



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

Σχολή Επιστημών Υγείας,
Τμήμα Ιατρικής

**Μελέτη του πολυμορφισμού *rs895819* (A>G) του γονιδίου *mir-27a*
σε γυναίκες σε πρωτόκολλα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.**

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
“Αναπαραγωγική - Αναγεννητική Ιατρική”

Γεωργία Χ. Ντρουμπογιάννη

Σεπτέμβριος, 2022

Στη μητέρα και την αδερφή μου.

Πρόλογος

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε από τη βιολόγο Γεωργία Ντρουμπογιάννη, απόφοιτο του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022. Αντικείμενο της εργασίας αποτέλεσε η μελέτη και διερεύνηση της πιθανής σχέσης του πολυμορφισμού rs895819 A>G του γονιδίου mir27a, με τη γυναικεία υπογονιμότητα στον ελληνικό πληθυσμό, για την οποία έχει εφαρμοστεί κάποιο από τα πρωτόκολλα εξωσωματικής γονιμοποίησης, στην προσπάθεια αντιμετώπισής της. Το εργαστηριακό σκέλος της Διπλωματικής Εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Εξωσωματικής Γονιμοποίησης του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών “Αλεξάνδρα”, υπό την επίβλεψη της Δρ. Δέσποινας Μαυρογιάννη, επιβλέπουσα και μέλος της τριμελούς επιτροπής, την οποία και θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για τη συνεργασία, την καθοδήγηση, τις γνώσεις που μου προσέφερε, που αποδείχτηκαν ανεκτίμητες καθ’ όλη τη διάρκεια διεκπεραίωσης της εργασίας μου και για την εμπιστοσύνη της προς το πρόσωπο μου.

Ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω και στους Πέτρο Δρακάκη, Καθηγητή Μαιευτικής Γυναικολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και Αθανασίο Σταύρο, Καθηγητή Μαιευτικής Γυναικολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, που αποτέλεσαν μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, για την εμπιστοσύνη στο πρόσωπό μου για την εκπόνηση της παρούσας ερευνητικής εργασίας και τις γνώσεις που μου πρόσφεραν στη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στη συνάδελφο Γεωργία Πανάγου για την άριστο κλίμα συνεργασίας στο εργαστήριο. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου, για την κατανόηση, την ουσιαστική και ηθική συμπαράσταση σε όλη τη διάρκεια της μελέτης αυτής.

Περίληψη

Η υπογονιμότητα αποτελεί πρόβλημα του αναπαραγωγικού συστήματος, με το οποίο έρχονται αντιμέτωποι, παγκοσμίως, περισσότεροι από 186 εκατομμύρια άνθρωποι. Πολλές γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας επιλέγουν την εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF), ως λύση στα ζητήματα υπογονιμότητας, με ελπίδα μια επιτυχημένη κύηση. Ένα από τα αίτια της γυναικείας υπογονιμότητας, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, είναι η ύπαρξη πολυμορφισμών σε μικρά ρυθμιστικά non-coding RNAs (ncRNAs), τα οποία κωδικοποιούνται από μη γονιδιακές αλληλουχίες και συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκφρασης άλλων γονιδίων, είτε μεταβάλλοντας τη σταθερότητα των mRNA, ή την ικανότητά τους να μεταφράζονται. Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας εστιάζεται, τα τελευταία χρόνια, στα miRNA, τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των ncRNAs και έχουν μήκος 19-25 νουκλεοτίδια.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση της πιθανής σχέσης του πολυμορφισμού rs895819 A>G του γονιδίου mir27a με τη γυναικεία υπογονιμότητα στον ελληνικό πληθυσμό, για την οποία έχει εφαρμοστεί κάποιο από τα πρωτόκολλα εξωσωματικής γονιμοποίησης, στην προσπάθεια αντιμετώπισής της. Δείγμα της μελέτης αποτέλεσαν 180 γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, εκ των οποίων οι 107 ήταν η ομάδα ελέγχου, καθώς φέραν τουλάχιστον μία πετυχημένη κύηση και δε συμμετείχαν σε πρόγραμμα εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF), ενώ οι υπόλοιπες 73 αποτέλεσαν την ομάδα μελέτης (ομάδα IVF), καθώς μέσω της συμμετοχής σε προγράμματα IVF επιδιώκουν την επίτευξη εγκυμοσύνης. Ο γονότυπος CC (GG), η ομοζυγωτία δηλαδή ως προς τον πολυμορφισμό, φάνηκε να μην ευνοεί την επίτευξη εγκυμοσύνης, με τα αποτελέσματα να χαρακτηρίζονται ως στατιστικά σημαντικά ($p < 0,001$). Επιπλέον, μελέτη της συσχέτισης του πολυμορφισμού με τη συγκέντρωση της ορμόνης προλακτίνης (PRL) έδειξε πως η τιμή της παρουσιάζει μεγάλες και στατιστικά σημαντικές ($p < 0,001$) διαφορές ανάλογα με τους γονότυπους που μελετώνται. Σημαντική κρίνεται η περαιτέρω μελέτη της συσχέτισης αυτής, καθώς μπορεί δυνητικά να χρησιμοποιηθεί η τιμή της ορμόνης PRL ως δείκτης πρόβλεψης της ύπαρξης ή μη του πολυμορφισμού. Τέλος, η παρούσα έρευνα αποτελεί την πρώτη για τον πολυμορφισμό rs895819 του γονιδίου mir27a στον ελληνικό πληθυσμό.

Λέξεις Κλειδιά: rs895819, mir27a, υπογονιμότητα, εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF).

Abstract

Infertility is a reproductive system's problem, which is faced by more than 186 million people worldwide. Many women of reproductive age choose in vitro fertilization (IVF) as a solution to infertility issues, with the hope of a successful pregnancy. One of the causes of female infertility, according to recent studies, is the existence of polymorphisms in small regulatory non-coding RNAs (ncRNAs), which are encoded by non-genic sequences and participate in the regulation of the expression of other genes, either by changing the stability of mRNAs, or their ability to be translated. The interest of the scientific community has been focused on miRNAs, which belong to the category of ncRNAs and have a length of 19-25 nucleotides.

The purpose of this research thesis was to investigate the possible relationship of the rs895819 A>G polymorphism of the mir27a gene with female infertility in the greek population, for which one of the IVF protocols has been applied. The sample of the study was 180 women of reproductive age, of which 107 were the control group, as they had at least one successful pregnancy and did not participate in an in vitro fertilization (IVF) program, while the remaining 73 constituted the study group (IVF group), as through participation in IVF programs they seek to achieve pregnancy. The CC (GG) genotype, which is the homozygosity for the polymorphism, did not appear to favor the achievement of pregnancy, with the results being characterized as statistically significant ($p < 0.001$). In addition, a study of the association of polymorphism with the concentration of the prolactin hormone (PRL) showed that its value presents large and statistically significant ($p < 0.001$) differences depending on the genotypes studied. The further study of this correlation is considered important, as the value of the PRL hormone can potentially be used as a predictor of the presence or absence of the polymorphism. Finally, the present research is the first for the rs895819 polymorphism of the mir27a gene in the greek population.

Keywords: rs895819, mir27a, infertility, in vitro fertilization (IVF).

Περιεχόμενα

Πρόλογος	4
Περίληψη	5
Abstract	6
1. Εισαγωγή	9
1.1 Φυσιολογία Ανθρώπινης Αναπαραγωγής	9
1.1.1 Μοναδικότητα Αναπαραγωγικού Συστήματος	9
1.1.2 Γενικές Έννοιες και Ορολογίες	10
1.1.3 Γενικές Αρχές Γαμετογένεσης	11
1.1.4 Αναπαραγωγική Φυσιολογία στον Άνδρα	12
1.1.5 Αναπαραγωγική Φυσιολογία στη Γυναίκα	14
1.2 Υπογονιμότητα	16
1.2.1 Γυναικεία Υπογονιμότητα	18
1.2.2 Ανδρική υπογονιμότητα	19
1.3 Υποβοηθούμενη αναπαραγωγή	19
1.3.1 Εξωσωματική γονιμοποίηση	20
1.3.2 Πρωτόκολλα Διέγερσης	22
1.4 MicroRNAs	26
1.4.1 Εισαγωγή στα MicroRNAs	26
1.4.2 Βιογένεση miRNAs	27
Κανονική Οδός (Canonical Pathway) Βιογένεσης miRNA	27
Μη Κανονική Οδός (Non-canonical Pathway) Βιογένεσης miRNA	29
1.4.3 Μηχανισμοί ρύθμισης γονιδίων με τη μεσολάβηση miRNA	31
Σίγαση γονιδίου με τη μεσολάβηση MicroRNA μέσω miRISC συμπλόκου	31
Μεταγραφική και μετα-μεταγραφική γονιδιακή ρύθμιση	32
1.4.4 miRNAs και υπογονιμότητα	33
1.5 Οικογένεια γονιδίων miR-27	33
1.5.1 Πολυμορφισμός	34
1.5.2 Πολυμορφισμός rs895819 του γονιδίου mir27a	35
1.6 Σκοπός της μελέτης	36
2. Υλικά και Μέθοδοι	37
2.1 Δείγμα	37
2.2 Χημικά και Ρυθμιστικά Διαλύματα	40
2.3 Απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από ολικό αίμα	41
2.4 Ενίσχυση της αλληλουχίας mir27a	41
2.5 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης	44

2.6 Ανίχνευση πολυμορφισμού rs895819 (miR-27a A>G)	44
2.7 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων επώασης με το περιοριστικό ένζυμο DraIII-HF® σε πήκτωμα αγαρόζης.	45
2.8 Στατιστική Ανάλυση	45
3. Αποτελέσματα	47
3.1 Χαρακτηριστικά δείγματος	47
3.1.1 Ηλικία	47
3.1.2 Χρονικό Διάστημα Υπογονιμότητας	48
3.1.3 Βάρος - Ύψος - BMI	48
3.1.4 FSH - LH - PRL - AMH	50
3.1.5 Αριθμός ώριμων ωοκυττάρων, ώριμων ωοκυττάρων καλής ποιότητας και γονιμοποιημένα ωάρια	52
3.1.6 Επίτευξη εγκυμοσύνης	53
3.2 Αλληλουχία mir27a	54
3.3 Πολυμορφισμός rs895819 (miR-27a A>G)	55
3.4 Πολυμορφισμός rs895819 (miR-27a A>G) και επίτευξη εγκυμοσύνης	59
3.5 Πολυμορφισμός rs895819 (miR-27a A>G) και λοιποί παράγοντες	61
4. Συζήτηση	69
5. Συμπεράσματα	73
6. Βιβλιογραφία	74
Παράρτημα 1	88
Παράρτημα 2	91

