan M-L, et al. The over expression of long non-coding RNA ANRIL promotes epithelial-mesenchymal transition by activating the ATM-E2F1 signaling pathway in pancreatic cancer: An in vivo and in vitro study. *Int J Biol Macromol* 2017;102:718–28.
104. Zhang D, Sun G, Zhang H, Tian J, Li Y. Long non-coding RNA ANRIL indicates a poor prognosis of cervical cancer and promotes carcinogenesis via PI3K/Akt pathways. *Biomed Pharmacother* 2017;85:511–6.
105. Zhao B, Lu Y-L, Yang Y, Hu L-B, Bai Y, Li R-Q, et al. Overexpression of lncRNA ANRIL promoted the proliferation and migration of prostate cancer cells via regulating let-7a/TGF- $\beta$ 1/ Smad signaling pathway. *Cancer Biomark* 2018;21(3):613–20.
106. Liu P, Zhang M, Niu Q, Zhang F, Yang Y, Jiang X. Knockdown of long non-coding RNA ANRIL inhibits tumorigenesis in human gastric cancer cells via microRNA-99a-mediated down-regulation of BMI1. *Braz J Med Biol Res* 2018;51(10):e6839.
107. Ghafouri-Fard S, Glassy MC, Abak A, Hussen BM, Niazi V, Taheri M. The interaction between miRNAs/lncRNAs and Notch pathway in human disorders. *Biomed Pharmacother* 2021;138:111496.
108. Xu S, Wang H, Pan H, Shi Y, Li T, Ge S, et al. ANRIL lncRNA triggers efficient therapeutic efficacy by reprogramming the aberrant INK4-hub in melanoma. *Cancer Lett* 2016;381(1):41–8.
109. Zhang J-J, Wang D-D, Du C-X, Wang Y. Long Noncoding RNA ANRIL Promotes Cervical Cancer Development by Acting as a Sponge of miR-186. *Oncol Res* 2018;26(3):345–52.
110. Xu S-T, Xu J-H, Zheng Z-R, Zhao Q-Q, Zeng X-S, Cheng S-X, et al. Long non-coding RNA ANRIL promotes carcinogenesis via sponging miR-199a in triple-negative breast cancer. *Biomed Pharmacother* 2017;96:14–21.
111. Lee J, Jung JH, Chae YS, Park HY, Kim WW, Lee SJ, et al. Long Noncoding RNA snar Regulates Proliferation, Migration and Invasion of Triple-negative Breast Cancer Cells. *Anticancer Res* 2016;36(12):6289–95.



112. Chai L, Yuan Y, Chen C, Zhou J, Wu Y. The role of long non-coding RNA ANRIL in the carcinogenesis of oral cancer by targeting miR-125a. *Biomed Pharmacother* 2018;103:38–45.
113. Lan W-G, Xu D-H, Xu C, Ding C-L, Ning F-L, Zhou Y-L, et al. Silencing of long non-coding RNA ANRIL inhibits the development of multidrug resistance in gastric cancer cells. *Oncol Rep* 2016;36(1):263–70.
114. Wang Y, Cheng N, Luo J. Downregulation of lncRNA ANRIL represses tumorigenicity and enhances cisplatin-induced cytotoxicity via regulating microRNA let-7a in nasopharyngeal carcinoma. *J Biochem Mol Toxicol* 2017;31(7).
115. Hu X, Jiang H, Jiang X. Downregulation of lncRNA ANRIL inhibits proliferation, induces apoptosis, and enhances radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells through regulating miR-125a. *Cancer Biol Ther* 2017;18(5):331–8.
116. Bahrami A, Hassanian SM, Khazaei M, Gharib M, Rahmani M, Fiuji H, et al. The 9p21 locus as a potential therapeutic target and prognostic marker in colorectal cancer. *Pharmacogenomics* 2018;19(5):463–74.
117. Sun Y, Zheng Z-P, Li H, Zhang H-Q, Ma F-Q. ANRIL is associated with the survival rate of patients with colorectal cancer, and affects cell migration and invasion in vitro. *Mol Med Rep* 2016;14(2):1714–20.