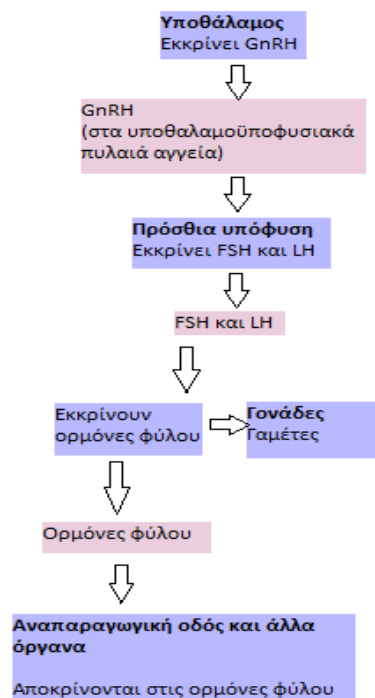
1. Εισαγωγή

1.1 Φυσιολογία Ανθρώπινης Αναπαραγωγής

1.1.1 Μοναδικότητα Αναπαραγωγικού Συστήματος

Το αναπαραγωγικό σύστημα αποτελεί το μοναδικό σύστημα του ανθρώπινου σώματος, το οποίο δε συμβάλλει στην ομοιόσταση, δηλαδή στη διατήρηση της δυναμικά σταθερής κατάστασης του εσωτερικού περιβάλλοντος σε σχέση με τις όποιες μεταβολές. Ειδικότερα, πρόκειται για ένα σύστημα μη απαραίτητο για την επιβίωση του ανθρώπου, όμως αναγκαίο για τη διατήρηση του είδους. Σε αντίθεση με όλα τα υπόλοιπα συστήματα, αποτελεί αυτό που διαφέρει μεταξύ των δύο φύλων σημαντικά, εξαιτίας των διαφορετικών τους ρόλων στη διαδικασία της αναπαραγωγής (Sherwood, 2016).

Η αναπαραγωγική ικανότητα είναι άμεσα εξαρτώμενη από πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις που διαδραματίζονται μεταξύ υποθαλάμου, πρόσθιου λοβού υπόφυσης, αναπαραγωγικών οργάνων και κυττάρων στόχων των ορμονών του φύλου (Εικόνα 1). Εκτός των αλληλεπιδράσεων αυτών συναισθηματικοί, κοινωνικοί και πολιτισμικοί παράγοντες επηρεάζουν έντονα τη σεξουαλική συμπεριφορά, ανεξαρτήτου βιολογικών διεργασιών (Sherwood, 2016).



Εικόνα 1. Γενικό σχέδιο ελέγχου της αναπαραγωγής σε θήλειες και άρρενες.

1.1.2 Γενικές Έννοιες και Ορολογίες

Η αναπαραγωγή (reproduction) βασίζεται στη σύντηξη γυναικείων και ανδρικών γαμετών (gametes), γνωστών και με τον όρο αναπαραγωγικά (γεννητικά) κύτταρα [reproductive (germ) cells], καθένα από τα οποία διαθέτει μία απλοειδή σειρά χρωμοσωμάτων. Ο κάθε γαμέτης φέρει ένα χρωμόσωμα από το κάθε ζεύγος ομόλογων χρωμοσωμάτων και η σύντηξη δύο γαμετών οδηγεί στη δημιουργία ενός γενετικά μοναδικού ατόμου που φέρει μία πλήρη διπλοειδή σειρά χρωμοσωμάτων. Το γυναικείο (female) και το ανδρικό (male) αναπαραγωγικό σύστημα (reproductive system) έχουν σχεδιαστεί για την παραγωγή διαφορετικών γαμετών, η ένωση των οποίων δίνει νέα άτομα (Sherwood, 2016).

Κύρια-Πρωτογενή Αναπαραγωγικά Όργανα (primary reproductive organs)

Τα κύρια-πρωτογενή αναπαραγωγικά όργανα είναι γνωστά ως γονάδες (gonads) και είναι το ζεύγος ωοθηκών (ovaries) στις γυναίκες και το ζεύγος όρχεων (testes) στους άνδρες. Ο ρόλος τους και για τα δύο φύλα είναι διττός: (i) παράγουν τα κύτταρα αναπαραγωγής μέσω της γαμετογένεσης (gametogenesis), που είναι τα ωάρια (ova) στις γυναίκες και τα σπερματοζώαρια (spermatozoa) ή σπέρμα (sperm) στους άνδρες και (ii) εκκρίνουν τις φυλετικές ορμόνες, κυρίως τα οιστρογόνα (estrogen) και την προγεστερόνη (progesterone) στις γυναίκες και την τεστοστερόνη (testosterone) στους άνδρες (Vander et al., 2011; Sherwood, 2016).

Πέρα των γονάδων στο αναπαραγωγικό σύστημα περιλαμβάνεται και την αναπαραγωγική (reproductive) ή γεννητική οδό (genital tract), ένα σύστημα που αποτελείται από αγωγούς υπεύθυνους για τη μεταφορά ή τη φιλοξενία των γαμετών μετά την αναπαραγωγή τους, και τους επικουρικούς φυλετικούς αδένες (accessory sex glands), οι εκκρίσεις των οποίων παροχετεύονται στη γεννητική οδό και φέρουν βοηθητικό ρόλο στον αναπαραγωγή. Τα εξωτερικά εμφανή μέρη του αναπαραγωγικού συστήματος αποτελούν τα εξωτερικά γεννητικά όργανα (external genitalia), με τους μαστούς των γυναικών να αποτελούν επικουρικούς φυλετικούς αδένες (Sherwood, 2016).

Δευτερογενή Φυλετικά Χαρακτηριστικά (secondary sexual characteristics)

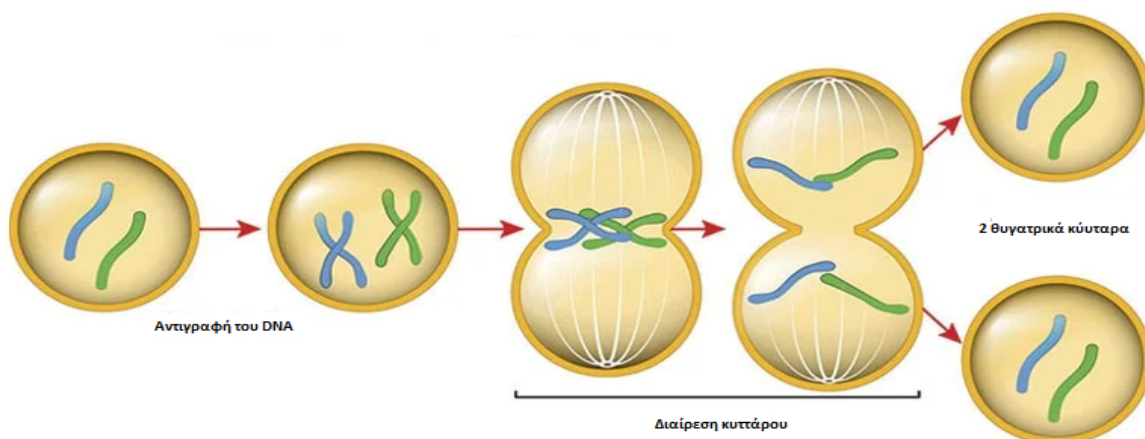
Τα δευτερογενή φυλετικά χαρακτηριστικά αποτελούν εξωτερικά χαρακτηριστικά, όπως είναι η σωματική διάπλαση, η κατανομή των τριχών, τα οποία διακρίνουν τις γυναίκες από τους άνδρες, χωρίς να εμπλέκονται όμως άμεσα στην αναπαραγωγή. Η ανάπτυξη και η

διατήρηση των δευτερογενών χαρακτηριστικών ελέγχεται από τα οιστρογόνα στις γυναίκες και την τεστοστερόνη στους άνδρες (Sherwood, 2016).

1.1.3 Γενικές Αρχές Γαμετογένεσης

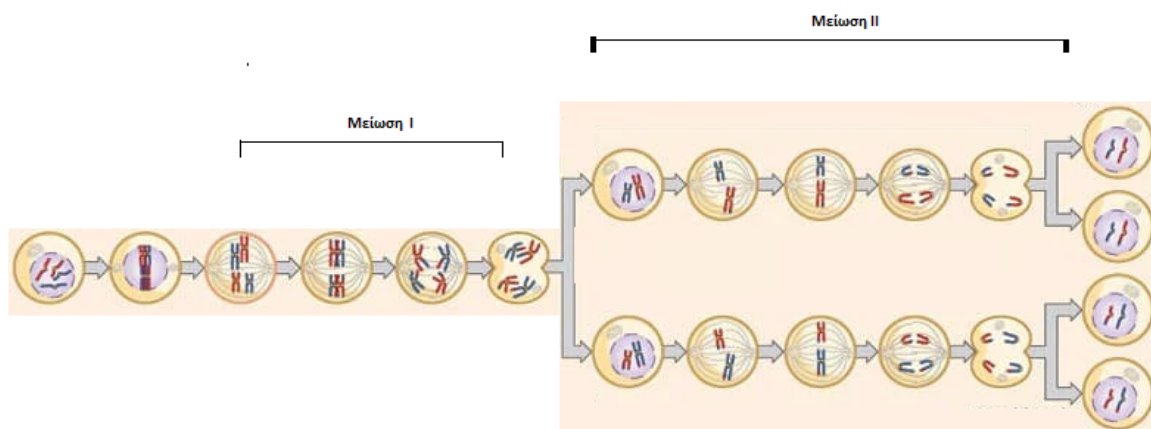
Οι γενικές αρχές της γαμετογένεσης είναι κοινές τόσο στις θήλειες, όσο και στους άρρενες. Ειδικότερα, το πρώτο στάδιο της γαμετογένεσης είναι ο πολλαπλασιασμός, μέσω μίτωσης, των αρχέγονων γαμετικών κυττάρων. Το παρόν στάδιο παρέχει ταυτόσημα γεννητικά κύτταρα για τα επακόλουθα στάδια. Βέβαια, η χρονική σύμπτωση της μιτωτικής δραστηριότητας διαφέρει μεταξύ των δύο φύλων. Συγκεκριμένα, στις γυναίκες, η μιτωτική διαίρεση των γαμετικών κυττάρων συμβαίνει αποκλειστικά κατά τη διάρκεια της εμβρυονικής ανάπτυξης του ατόμου. Στους άνδρες παρατηρείται μίτωση στο έμβryo για τη δημιουργία πλήθους γαμετικών κυττάρων μέχρι τη γέννηση, όμως η ουσιαστική μίτωση ξεκινά κατά την εφηβεία και συνεχίζεται καθ'όλη τη διάρκεια της ζωής τους (Εικόνα 2) (Vander et al., 2011).

Το δεύτερο στάδιο της γαμετογένεσης είναι η μείωση, που αφορά μια αλληπάλληλη διαδικασία δύο κυτταρικών διαιρέσεων με κατάληξη την παροχή 23 χρωμοσωμάτων στον κάθε γαμέτη (Εικόνα 3). Τέλος, ακολουθούν ο επιχιασμός χρωμοσωμάτων και η τυχαία κατανομή μητρικών και πατρικών χρωματίδων στα θυγατρικά κύτταρα κατά τη μείωση, δύο διαδικασίες που προσδίδουν τη γενετική ποικιλότητα των γαμετών (Vander et al., 2011).



Εικόνα 2. Διαδικασία Μίτωσης.

Προτού αρχίσει η μίτωση, το DNA αντιγράφεται και δημιουργούνται δύο αδελφές χρωματίδες, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους στο κεντρομερίδιο. Κατά τη μίτωση, οι αδελφές χρωματίδες συμπηκνώνονται έντονα και εν συνεχεία διαχωρίζονται και κινούνται σε αντίθετους πόλους του κυττάρου, καθώς αυτό διαιρείται για να προκύψουν δυο θυγατρικά κύτταρα (<https://microbenotes.com/mitosis/>).



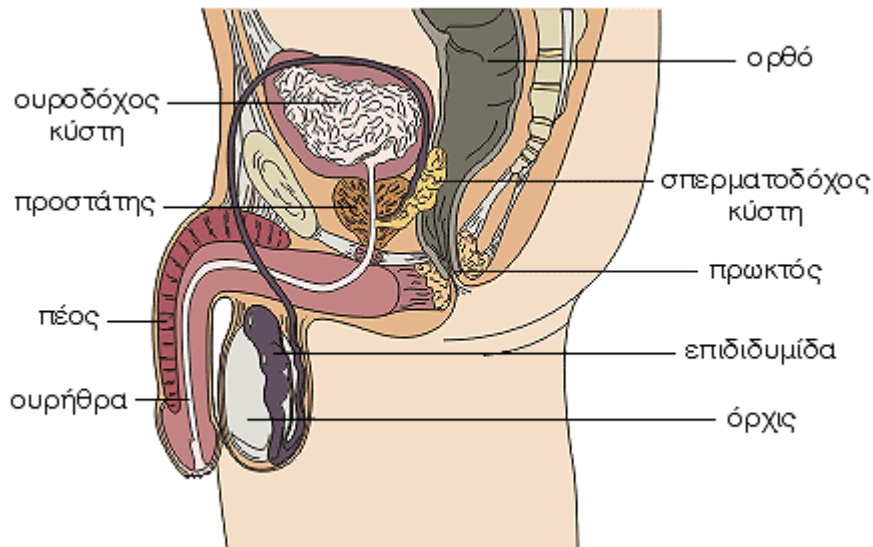
Εικόνα 3. Διαδικασία Μείωσης.

Η διαδικασία της μείωσης περιλαμβάνει την αντιγραφή του DNA αρχικά και δυο μειωτικές διαιρέσεις, από τις οποίες τελικά θα προκύψουν θυγατρικά απλοειδή κύτταρα με 23 χρωμοσώματα μονής χρωματίδας (<https://microbenotes.com/meiosis/>).

1.1.4 Αναπαραγωγική Φυσιολογία στον Άνδρα

Το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα περιλαμβάνει δύο όρχεις, το σύστημα σωληναρίων για αποθήκευση και μεταφορά του σπέρματος προς το εξωτερικό του σώματος, τους αδένες που εκβάλλουν σε αυτό και το πέος. Τα όργανα αυτά καλούνται επικουρικά. Οι όρχεις φέρουν διττή λειτουργία, σπερματογόνο, καθώς στα σπειροειδή σπερματικά σωληνάρια τους επιτελείται η παραγωγή του σπέρματος και τεστοστερογόνο, διότι στα κύτταρα Leydig, τα οποία περιβάλλονται στα κενά συνδετικού ιστού ανάμεσα στα σπερματικά σωληνάρια, παράγεται η τεστοστερόνη. Η σύνδεση των σπερματικών σωληναρίων δημιουργεί το ορχικό δίκτυο, εκ του οποίου μικροί αγωγοί εκβάλλουν σε έναν αγωγό εντός της επιδιδυμίδας, η οποία δημιουργεί τον σπερματικό πόρο, που μαζί με τα αιμοφόρα αγγεία και τα νεύρα που τροφοδοτούν τους όρχεις, προσδένονται στον σπερματικό τόνο. Ο σπερματικός τόνος διασχίζει τους όρχεις, το βουβωνικό πόρο και πορεύεται στην ουροδόχο κύστη, όπου δημιουργούνται οι δύο εκσπερματικοί πόροι, στους οποίους αποχετεύεται το υλικό των σπερματοδόχων κύστεων. Εν συνεχεία ο πόρος εισέρχεται στον πυρήνα του αδενοειδούς προστάτη και ενώνεται με την ουροδόχο κύστη. Ο προστάτης περιβάλλει το άνω μέρος της ουρήθρας, η οποία εισέρχεται στο πέος και οι βουλβουρηθραίοι αδένες που κείνται κάτω από αυτόν εκρέουν εντός της ουρήθρας (Εικόνα 4). Οι εκκρίσεις

αυτές καλούνται σπερματικό υγρό, το οποίο αποτελεί μίγμα αδενικού εκκρίματος και σπερματοζωαρίων, τα οποία καταβάλουν το μικρότερο ποσοστό (Vander et al., 2011).



Εικόνα 4. Ανατομικό διάγραμμα αναπαραγωγικού συστήματος του άνδρα. Η ουροδόχος κύστη, το ορθό και ο πρωκτός δεν αποτελούν μέρος του αναπαραγωγικού συστήματος, αλλά απεικονίζονται για λόγους προσανατολισμού (<https://biologynet.wordpress.com/>).

Η διαδικασία της σπερματογένεσης άρχεται από την εφηβεία και κάθε σπερματογόνο, που καλείται το αδιαφοροποίητο γαμετικό κύτταρο, διαιρείται με μίτωση και δίνει ολόκληρη σειρά κλώνων σπερμογόνιων, μέχρι τελικής μιτωτικής διαίρεσης από την οποία προκύπτουν τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα. Τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα υπόκεινται την πρώτη μειωτική διαίρεση κατά την σπερματογένεση και από το κάθε ένα προκύπτουν δύο δευτερογενή σπερματοκύτταρα, καθένα από τα οποία φέρουν 23 χρωμοσώματα. Ακολούθως, καθένα δευτερογενές υποκειται δεύτερη μειωτική διαίρεση προς δημιουργία των σπερματίδων, με μία χρωματίδα στην καθεμία. Τέλος, πραγματοποιείται η διαφοροποίηση της σπερματίδας σε σπερματοζώαριο, με την κεφαλή του να περιέχει το DNA με το σύνολο της γενετικής πληροφορίας. Όλη η διαδικασία της σπερματογένεσης έχει διάρκεια περίπου 64 ημέρες, με τον μέσο υγιή άρρεν άνθρωπο να παρασκευάζει 30 εκατομμύρια σπερματοζώαρια ανά ημέρα (Vander et al., 2011).

1.1.5 Αναπαραγωγική Φυσιολογία στη Γυναίκα

Το θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα περιλαμβάνει δύο ωοθήκες, δύο ωαγωγούς, τη μήτρα και τον κόλπο, που αποτελούν τα έσω γεννητικά όργανα. Το ουροποιητικό σύστημα, σε αντίθεση με τους άρρενες, αποτελεί ξεχωριστό σύστημα από το αναπαραγωγικό. Τα έξω γεννητικά όργανα περιλαμβάνουν το εφηβαίο, τα μικρά και μεγάλα χείλη, την κλειτορίδα, τον πρόδρομο του κολεού και τους προδομικούς αδένες (Εικόνα 5) (Vander et al., 2011).



Εικόνα 5. Αναπαραγωγικό σύστημα θηλέος (<https://biologynet.wordpress.com/>).