118. Sun L-Y, Li X-J, Sun Y-M, Huang W, Fang K, Han C, et al. lncRNA ANRIL regulates AML development through modulating the glucose metabolism pathway of AdipoR1/AMPK/SIRT1. *Mol Cancer* 2018;17(1):127.
119. Hua L, Wang C-Y, Yao K-H, Chen J-T, Zhang J-J, Ma W-L. High expression of long non-coding RNA ANRIL is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(3):3076–82.
120. Liu B, Shen E-D, Liao M-M, Hu Y-B, Wu K, Yang P, et al. Expression and mechanisms of long non-coding RNA genes MEG3 and ANRIL in gallbladder cancer. *Tumour Biol* 2016;37(7):9875–86.
121. Qiu J-J, Wang Y, Liu Y-L, Zhang Y, Ding J-X, Hua K-Q. The long non-coding RNA ANRIL promotes proliferation and cell cycle progression and inhibits apoptosis and senescence in epithelial ovarian cancer. *Oncotarget* 2016;7(22):32478–92.
122. Zollbrecht C, Grassl M, Fenk S, Höcherl R, Hubauer U, Reinhard W, et al. Expression pattern in human macrophages dependent on 9p21.3 coronary artery disease risk locus. *Atherosclerosis* 2013;227(2):244–9.
123. ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 2012;489(7414):57–74.
124. Nanda V, Downing KP, Ye J, Xiao S, Kojima Y, Spin JM, et al. CDKN2B Regulates TGF $\beta$  Signaling and Smooth Muscle Cell Investment of Hypoxic Neovessels. *Circ Res* 2016;118(2):230–40.
125. Papait R, Kunderfranco P, Stirparo GG, Latronico MVG, Condorelli G. Long noncoding RNA: a new player of heart failure? *J Cardiovasc Transl Res* 2013;6(6):876–83.

126. Burd CE, Jeck WR, Liu Y, Sanoff HK, Wang Z, Sharpless NE. Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk. *PLoS Genet* 2010;6(12):e1001233.
127. Rivera NV, Carreras-Torres R, Roncarati R, Viviani-Anselmi C, De Micco F, Mezzelani A, et al. Assessment of the 9p21.3 locus in severity of coronary artery disease in the presence and absence of type 2 diabetes. *BMC Med Genet* 2013;14:11.
128. Hubberten M, Bochenek G, Chen H, Häsler R, Wiehe R, Rosenstiel P, et al. Linear isoforms of the long noncoding RNA CDKN2B-AS1 regulate the c-myc-enhancer binding factor RBMS1. *Eur J Hum Genet* 2019;27(1):80–9.
129. Xu B, Fang Z, He S, Wang J, Yang X. ANRIL polymorphism rs4977574 is associated with increased risk of coronary artery disease in Asian populations: A meta-analysis of 12,005 subjects. *Medicine (Baltimore)* 2018;97(39):e12641.
130. Li Y-Y, Wang H, Zhang Y-Y. CDKN2B-AS1 gene rs4977574 A/G polymorphism and coronary heart disease: A meta-analysis of 40,979 subjects. *J Cell Mol Med* 2021;25(18):8877–89.
131. Liu R, Song L, Jiang L, Tang X, Xu L, Gao Z, et al. Susceptible gene polymorphism in patients with three-vessel coronary artery disease. *BMC Cardiovasc Disord* 2020;20(1):172.
132. Lu Z, Zhang Y, Maimaiti Y, Feng Y, Sun J, Zhuang J, et al. Variants on Chromosome 9p21 Confer Risks of Noncardioembolic Cerebral Infarction and Carotid Plaque in the Chinese Han Population. *J Atheroscler Thromb* 2015;22(10):1061–70.
133. Jin W, Wu W, Yang K, Shen F, Fu N, Feng Y, et al. The Single Nucleotide Polymorphisms of Chromosome 9p21 and CD147 Were Relevant with the Carotid Plaque Risk in Acute Cerebral Infarction Patients Among Chinese Han Population. *J Mol Neurosci* 2020;70(8):1282–92.