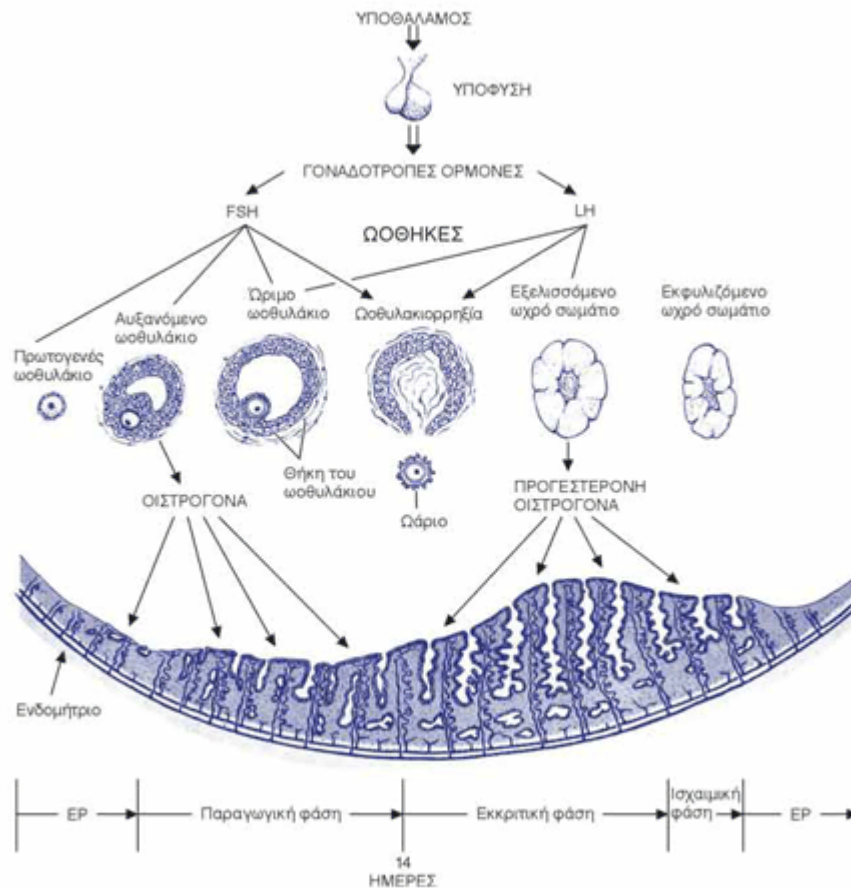
Η ωογένεση φέρει διαφορές σε σχέση με τη γαμετογένεση στους άρρενες. Οι ωοθήκες των γυναικών φέρουν κατά τη γέννηση 2 με 4 εκατομμύρια ωάρια, στα οποία δεν προστίθενται καινούρια, που σημαίνει πως είναι καθορισμένος ο αριθμός των γαμετικών κυττάρων, εκ των οποίων μόνο περίπου 400 προορίζονται για ωορρηξία. Στα πρώτα στάδια ανάπτυξης της μήτρας τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα, τα ωογόνια υπόκεινται σε διαδοχικές μιτωτικές διαιρέσεις και παύουν να διαιρούνται 3 μήνες μετά την εμβρυονική σύλληψη. Στο έμβρυο τα ωογόνια αναπτύσσονται σε πρωτογενή ωοκύτταρα, τα οποία υπόκεινται στην πρώτη μειωτική διαίρεση και παραμένουν σε αυτή τη φάση, η οποία καλείται μειωτική παύση. Η παύση αυτή διατηρείται ως την εφηβεία, όπου επανέρχεται η ενεργή φάση της ωοθήκης, κατά την οποία τα πρωτογενή ωοκύτταρα που προορίζονται για ωορρηξία ολοκληρώνουν την πρώτη μειωτική διαίρεση, μόλις πριν την ωορρηξία. Η δεύτερη μειωτική διαίρεση πραγματοποιείται στη μήτρα μετά από την ωορρηξία, στην περίπτωση μόνο που πραγματοποιείται γονιμοποίηση, εισχώρηση δηλαδή του σπερματοζωαρίου στο ωάριο (Vander et al., 2011).

Τα ωάρια βρίσκονται εντός ανατομικών δομών που ονομάζονται θυλάκια και προέρχονται από αρχέγονα θυλάκια, τα οποία αποτελούνται από ένα πρωτογενές ωάριο και ένα στρώμα κοκκιωδών κυττάρων, τα οποία περιβάλλουν το ωάριο και την έξω στιβάδα των κυττάρων της θήκης. Καθώς αναπτύσσονται τα ωοθυλάκια αυξάνουν σε μέγεθος, πολλαπλασιάζονται τα κοκκιώδη κύτταρα και διαχωρίζονται τα ωοκύτταρα από τα έσω κοκκιώδη μέσω της διαφανής ζώνης. Τα κοκκιώδη κύτταρα είναι υπεύθυνα για την έκκριση οιστρογόνων, μικρής ποσότητας προγεστερόνης και ανασταλτίνης. Καθώς τα πρωτογενή ωοθυλάκια προσεγγίζουν το τελικό τους μέγεθος, αρχίζει να σχηματίζεται στο μέσο των κοκκιωδών κυττάρων ένα σπήλαιο με εκκριτικά υγρά των κυττάρων αυτών και ονομάζεται άντρο. Στη διάρκεια του καταμήνιου κύκλου προσπληλαιοειδή (χωρίς άντρο) και πρώιμα σπηλαιοειδή (με άντρο) θυλάκια αναπτύσσονται, όμως μόνο ένα, το κυρίαρχο θυλάκιο αναπτύσσεται πλήρως μέχρι το στάδιο της ωρίμανσης και της ωορρηξίας. Με το πέρας της ωορρηξίας τα υπολειπόμενα κύτταρα του θυλακίου διαφοροποιούνται σε ωχρο σωματίο, το οποίο φέρει διάρκεια 10 με 14 ημέρες αν δεν έχει επέλθει κύηση (Εικόνα 6) (Vander et al., 2011).

Ο καταμήνιος κύκλος διαιρείται βάσει ωοθηκικού συμβάντος σε θυλακική και ωχρινική φάση με διάρκεια περίπου 14 ημέρες και διαχωριστική τους φάση την ωορρηξία. Οι φάσεις αυτές βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο ορμονών που εκκρίνονται από τις ωοθήκες, την πρόσθια υπόφυση και τον υποθάλαμο. Στο πρώιμο και μέσο στάδιο της θυλακικής φάσης δρουν η θυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH), η οποία διεγείρει την υπερπλασία των κοκκιωδών κυττάρων, τα οποία εκκρίνουν τα οιστρογόνα και η ωχρινοτρόπος (ωχρινοποιητική) ορμόνη (LH), η οποία διεγείρει τα κύτταρα της θήκης να πολλαπλασιαστούν και να παράξουν ανδρογόνα. Τα οιστρογόνα ασκούν αρνητική ανατροφοδότηση στην πρόσθια υπόφυση προς αναστολή έκκρισης γοναδοτροπινών. Στο όψιμο στάδιο της θυλακικής φάσης υφίσταται πολύ υψηλό επίπεδο οιστρογόνων, το οποίο προκαλεί παλιρροϊκό κύμα έκκρισης LH, ακόλουθο του οποίου είναι η συμπλήρωση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, η ωορρηξία και ο σχηματισμός του ωχρού σωματίου. Στην ωχρινική φάση υπάρχει επίδραση μικρής ποσότητας LH και το ωχρο σωματίο εκκρίνει προγεστερόνη και οιστρογόνα, μέχρι να επέλθει ο εκφυλισμός του (Εικόνα 6) (Vander et al., 2011).

Στη διάρκεια του καταμήνιου κύκλου υφίστανται μεταβολές στη μήτρα. Συγκεκριμένα, η ωοθυλακική φάση ισοδυναμεί με την εμμυνορυσιακή και παραγωγική φάση, με την πρώτη να συμβαίνει όταν όταν μειώνονται τα επίπεδα οιστρογόνων και προγεστερόνης του πλάσματος λόγω εκφυλισμού του ωχρού σωματίου και τη δεύτερη να

συνοδεύεται από τη διέγερση ανάπτυξης του ενδομητρίου και μυομητρίου από τα οιστρογόνα και μετατροπή της τραχηλικής βλέννας σε σπερματοδιαπερατή μεμβράνη. Τέλος, κατά την ωχρινική φάση, η οποία ισοδυναμεί με την εκκριτική, η προγεστερόνη μετατρέπει το οιστρογονόφιλο ενδομήτριο σε εκκριτικό υγρό και αναστέλλει τις μητρικές συστολές (Εικόνα 6) (Vander et al., 2011).



Εικόνα 6. Αλλαγές στις ωοθήκες και οι αντίστοιχες στη μήτρα κατά τη διάρκεια του καταμήνιου κύκλου (<https://www.eugonia.com.gr/>).

1.2 Υπογονιμότητα

Ο όρος γονιμότητα χρησιμοποιείται για να χαρακτηριστεί η ικανότητα δημιουργίας κλινικής εγκυμοσύνης, ενώ ο όρος υπογονιμότητα για την αποτυχία δημιουργίας αυτής μετά από 12 μήνες τακτικής, απροστάτευτης σεξουαλικής επαφής (Zegers-Hochschild et al., 2017). Παγκοσμίως περισσότεροι από 186 εκατομμύρια άνθρωποι είναι αντιμέτωποι με ζητήματα υπογονιμότητας, με την πλειοψηφία αυτών να ανήκουν στις αναπτυσσόμενες χώρες (Inhorn & Patrizio, 2015).

Η υπογονιμότητα κατηγοριοποιείται περαιτέρω σε πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή. Η πρωτοπαθώς υπογόνιμη γυναίκα είναι αυτή που δεν έχει ποτέ διαγνωστεί με κλινική εγκυμοσύνη και πληροί τα κριτήρια ταξινόμησης ως υπογόνιμη. Η δευτερογενής γυναικεία υπογονιμότητα αναφέρεται σε μια γυναίκα που δεν μπορεί να θεμελιώσει κλινική εγκυμοσύνη, αλλά έχει προηγουμένως διαγνωστεί με κλινική εγκυμοσύνη (Zegers-Hochschild et al., 2017). Η ίδια κατηγοριοποίηση μπορεί να ισχύει και για τον άνδρα, αναφορικά με τη συμμετοχή του στην έναρξη της εγκυμοσύνης.

Οι παράγοντες που συμβάλλουν στην υπογονιμότητα περιλαμβάνουν:

- 1) **Σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα (ΣΜΝ).** Ειδικότερα, οι λοιμώξεις από ποικίλα σεξουαλικά μεταδιδόμενα παθογόνα, όπως τα *Chlamydia trachomatis* και *Neisseria gonorrhoeae*, έχουν αρνητική επίπτωση στη γονιμότητα. Επιπλέον, υφίσταται συσχέτιση μεταξύ της λοίμωξης από το *Mycoplasma genitalium* και των συνδρόμων της γυναικείας αναπαραγωγικής οδού, καθώς και την αύξηση του κινδύνου υπογονιμότητας (Lis et al., 2015).
- 2) **Γενετικοί παράγοντες.** Για παράδειγμα, μια ροβερτιανή μετατόπιση μπορεί να προκαλέσει επαναλαμβανόμενες αυτόματες αποβολές ή πλήρη υπογονιμότητα. Επίσης, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο NR5RA1 που κωδικοποιεί τον στεροειδογόνο παράγοντα-1 (SF-1) έχουν βρεθεί σε άνδρες με μη αποφρακτικό παράγοντα υπογονιμότητας (Ferraz-de-Souza et al., 2011). Επιπλέον, πολυμορφισμοί γονιδίων που εμπλέκονται στη διαδικασία της γονιμοποίησης είναι συχνά υπεύθυνοι για ζητήματα υπογονιμότητας (Rodríguez et al., 2018).
- 3) **Βλάβες του DNA.** Βλάβες στο γενετικό υλικό ευθύνονται για τη μείωση της γονιμότητας, όπως για παράδειγμα αυτές που προκαλούνται στα ωοκύτταρα εξαιτίας τους καπνίσματος και στο ανδρικό σπέρμα εξαιτίας οξειδωτικών βλαβών (Zenzes, 2000; Gharagozloo & Aitken, 2011).
- 4) **Ασθένειες και Παθήσεις.** Συγκεκριμένα, ευθύνη για την υπογονιμότητα φέρουν ο σακχαρώδης διαβήτης, οι διαταραχές του θυρεοειδούς, η νόσος των επινεφριδίων, οι υποθαλαμικοί υποφυσιακοί παράγοντες, η υπερπρολακτιναιμία, η παρουσία αντιθυρεοειδικών αντισώματα κ.α. (Jangir & Jain, 2014; Tersigni et al., 2014; Dosiou, 2020; Unuane & Velkeniers, 2020).
- 5) **Τοξίνες,** όπως οι πτητικοί οργανικοί διαλύτες ή σιλικόνες, η χημική σκόνη και τα φυτοφάρμακα (Krzastek et al., 2020).