134. Kunnas T, Piesanen J, Nikkari ST. Association of a Chromosome Locus 9p21.3 CDKN2B-AS1 Variant rs4977574 with Hypertension: The TAMRISK Study. *Genet Test Mol Biomarkers* 2018;22(5):327–30.
135. Hindy G, Ericson U, Hamrefors V, Drake I, Wirfält E, Melander O, et al. The chromosome 9p21 variant interacts with vegetable and wine intake to influence the risk of cardiovascular disease: a population based cohort study. *BMC Med Genet* 2014;15:1220.
136. Hamrefors V, Hedblad B, Hindy G, Smith JG, Almgren P, Engström G, et al. Smoking modifies the associated increased risk of future cardiovascular disease by genetic variation on chromosome 9p21. *PLoS One* 2014;9(1):e85893.
137. Sakalar C, Gurbuz E, Kalay N, Kaya MG. Higher frequency of rs4977574 (the G Allele) on chromosome 9p21.3 in patients with myocardial infarction as revealed by PCR-RFLP analysis. *Tohoku J Exp Med* 2013;230(3):171–6.
138. Lasek-Bal A, Kula D, Urbanek T, Puz P, Szymaszal J, Jarzab M, et al. The Association of SNPs Located in the CDKN2B-AS1 and LPA Genes With Carotid Artery Stenosis and Atherogenic Stroke. *Front Neurol* 2019;10:1170.

139. Dimitriadis E, Menkhorst E, Saito S, Kutteh WH, Brosens JJ. Recurrent pregnancy loss. *Nat Rev Dis Primers* 2020;6(1):98.
140. Bennett SA, Bagot CN, Arya R. Pregnancy loss and thrombophilia: the elusive link. *Br J Haematol* 2012;157(5):529–42.
141. Silver RM, Zhao Y, Spong CY, Sibai B, Wendel G, Wenstrom K, et al. Prothrombin gene G20210A mutation and obstetric complications. *Obstet Gynecol* 2010;115(1):14–20.
142. Dizon-Townson D, Miller C, Sibai B, Spong CY, Thom E, Wendel G, et al. The relationship of the factor V Leiden mutation and pregnancy outcomes for mother and fetus. *Obstet Gynecol* 2005;106(3):517–24.
143. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril* 2012;98(5):1103–11.
144. Bates SM, Middeldorp S, Rodger M, James AH, Greer I. Guidance for the treatment and prevention of obstetric-associated venous thromboembolism. *J Thromb Thrombolysis* 2016;41(1):92–128.
145. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006;4(2):295–306.
146. Hamulyák EN, Scheres LJ, Marijnen MC, Goddijn M, Middeldorp S. Aspirin or heparin or both for improving pregnancy outcomes in women with persistent antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss. *Cochrane Database Syst Rev* 2020;5:CD012852.
147. Gelbenegger G, Postula M, Pecen L, Halvorsen S, Lesiak M, Schoergenhofer C, et al. Aspirin for primary prevention of cardiovascular disease: a meta-analysis with a particular focus on subgroups. *BMC Med* 2019;17(1):198.
148. Schrör K. Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. *Semin Thromb Hemost* 1997;23(4):349–56.
149. Zhou X, Han X, Wittfeldt A, Sun J, Liu C, Wang X, et al. Long non-coding RNA ANRIL regulates inflammatory responses as a novel component of NF- $\kappa$ B pathway. *RNA Biol* 2016;13(1):98–108.
150. Bai Y, Nie S, Jiang G, Zhou Y, Zhou M, Zhao Y, et al. Regulation of CARD8 expression by ANRIL and association of CARD8 single nucleotide polymorphism rs2043211 (p.C10X) with ischemic stroke. *Stroke* 2014;45(2):383–8.
151. Thomas AA, Feng B, Chakrabarti S. ANRIL: A Regulator of VEGF in Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58(1):470–80.
152. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 2009;27:693–733.

153. Joo M, Wright JG, Hu NN, Sadikot RT, Park GY, Blackwell TS, et al. Yin Yang 1 enhances cyclooxygenase-2 gene expression in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292(5):L1219-1226.
154. Guo J, Casolaro V, Seto E, Yang WM, Chang C, Seminario MC, et al. Yin-Yang 1 activates interleukin-4 gene expression in T cells. *J Biol Chem* 2001;276(52):48871–8.