6) **Ανοσολογικοί παράγοντες.** Παράδειγμα αποτελούν τα αντισπερματικά αντισώματα, τα οποία σχετίζονται με την παρεμπόδιση της σύντηξης σπερματοζωαρίου-ωαρίου (Vickram et al., 2019).

Τόσο οι άνδρες όσο και οι γυναίκες μπορεί να είναι υπογόνιμοι και η υπογονιμότητα του ζευγαριού προκύπτει από το συνδυασμό παραγόντων που επηρεάζουν τη γονιμότητα αυτών. Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως ο κάθε σύντροφος μπορεί να είναι ανεξάρτητα γόνιμος, αλλά το ζευγάρι να αδυνατεί να συλλάβει χωρίς βοήθεια (Avidor-Reiss et al., 2015).

1.2.1 Γυναικεία Υπογονιμότητα

Η επίτευξη εγκυμοσύνης είναι εφικτή όταν η κολπική επαφή πραγματοποιείται από τη στιγμή που το ωάριο απελευθερώνεται από την ωοθήκη της γυναίκας. Επιπλέον, είναι σημαντικό το “σύστημα παραγωγής ωαρίων” να λειτουργεί στα βέλτιστα επίπεδα και οι ορμόνες να είναι ισορροπημένες (Sherwood, 2016). Στις γυναίκες οι δυσκολίες γονιμοποίησης προκύπτουν κυρίως, είτε από δομικά προβλήματα στη σάλπιγγα ή/και τη μήτρα, είτε από προβλήματα με την απελευθέρωση των ωαρίων. Η υπογονιμότητα μπορεί να προκληθεί από απόφραξη της σάλπιγγας λόγω δυσπλασίας, λοιμώξεων, όπως τα χλαμύδια ή ουλώδη ιστό. Για παράδειγμα, η ενδομητρίωση μπορεί να προκαλέσει στειρότητα με την ανάπτυξη ενδομητρικού ιστού στις σάλπιγγες ή/και γύρω από τις ωοθήκες (Tomassetti & D'Hooghe, 2018). Η φλεγμονώδης νόσος της πυέλου (PID) που προκαλείται από λοιμώξεις, όπως η φυματίωση, αποτελεί κι αυτή αιτία γυναικείας υπογονιμότητας (Anyalechi et al., 2019).

Επιπλέον σημαντική αιτία υπογονιμότητας στις γυναίκες μπορεί να είναι η αδυναμία ωορρηξίας. Δυσπλασίες των ωαρίων συχνά περιπλέκουν τη διαδικασία της σύλληψης. Ειδικότερα, παράδειγμα αποτελεί το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, στο οποίο τα ωάρια μόνο εν μέρει αναπτύσσονται εντός της ωοθήκης και υπάρχει περίσσεια ανδρικών ορμονών. Γυναίκες μπορεί να είναι υπογόνιμες κι επειδή οι ωοθήκες τους δεν ωριμάζουν και απελευθερώνουν ωάρια (Zehravi et al., 2021). Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τις πιθανότητες μιας γυναίκας για γονιμοποίηση αποτελούν ο πολύ υψηλός ή χαμηλός δείκτης μάζας σώματος (BMI) και η ηλικία, καθώς η γυναικεία γονιμότητα μειώνεται μετά την ηλικία των 30 ετών (Zehravi et al., 2021; Brandt et al., 2018).

1.2.2 Ανδρική υπογονιμότητα

Βασική αιτία της ανδρικής υπογονιμότητας αποτελεί η χαμηλή ποιότητα του σπέρματος. Σε άνδρες που φέρουν τα απαραίτητα αναπαραγωγικά όργανα η υπογονιμότητα μπορεί να προκληθεί από χαμηλό αριθμό σπερματοζωαρίων εξαιτίας ενδοκρινικών προβλημάτων, φαρμάκων, ακτινοβολίας ή μόλυνσης. Επιπλέον, μπορεί να υφίσταται δυσπλασία των όρχεων, ορμονική ανισορροπία ή απόφραξη του συστήματος σπερματικών αγωγών. Αρκετά από τα προαναφερόμενα προβλήματα είναι δυνατό να αντιμετωπιστούν με χειρουργική επέμβαση ή ορμονικές υποκαταστάσεις, ωστόσο ορισμένα μπορεί και να είναι αόριστα, οπότε δυσχεραίνει η αντιμετώπισή τους (Leaver, 2016). Η υπογονιμότητα μπορεί να σχετίζεται και με πιθανή ακινησία ή χαμηλή κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (Khatun et al., 2018). Σημαντικό ρόλο στην υπογονιμότητα διαδραματίζει και ο κατακερματισμός του DNA του σπέρματος, καθώς φαίνεται να συνδέεται με περιστατικά ανεξήγητης υπογονιμότητας και υποτροπιάζουσας απώλειας εγκυμοσύνης (Cho & Agarwal, 2017).

Περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η έκθεση σε χημική σκόνη και φυτοφάρμακα έχουν επίσης δυσμενή επίδραση στην ανδρική γονιμότητα (Krzastek et al., 2020). Εξίσου αρνητική επίδραση φέρουν και ευρέως χρησιμοποιούμενα φυτοφάρμακα DDT (p,p'-Δίχλωροδιφαινυλοτριχλωροαιθάνιο), βιομηχανικά χημικά π.χ. PCB (πολυχλωριωμένα διφαινύλια), περιβαλλοντικοί ρύποι, όπως η διοξίνη και θεραπευτικά φάρμακα, όπως τα αντικαρκινικά σκευάσματα (Krzastek et al., 2020).

1.3 Υποβοηθούμενη αναπαραγωγή

Η θεραπευτική αντιμετώπιση της υπογονιμότητας εξαρτάται άμεσα από την αιτία που την προκαλεί και μπορεί να περιλαμβάνει από συμβουλευτική έως υποβοηθούμενες θεραπείες γονιμότητας. Σύμφωνα με συστάσεις της ESHRE (Ευρωπαϊκή Εταιρεία Ανθρώπινης Αναπαραγωγής και Εμβρυολογίας - European Society of Human Reproduction and Embryology) τα ζευγάρια για τα οποία εκτιμάται πιθανότητα ζώντων γεννήσεων από 40% και άνω ενθαρρύνονται να συνεχίσουν να στοχεύουν σε μια αυτόματη εγκυμοσύνη (ESHRE, <https://www.eshre.eu/>). Σε κάθε άλλη περίπτωση που θα επιλεγεί μέθοδος υποβοηθούμενης αναπαραγωγής θα πρέπει το εκάστοτε πρόβλημα να μελετάται με βάση τη μοναδικότητά του και το ζευγάρι να αντιμετωπίζεται ως μία οντότητα και η κατάλληλη μέθοδος υποβοηθούμενης αναπαραγωγής θα πρέπει να επιλέγεται βάσει τέτοιων κριτηρίων, ώστε οι ανάγκες του ζευγαριού να καλύπτονται στο μέγιστο δυνατό βαθμό.

Οι μέθοδοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής περιλαμβάνουν τη χρήση φαρμάκων, ιατρικών τεχνικών, χειρουργικής επέμβασης ή συνδυασμό αυτών. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται τόσο για γυναίκες όσο και για άνδρες, περιλαμβάνουν κιτρική κλομιφαίνη, ανθρώπινη εμμηνοπαυσιακή γοναδοτροπίνη (hMG), ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH), ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG), ανάλογα ορμόνης απελευθέρωσης γοναδοτροπίνης (GnRH), αναστολείς της αρωματάσης και μετοφορμίνη (Quaas & Legro, 2019).

Οι διαθέσιμες τεχνολογικές μέθοδοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής είναι (α) η ενδομήτρια σπερματέγχυση (IntraUterine Insemination – IUI), (β) εξωσωματική γονιμοποίηση (In Vitro Fertilization – IVF), (γ) η μικρογονιμοποίηση ή ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίων (IntraCytoplasmic Sperm Injection – ICSI), (δ) η ενδοσαλπινγική μεταφορά γαμετών (Gamete IntraFallopian Transfer – GIFT/ Zygote IntraFallopian Transfer – ZIFT), (ε) η κατάψυξη ωαρίων / εμβρύων, (στ) η δωρεά ωαρίων και (η) η παρένθετη μητρότητα.

1.3.1 Εξωσωματική γονιμοποίηση

Η εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF - In Vitro Fertilization) είναι η πιο συνηθισμένη μέθοδος ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και όπως προδίδεται από την ονομασία της πρόκειται για γονιμοποίηση έξω από το σώμα, αντί δηλαδή η γονιμοποίηση του ωαρίου από το σπερματοζωάριο να γίνει στη σάλπιγγα της γυναίκας, γίνεται σε ειδικό εμβρυολογικό εργαστήριο (Bosch et al., 2020).

Η πρώτη επιτυχής προσπάθεια εξωσωματικής γονιμοποίησης ή γονιμοποίησης in vitro σημειώθηκε το 1978 με τη γέννηση της Louise Brown, του πρώτου «παιδιού του σωλήνα» (Steptoe & Edwards, 1978). Έκτοτε έχουν γεννηθεί εκατομμύρια παιδιά ανά τον κόσμο με τη βοήθεια της εξωσωματικής και άλλων μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε η εξωσωματική γονιμοποίηση αποτελεί την πλέον διαδεδομένη εξ αυτών. Η διαδικασία της εξωσωματικής γονιμοποίησης περιλαμβάνει τα βασικά στάδια διερεύνησης της υπογονιμότητας, διέγερσης των ωοθηκών και πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας, ωοληψίας και σπερμοληψίας, γονιμοποίησης και εμβρυεταφοράς (Bosch et al., 2020).

Αρχικά, γίνονται προκαταρκτικές εξετάσεις στο ζευγάρι για να διερευνηθεί και να διαγνωστεί η υπογονιμότητα. Στη συνέχεια ακολουθεί το στάδιο διέγερσης των ωοθηκών και

πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας, με τη χρήση πρωτοκόλλων διέγερσης. Σκοπός του παρόν σταδίου είναι να διασωθούν τα ωοθυλάκια τα οποία φυσιολογικά θα οδηγούνταν στην ατρησία, οπότε υπολογίζεται ότι θα επέλθει ανάπτυξη 6-10 ωοθυλακίων ανά ωοθήκη. Για τη διέγερση των ωοθηκών χρησιμοποιούνται συνήθως οι GnRH αγωνιστές και οι GnRH ανταγωνιστές, σε συνδυασμό με γοναδοτροπίνες από ούρα μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών ή ανασυνδυασμένες γοναδοτροπίνες. Αναλόγως το πρωτόκολλο που έχει επιλεγεί να εφαρμοστεί ορίζεται και η διάρκεια λήψης των διεγερτικών ουσιών. Η ανάπτυξη και ωρίμανση των ωοθυλακίων παρακολουθείται υπερηχογραφικά σε συνδυασμό με μέτρηση της 17β-οιστραδιόλης. Η πρόκληση της ωοθυλακιορρηξίας γίνεται εφικτή με τη χορήγηση 5000 ή 10000 IU hCG ανασυνδυασμένης ή κεκαθαρωμένης από ούρα. Τα κριτήρια για την πρόκληση ωορρηξία είναι η ύπαρξη ικανοποιητικού αριθμού (2-3) ωοθυλακίων, μεγέθους άνω των 18 mm και τιμή οιστραδιόλης 600-800 pg/ml. Η τιμή της οιστραδιόλης υπολογίζεται 200-250 pg/ml για κάθε ωοθυλάκιο άνω των 14mm. Επόμενο στάδιο είναι η ωοληψία, η οποία πραγματοποιείται υπό πλήρη ή τοπική αναισθησία, 34-38 ώρες μετά τη χορήγηση της hCG. Συγκεκριμένα, ο γυναικολόγος αναρροφά διακοιλικά με μία βελόνα το ωοθυλακικό υγρό από τις ωοθήκες, με τη βοήθεια υπερηχογραφικού μηχανήματος με οδηγό για τη βελόνα στην κοιλιακή κεφαλή. Το ωοθυλακικό υγρό δίνεται στον εμβρυολόγο για την ανεύρεση των ωαρίων με τη βοήθεια του μικροσκοπίου.

Όταν ολοκληρωθεί η συλλογή σπέρματος του συντρόφου, επιλέγονται τα σπερματοζωάρια με τις καλύτερες παραμέτρους και τοποθετούνται σε ειδικά τρυβλία μαζί με τα ωάρια που έχουν συλλεγεί κατά την ωοληψία. Οι γαμέτες επωάζονται υπό αυστηρές εργαστηριακές συνθήκες σε ειδικά καλλιεργητικά υλικά για περίπου 18 ώρες και στη συνέχεια ελέγχεται ο αριθμός και η ποιότητα των γονιμοποιημένων ωαρίων. Η επίτευξη της γονιμοποίησης εκτιμάται με την παρουσία των δύο προπυρήνων και δύο πολικών σωματίων. Οι ζυγώτες επωάζονται για ακόμα 24-48 ώρες και κατά τη διάρκεια της επώασης αυτής αξιολογούνται το σχήμα, το μέγεθος και η ευθυγράμμιση των προπυρήνων, καθώς επίσης και τα νουκλεόλια των προπυρήνων. Περίπου 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση ελέγχεται η ποιότητα των εμβρύων, καθώς μόνο ποιοτικά καλά έμβρυα θα προχωρήσουν στο στάδιο της εμβρυομεταφοράς ή κατάψυξης για μελλοντική χρήση ή δωρεά. Τα έμβρυα αξιολογούνται με βάση την ταχύτητα των κυτταρικών διαιρέσεων, το μέγεθος και το σχήμα των βλαστομεριδίων, και την ύπαρξη εξοκυτταρικών σπασιμάτων (fragmentation).

Το τελικό στάδιο της εξωσωματικής γονιμοποίησης είναι η μεταφορά των εμβρύων. Η εμβρυομεταφορά πραγματοποιείται 2-3 ημέρες μετά την ωοληψία (έμβρυα στο στάδιο 8 κυττάρων) ή 6 ημέρες μετά την ωοληψία (έμβρυα στο στάδιο βλαστοκύστης). Για τη

μεταφορά των εμβρύων χρησιμοποιείται ένας λεπτός καθετήρας, ο οποίος εισάγεται διακολπικά και στη συνέχεια με τη βοήθεια διακοιλιακής υπερηχογραφικής απεικόνισης, γίνεται απελευθέρωση των εμβρύων στο μέσον της ενδομητρικής κοιλότητας. Αφού γίνει απόσυρση του καθετήρα, ελέγχεται υπό το μικροσκόπιο για πιθανή κατακράτηση των εμβρύων. Ο αριθμός των εμβρύων που θα μεταφερθούν συναποφασίζεται με το ζευγάρι, συνήθως όμως μεταφέρονται 3 έμβρυα, εκτός εάν η γυναίκα είναι άνω των 40 ετών, οπότε επιτρέπεται η μεταφορά έως και 4 εμβρύων. Εάν υπάρχει μεγάλος αριθμός εμβρύων, μπορούν κάποια από αυτά να καταψυχθούν ώστε να χρησιμοποιηθούν σε μελλοντική προσπάθεια. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι την ημέρα της εμβρυομεταφοράς γίνεται έναρξη συμπληρωματικής αγωγής με προγεστερόνη προς υποστήριξη της ωχρινικής φάσης. Ο έλεγχος κύησης γίνεται 12-14 ημέρες μετά την εμβρυομεταφορά με προσδιορισμό της β -hCG.

Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι η εξωσωματική γονιμοποίηση χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την αντιμετώπιση της υπογονιμότητας σαλπιγγικής αιτιολογίας και πλέον έχει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, με βασικότερες περιπτώσεις την αντιμετώπιση του σαλπιγγικού παράγοντα, τις διαταραχές της ωοθυλακιορρηξίας, την ενδομητρίωση, τον ανδρικό παράγοντα, την αποτυχία προηγούμενων προσπαθειών με άλλες μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, όπως σπερματέγχυση (IUI), των φορέων γενετικών ασθενειών και την ανεξήγητη υπογονιμότητα.

Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη πως η επιτυχία ή μη της εξωσωματικής γονιμοποίησης εξαρτάται άμεσα από την ηλικία της γυναίκας, το/α αίτιο/α υπογονιμότητας, το είδος αγωγής διέγερσης των ωοθηκών, τον αριθμό διαθέσιμων ωαρίων και εμβρύων, τον αριθμό και την ποιότητα μεταφερομένων εμβρύων, την ποιότητα και κινητικότητα του σπέρματος, την ημέρα εμβρυομεταφοράς, την τεχνική εμβρυομεταφοράς και την ψυχολογία του ζευγαριού.

1.3.2 Πρωτόκολλα Διέγερσης

Τα πρωτόκολλα Διέγερσης που χρησιμοποιούνται στην εξωσωματική γονιμοποίηση είναι τα:

- Μακρύ πρωτόκολλο με GnRH αγωνιστή,
- Βραχύ πρωτόκολλο με GnRH αγωνιστή,
- Υπερ-βραχύ πρωτόκολλο με GnRH αγωνιστή,

- Πρωτόκολλο με GnRH ανταγωνιστή,
- Ήπιο πρωτόκολλο διέγερσης και
- Υπερβραχύ πρωτόκολλο και ανταγωνιστής.

Μακρύ πρωτόκολλο με GnRH αγωνιστή

Η έναρξη του GnRH αγωνιστή γίνεται τη 2 η ή την 21 η ημέρα από την τελευταία έμμηνο ρύση και συνεχίζεται καθημερινά για 10-14 ημέρες οπότε και προγραμματίζεται το πρώτο υπερηχογράφημα (U/S). Εάν αυτό το υπερηχογράφημα είναι ικανοποιητικό, δηλαδή εφόσον δεν ανιχνεύεται κύστη > 15mm και το πάχος του ενδομητρίου είναι < 5mm, τότε ξεκινάει η καθημερινή υποδόρια χορήγηση της γοναδοτροπίνης σε δοσολογία 225-300 I.U. Από αυτή την ημέρα που ορίζεται ως πρώτη ημέρα διέγερσης, συνεχίζεται και η λήψη του αγωνιστή για να προληφθεί ένα πρόωρο κύμα της LH. Η δόση του αγωνιστή συνήθως μειώνεται στο μισό. Η διαπίστωση της ικανοποιητικής δράσης του αγωνιστή γίνεται με μέτρηση της οιστραδιόλης (E2) περίπου 10-14 ημέρες από την έναρξη χορήγησής του (πρέπει να είναι <30 pg/ml). Εάν η E2 είναι >30 pg/ml, αλλά τα υπερηχογραφικά ευρήματα είναι ικανοποιητικά, τότε συνεχίζεται η χορήγηση του αγωνιστή για τρεις ημέρες και εάν τότε η E2 ελαττωθεί, ξεκινά η διέγερση. Οι γυναίκες που δεν εμφανίζουν ικανοποιητική καταστολή ενημερώνονται ότι πρέπει να συνεχίσουν τη λήψη του αγωνιστή για ακόμα 7 ημέρες και να προσέλθουν για νέο υπερηχογράφημα. Εάν υπάρχει κύστη, πραγματοποιείται επανάληψη του U/S ελέγχου σε 1 εβδομάδα, ενώ παράλληλα συνεχίζεται ο αγωνιστής για την καταστολή της υπόφυσης. Εάν η κύστη παραμένει 1 εβδομάδα αργότερα στις ίδιες διαστάσεις, τότε γίνεται παρακέντηση της κύστης ή ακυρώνεται ο κύκλος. Εάν η E2 είναι <30 pg/ml, αλλά το πάχος του ενδομητρίου είναι >5 mm, γίνεται επανάληψη του υπερηχογραφήματος ή υστεροσκόπηση για να αποκλεισθεί ενδομητρικός πολύποδας, ο οποίος αφαιρείται με υστεροσκόπηση ή απόξεση. Αφού ξεκινήσει η χορήγηση της γοναδοτροπίνης, τότε προγραμματίζεται νέο U/S μετά από 9-10 μέρες. Η δοσολογία της γοναδοτροπίνης μπορεί να τροποποιηθεί ανάλογα με την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και την τιμή της E2.