155. Wang J, Zhuang J, Iyer S, Lin X-Y, Greven MC, Kim B-H, et al. Factorbook.org: a Wiki-based database for transcription factor-binding data generated by the ENCODE consortium. *Nucleic Acids Res* 2013;41(Database issue):D171-176.
156. Hasegawa A, Yasukawa M, Sakai I, Fujita S. Transcriptional down-regulation of CXC chemokine receptor 4 induced by impaired association of transcription regulator YY1 with c-Myc in human herpesvirus 6-infected cells. *J Immunol* 2001;166(2):1125–31.
157. García-Bermúdez M, López-Mejías R, González-Juanatey C, Corrales A, Castañeda S, Ortiz AM, et al. CARD8 rs2043211 (p.C10X) polymorphism is not associated with disease susceptibility or cardiovascular events in Spanish rheumatoid arthritis patients. *DNA Cell Biol* 2013;32(1):28–33.
158. Razmara M, Srinivasula SM, Wang L, Poyet J-L, Geddes BJ, DiStefano PS, et al. CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277(16):13952–8.
159. Klen J, Goričar K, Janež A, Dolžan V. NLRP3 Inflammasome Polymorphism and Macrovascular Complications in Type 2 Diabetes Patients. *J Diabetes Res* 2015;2015:616747.
160. Qian Y, Lu Y, Rui C, Qian Y, Cai M, Jia R. Potential Significance of Circular RNA in Human Placental Tissue for Patients with Preeclampsia. *Cell Physiol Biochem* 2016;39(4):1380–90.
161. Inoue M, Itoh H, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Komatsu R, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation* 1998;98(20):2108–16.
162. Ozturk BT, Bozkurt B, Kerimoglu H, Okka M, Kamis U, Gunduz K. Effect of serum cytokines and VEGF levels on diabetic retinopathy and macular thickness. *Mol Vis* 2009;15:1906–14.
163. Zhang B, Wang D, Ji T-F, Shi L, Yu J-L. Overexpression of lncRNA ANRIL up-regulates VEGF expression and promotes angiogenesis of diabetes mellitus combined with cerebral infarction by activating NF-κB signaling pathway in a rat model. *Oncotarget* 2017;8(10):17347–59.
164. Katsiki N, Tziomalos K, Chatzizisis Y, Elisaf M, Hatzitolios AI. Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on vascular cell apoptosis: beneficial or detrimental? *Atherosclerosis* 2010;211(1):9–14.
165. McArthur K, Feng B, Wu Y, Chen S, Chakrabarti S. MicroRNA-200b regulates vascular endothelial growth factor-mediated alterations in diabetic retinopathy. *Diabetes* 2011;60(4):1314–23.

166. Chen S, Feng B, George B, Chakrabarti R, Chen M, Chakrabarti S. Transcriptional coactivator p300 regulates glucose-induced gene expression in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298(1):E127-137.
167. Gray MJ, Zhang J, Ellis LM, Semenza GL, Evans DB, Watowich SS, et al. HIF-1 $\alpha$ , STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas. *Oncogene* 2005;24(19):3110–20.
168. Raja R, Kale S, Thorat D, Soundararajan G, Lohite K, Mane A, et al. Hypoxia-driven osteopontin contributes to breast tumor growth through modulation of HIF1 $\alpha$ -mediated VEGF-dependent angiogenesis. *Oncogene* 2014;33(16):2053–64.
169. Ruan Q, Zhao C, Ye Z, Ruan J, Xie Q, Xie W. Effect and possible mechanism of monocyte-derived VEGF on monocyte-endothelial cellular adhesion after electrical burns. *Burns* 2015;41(4):825–32.
170. Ardelean DS, Yin M, Jerkic M, Peter M, Ngan B, Kerbel RS, et al. Anti-VEGF therapy reduces intestinal inflammation in Endoglin heterozygous mice subjected to experimental colitis. *Angiogenesis* 2014;17(3):641–59.