Step-Down Protocol: Έναρξη με υψηλές δοσολογίες και κατά τη διάρκεια του κύκλου ανάλογα με τα ευρήματα πραγματοποιούνται σταδιακές μειώσεις.

Step-Up Protocol: Ο κύκλος ξεκινάει με χαμηλή δοσολογία και στη συνέχεια αυξάνεται ανάλογα με την ωοθηκική απάντηση.

Η μέτρηση των διαστάσεων των ωοθυλακίων γίνεται σε δύο διαμέτρους. Τα ωοθυλάκια κρίνονται ώριμα όταν (α) ανιχνευθούν υπερηχογραφικά τουλάχιστον δύο

ωοθυλάκια μεγαλύτερα ή ίσα με 18 mm και εφόσον το ενδομήτριο είναι μεγαλύτερο των 7 mm, (β) η E2 είναι 200 pg/mL (ή 734 pmol/L) για κάθε ώριμο ωοθυλάκιο.

Μία δόση των 250 mcg ανασυνδουασμένης hCG ή 5.000 με 10.000 I.U. hCG χορηγείται 34-36 ώρες πριν την ωοληψία.

Βραχύ πρωτόκολλο με GnRH αγωνιστή

Το βραχύ πρωτόκολλο εκμεταλλεύεται αρχικά την αύξηση και στη συνέχεια την καταστολή της ενδογενούς FSH που προκαλεί ο αγωνιστής. Ο GnRH αγωνιστής ξεκινά την 3η ημέρα της έμμηνης ρύσης και η χορήγηση της γοναδοτροπίνης μετά από 1-2 ημέρες σε δοσολογία μέχρι και 600 I.U. Τα δύο φάρμακα συνεχίζονται έως την ημέρα χορήγησης της hCG. Η υπόλοιπη παρακολούθηση είναι όπως στο μακρύ πρωτόκολλο. Ένα δεύτερο υπερηχογράφημα διενεργείται την ημέρα 9, 10 ή 11, ενώ τα υπόλοιπα κάθε 2-3 ημέρες, ανάλογα με την ανάπτυξη των ωοθυλακίων.

Υπερ-βραχύ πρωτόκολλο με GnRH αγωνιστή

Το υπερ-βραχύ πρωτόκολλο εφαρμόζεται σε ασθενείς με προηγούμενη φτωχή απάντηση στις γοναδοτροπίνης. Αυτό εκμεταλλεύεται αποκλειστικά την αύξηση της FSH που συμβαίνει με τη χορήγηση του GnRH αγωνιστή. Ο τελευταίος χορηγείται από τις ημέρες 1 έως 3 του κύκλου και μετά διακόπτεται, ενώ η χορήγηση της γοναδοτροπίνης σε δοσολογία μέχρι 600 I.U. αρχίζει από την 3η-4η ημέρα έως την ημέρα χορήγησης της hCG. Μειονέκτημα του παρόντος πρωτοκόλλου είναι ο κίνδυνος της πρόωρης ωοθυλακιορρηξίας και η μη συγχρονισμένη ανάπτυξη των ωοθυλακίων.

Πρωτόκολλο με GnRH ανταγωνιστή

Για την έναρξη του πρωτόκολλου με GnRH ανταγωνιστή η γυναίκα προσέρχεται για U/S έλεγχο τη 2η μέρα του κύκλου της. Εφόσον δεν ανιχνευθεί κύστη >15mm και το πάχος του ενδομητρίου είναι <5mm ξεκινάει η λήψη της FSH. Στις γυναίκες με κύστη >15mm και ενδομήτριο >5mm η έναρξη της FSH αναστέλλεται και προγραμματίζεται νέο υπερηχογράφημα σε 1-2 μέρες. Ο δεύτερος U/S έλεγχος προγραμματίζεται την 5η-6η ημέρα της διέγερσης. Εάν ανιχνευθεί έστω και ένα ωοθυλάκιο >14mm, τότε ξεκινάει η χορήγηση του ανταγωνιστή, ώστε να εμποδιστεί ένα πρώιμο κύμα LH. Εφόσον το ωοθυλάκιο είναι <14mm, τότε η γυναίκα συνεχίζει τη λήψη της FSH και προγραμματίζεται νέο U/S κάθε 1-2 μέρες μέχρι να ανευρεθεί ωοθυλάκιο >14mm. Μετά την προσθήκη του ανταγωνιστή η γυναίκα ελέγχεται υπερηχογραφικά κάθε 2-3 μέρες μέχρι να εντοπιστούν τουλάχιστον δύο

ωοθυλάκια μεγαλύτερα ή ίσα με 18 mm και το πάχος του ενδομητρίου να φτάσει τα 7mm, οπότε και προγραμματίζεται η ωοληψία.

Συχνά γίνεται η τελική ωρίμανση των ωοθυλακίων όχι με τις κλασικές ενέσεις hCG, αλλά με τη χρήση των GnRH αγωνιστών, 1-4mg αγωνιστών σε μονή δόση ή χωριστά σε δύο δόσεις με απόσταση 12 ωρών.

Ήπιο πρωτόκολλο διέγερσης

Στο ήπιο πρωτόκολλο διέγερσης ακολουθείται ημερήσια χορήγηση δισκίων κιτρική κλομφαίνη 100mg από την 3η έως την 7η ημέρα. Ακολουθεί μία μόνο ενδομυϊκή χορήγηση 150 IU ανθρώπινης εμμηνοπαυσιακής γοναδοτροπίνης (hMG) την 9η ημέρα.

Αξιοσημείωτο είναι ότι ο αριθμός των ληφθέντων ωαρίων είναι στατιστικά λιγότερος από αυτόν του συμβατικού πρωτοκόλλου με GnRH αγωνιστή. Μετά τα πρώτα αποτελέσματα, προτάθηκαν διάφορα πρωτόκολλα ήπιας διέγερσης, με χαρακτηριστικά τα:

- Κιτρική κλομφαίνη και γοναδοτροπίνες καθημερινά (150 IU) από την 8η μέρα του κύκλου και ανταγωνιστής της GnRH από τη 10η μέρα,
- Κιτρική κλομφαίνη και γοναδοτροπίνες από την 8η μέρα του κύκλου μέρα παρά μέρα και τελική ωρίμανση των ωαρίων με GnRH αγωνιστή.

Υπερβραχύ πρωτόκολλο και ανταγωνιστής

Το υπερβραχύ πρωτόκολλο με ανταγωνιστή ξεκινά με τη χορήγηση ανταγωνιστή για τρεις συνεχόμενες ημέρες από την 1η μέρα της έμμηνης ρύσης. Οι γοναδοτροπίνες ξεκινάνε δύο μέρες αργότερα και ο ανταγωνιστής μόλις ανευρεθεί υπερηχογραφικά ένα ωοθυλάκιο 14mm. Το πρωτόκολλο αυτό συνδυάζει την αύξηση της FSH λόγω της χορήγησης του αγωνιστή και την ευεργετική δράση του ανταγωνιστή που προλαμβάνει την πρόωρη αιχμή της LH.

1.4 MicroRNAs

1.4.1 Εισαγωγή στα MicroRNAs

Το γονιδίωμα των ευκαρυωτικών κυττάρων πέρα από τις αλληλουχίες που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, στο μεγαλύτερο μέρος του αποτελείται από επαναλαμβανόμενα τμήματα DNA, καθώς και αλληλουχίες που φέρουν ρυθμιστικό ή άγνωστο ακόμη ρόλο. Πρόσφατα έχει γίνει ταυτοποίηση μικρών ρυθμιστικών non-coding RNAs (ncRNAs), τα οποία κωδικοποιούνται από μη γονιδιακές αλληλουχίες και συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκφρασης άλλων γονιδίων, είτε μεταβάλλοντας τη σταθερότητα των mRNA, ή την ικανότητά τους να μεταφράζονται (Watson et al., 2013).

Η ανακάλυψη των ncRNAs έδωσε νέες πληροφορίες σχετικά με το ανθρώπινο γονιδίωμα και ώθησε την επιστημονική κοινότητα να χαρακτηρίσει τα διαφορετικά είδη ncRNAs που εντοπίζονται στα ανθρώπινα κύτταρα (Oliveto et al., 2017). Τα ncRNAs ταξινομούνται βάσει του μήκους των νουκλεοτιδίων τους σε τρεις κατηγορίες: τα μικρά (short ncRNAs), τα μεσαία (mid-size ncRNAs) και τα μεγάλα (long ncRNAs) (Esteller, 2011). Στα μικρά ncRNAs διακρίνονται τα microRNAs (miRNAs) με 19-25 νουκλεοτίδια μήκος και τα piwi-interacting RNAs (piRNAs) με 26-31 νουκλεοτίδια μήκος (Oliveto et al., 2017).

Η ανακάλυψη του πρώτου microRNA (miRNA), του lin-4, έγινε το 1993 από τις ομάδες των Ambros και Ruvkun στο νηματώδη *Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993) και έφερε επανάσταση στον τομέα της μοριακής βιολογίας. Χρόνια πριν, το lin-4 χαρακτηρίστηκε από το εργαστήριο του Horvitz ως ένα από τα γονίδια που ρυθμίζουν τη χρονική ανάπτυξη των προνυμφών *C. elegans* (Horvitz & Sulston, 1980; Chalfie et al., 1981). Αργότερα το 1987, η ίδια ομάδα διαπίστωσε ότι μια μετάλλαξη στο lin-4 είχε αντίθετο φαινότυπο από μια μετάλλαξη σε ένα άλλο γονίδιο, το lin-14, ωστόσο μια μετάλλαξη καταστολέα του lin-14 σε μια γραμμή null-lin-4 ήταν άγριου τύπου (Ambros & Horvitz, 1987; Ferguson et al., 1987). Τόσο ο Ambros όσο και ο Ruvkun συνέχισαν να μελετούν τα lin-4 και lin-14 γονίδια, ώσπου ανακάλυψαν ότι το lin-4 δεν ήταν ένα RNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη, αλλά ένα μικρό μη κωδικό RNA (Lee et al., 2004; Almeida et al., 2011). Βρήκαν επίσης ότι το lin-14 είχε μειωθεί μετα-μεταγραφικά μέσω της 3' αμετάφραστης περιοχής του (3' UTR) και ότι το lin-4 είχε μια συμπληρωματική αλληλουχία με αυτή του 3' UTR του lin-14 (Lee et al., 1993). Ως εκ τούτου, προτάθηκε ότι το lin-4 ρυθμίζει το lin-14 σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο (Wightman et al., 1993). Έκτοτε, τα

miRNAs έχουν αναγνωσθεί σε όλα τα συστήματα ζωικών μοντέλων και ορισμένα έχουν αποδειχθεί ότι διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των ειδών (Pasquinelli et al., 2000; Davis-Dusenbery & Hata, 2010; Li et al., 2010; Friedlander et al., 2014). Νέα miRNAs εξακολουθούν να ανακαλύπτονται και ο ρόλος τους στη ρύθμιση των γονιδίων είναι αρκετά καλά αναγνωρισμένος (de Rie et al., 2017).