171. Zhai Y-L, Zhu L, Shi S-F, Liu L-J, Lv J-C, Zhang H. Elevated soluble VEGF receptor sFlt-1 correlates with endothelial injury in IgA nephropathy. *PLoS One* 2014;9(7):e101779.
172. Qin W, Ren B, Wang S, Liang S, He B, Shi X, et al. Apigenin and naringenin ameliorate PKC $\beta$ II-associated endothelial dysfunction via regulating ROS/caspase-3 and NO pathway in endothelial cells exposed to high glucose. *Vascul Pharmacol* 2016;85:39–49.
173. Song C-L, Wang J-P, Xue X, Liu N, Zhang X-H, Zhao Z, et al. Effect of Circular ANRIL on the Inflammatory Response of Vascular Endothelial Cells in a Rat Model of Coronary Atherosclerosis. *Cell Physiol Biochem* 2017;42(3):1202–12.
174. Wang P, Xu T-Y, Guan Y-F, Zhao Y, Li Z-Y, Lan X-H, et al. Vascular smooth muscle cell apoptosis is an early trigger for hypothyroid atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2014;102(3):448–59.
175. Congrains A, Kamide K, Oguro R, Yasuda O, Miyata K, Yamamoto E, et al. Genetic variants at the 9p21 locus contribute to atherosclerosis through modulation of ANRIL and CDKN2A/B. *Atherosclerosis* 2012;220(2):449–55.
176. Aguilo F, Di Cecilia S, Walsh MJ. Long Non-coding RNA ANRIL and Polycomb in Human Cancers and Cardiovascular Disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2016;394:29–39.
177. Gil J, Peters G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7(9):667–77.
178. Kotake Y, Nakagawa T, Kitagawa K, Suzuki S, Liu N, Kitagawa M, et al. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. *Oncogene* 2011;30(16):1956–62.
179. Li Y, Jenkins CW, Nichols MA, Xiong Y. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* 1994;9(8):2261–8.

180. Pasmant E, Laurendeau I, Héron D, Vidaud M, Vidaud D, Bièche I. Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family: identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF. *Cancer Res* 2007;67(8):3963–9.
181. Congrains A, Kamide K, Katsuya T, Yasuda O, Oguro R, Yamamoto K, et al. CVD-associated non-coding RNA, ANRIL, modulates expression of atherogenic pathways in VSMC. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;419(4):612–6.
182. Li L, Peng L, Zuo Z. Isoflurane preconditioning increases B-cell lymphoma-2 expression and reduces cytochrome c release from the mitochondria in the ischemic penumbra of rat brain. *Eur J Pharmacol* 2008;586(1–3):106–13.
183. Koutsouki E, Beeching CA, Slater SC, Blaschuk OW, Sala-Newby GB, George SJ. N-cadherin-dependent cell-cell contacts promote human saphenous vein smooth muscle cell survival. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(5):982–8.
184. Congrains A, Kamide K, Ohishi M, Rakugi H. ANRIL: molecular mechanisms and implications in human health. *Int J Mol Sci* 2013;14(1):1278–92.
185. Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, Virmani R, Heinecke JW, Libby P. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol* 2001;158(3):879–91.
186. Rüdiger NS, Gregersen N, Kielland-Brandt MC. One short well conserved region of Alu-sequences is involved in human gene rearrangements and has homology with prokaryotic chi. *Nucleic Acids Res* 1995;23(2):256–60.
187. Hueso M, Cruzado JM, Torras J, Navarro E. ALUminating the Path of Atherosclerosis Progression: Chaos Theory Suggests a Role for Alu Repeats in the Development of Atherosclerotic Vascular Disease. *Int J Mol Sci* 2018;19(6):E1734.
188. Chi J-S, Li J-Z, Jia J-J, Zhang T, Liu X-M, Yi L. Long non-coding RNA ANRIL in gene regulation and its duality in atherosclerosis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2017;37(6):816–22.
189. Holdt LM, Hoffmann S, Sass K, Langenberger D, Scholz M, Krohn K, et al. Alu elements in ANRIL non-coding RNA at chromosome 9p21 modulate atherogenic cell functions through trans-regulation of gene networks. *PLoS Genet* 2013;9(7):e1003588.