Τα miRNA φαίνεται πως είναι κρίσιμα για την κανονική ανάπτυξη των ζωικών οργανισμών και εμπλέκονται σε μια ποικιλία βιολογικών διεργασιών (Fu et al., 2013). Η ανώμαλη έκφραση τους έχει βρεθεί πως σχετίζεται με πολλές ανθρώπινες ασθένειες (Tufekci et al., 2014; Paul et al., 2018). Επιπλέον, τα miRNAs εκκρίνονται σε εξωκυτταρικά υγρά, τα εξωκυτταρικά αυτά miRNAs έχουν αναφερθεί ευρέως ως πιθανοί βιοδείκτες για μια ποικιλία ασθενειών και χρησιμεύουν επίσης ως μόρια σηματοδότησης για τη μεσολάβηση των επικοινωνιών κυττάρου-κυττάρου (Hayes et al., 2014; Wang et al., 2016; Huang, 2017). Αναλύσεις των ενδογενών miRNA του ανθρώπου, επαληθεύουν την έκφραση 8 miRNA σε 12 διαφορετικές ανθρώπινες κυτταρικές σειρές και υπολογίζουν την ύπαρξη 2300 ώριμων miRNA, 1115 από τα οποία είναι επί του παρόντος σχολιασμένα στη miRBase (Alles et al., 2019).

1.4.2 Βιογένεση miRNAs

Η βιογένεση ενός miRNA ξεκινά με την επεξεργασία των μεταγραφών από την RNA πολυμεράση II/III (RNA polymerase II/III transcripts) μετά ή συν-μεταγραφικά (Ha & Kim, 2014). Περίπου τα μισά από όλα τα επί του παρόντος αναγνωρισμένα miRNA είναι ενδογονιδιακά και επεξεργάζονται κυρίως από ιντρόνια και σχετικά λίγα εξόνια γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, ενώ τα υπόλοιπα είναι διαγονιδιακά, μεταγράφονται ανεξάρτητα από το γονίδιο (host gene) και ρυθμίζονται από τους δικούς τους προαγωγείς (promoters) (Kim & Kim, 2007; de Rie et al., 2017). Μερικές φορές τα miRNA μεταγράφονται ως ένα μακρύ αντίγραφο που καλείται συστάδες (clusters), οι οποίες μπορεί να έχουν παρόμοιες συντηρημένες περιοχές/αλληλουχίες (seed region/sequences), οπότε και στην περίπτωση αυτή θεωρούνται οικογένεια (Tanzer & Stadler, 2004). Η βιογένεση του miRNA ταξινομείται σε δύο οδούς, την κανονική (Canonical Pathway) και τη μη κανονική (Non-canonical Pathway) (Εικόνα 7).

Κανονική Οδός (Canonical Pathway) Βιογένεσης miRNA

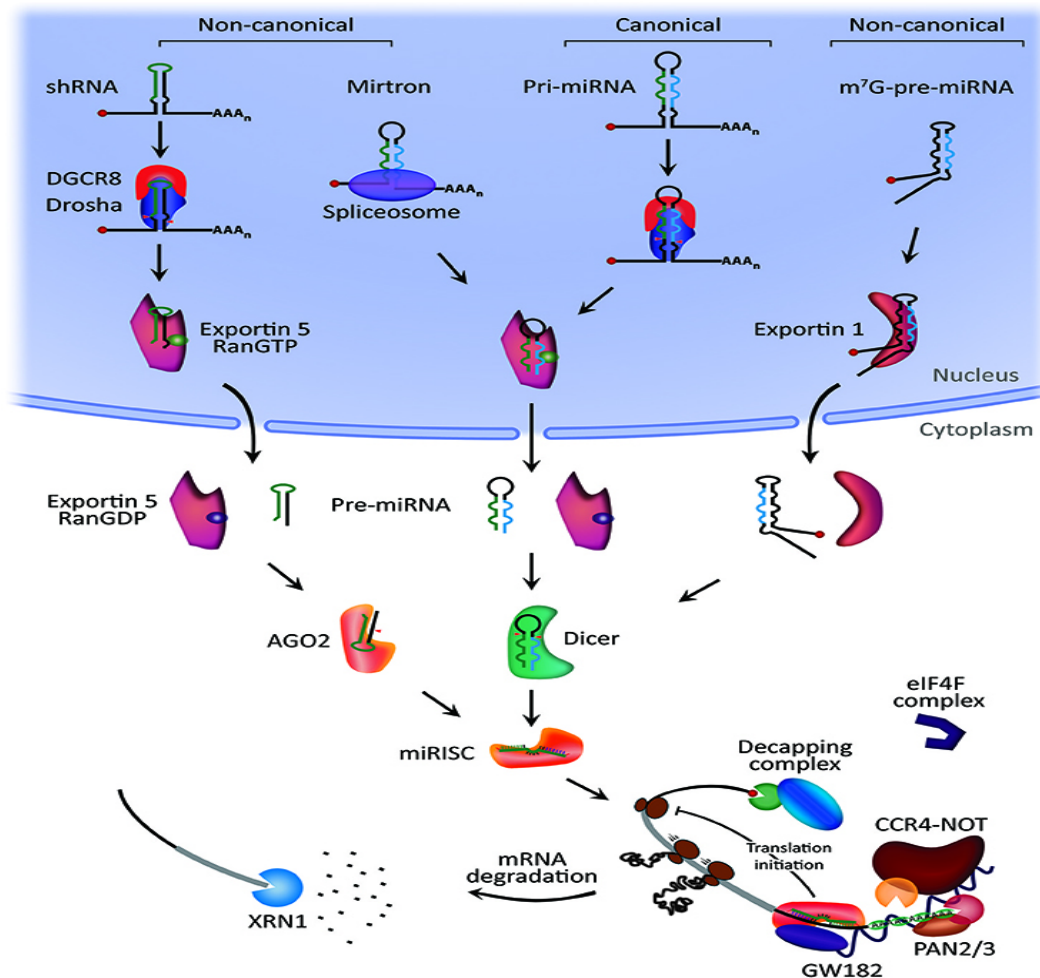
Η κανονική οδός βιογένεσης είναι η κυρίαρχη οδός με την οποία υποβάλλονται σε επεξεργασία τα miRNA. Σε αυτό το μονοπάτι, τα pri-miRNAs μεταγράφονται από τα γονιδιακά

τους και στη συνέχεια υποβάλλονται σε επεξεργασία προς pre-miRNA από το σύμπλοκο μικροεπεξεργαστών (microprocessor complex), που αποτελείται από μια πρωτεΐνη δέσμευσης RNA DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGCR8) και ένα ένζυμο ριβονουκλεάσης III, το Drosha (Denli et al., 2004). Η DGCR8 αναγνωρίζει ένα N6-μεθυλαδενολυωμένο GGAC και άλλα μοτίβα εντός του pri-miRNA (Alarcon et al., 2015), ενώ το ένζυμο Drosha διασπά το δίδυμο pri-miRNA στη βάση της χαρακτηριστικής δομής φουρκέτας του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας προεξοχής 2 nt 3' στο pre-miRNA (Han et al., 2004). Μόλις δημιουργηθούν τα pre-miRNA, εξάγονται στο κυτταρόπλασμα από ένα σύμπλεγμα εξπορτίνης 5 (XPO5)/RanGTP-πρωτεΐνης μεταφορέα (βρίσκεται του πυρηνικού πόρου) και στη συνέχεια υποβάλλονται σε επεξεργασία από την ενδονουκλεάση RNase III, Dicer (Denli et al., 2004; Okada et al., 2009). Αυτή η επεξεργασία περιλαμβάνει την αφαίρεση του τερματικού βρόχου, με αποτέλεσμα να προκύπτει ένα ώριμο διπλό miRNA. Γενικά, όμως προκύπτουν δύο παραγόμενα δίκλιωνα τμήματα μετά την επεξεργασία, που αποτελούνται από το ώριμο miRNA και το συμπληρωματικό του, miRNA*. Η συχνότητα εμφάνισης των miRNA* στις βιβλιοθήκες κλωνοποιημένων miRNAs είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με τα miRNA, πιθανώς λόγω του πολύ μικρού χρόνου ημιζωής αφού αποικοδομούνται (Zhang et al., 2004) (Εικόνα 8). Η κατεύθυνση του κλώνου miRNA καθορίζει το όνομα της ώριμης μορφής miRNA. Ο κλώνος 5p προκύπτει από το 5' άκρο της φουρκέτας pre-miRNA ενώ ο κλώνος 3p προέρχεται από το άκρο 3'. Και οι δύο κλώνοι που προέρχονται από το ώριμο διπλό miRNA μπορούν να προσκολληθούν στην οικογένεια πρωτεϊνών Argonaute (AGO) (AGO1-4 στους ανθρώπους) με τρόπο που εξαρτάται από το ATP (Yoda et al., 2010). Για κάθε δεδομένο miRNA, η αναλογία του κλώνου 5p ή 3p αγκυροβολημένου σε AGO πρωτεΐνες ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου ή το κυτταρικό περιβάλλον, που κυμαίνεται από σχεδόν ίσες αναλογίες έως κυρίως ένας ή ο άλλος κλώνος (Meijer et al., 2014). Η επιλογή του κλώνου 5p ή 3p βασίζεται εν μέρει στη θερμοδυναμική σταθερότητα στα 5' άκρα του διπλού miRNA ή ενός 5' U στη νουκλεοτιδική θέση 1 (Khvorovna et al., 2003). Γενικά, ο κλώνος με χαμηλότερη σταθερότητα 5' ή 5'U προσκολλάται κατά προτίμηση σε AGO πρωτεΐνη και θεωρείται ο οδηγός κλώνος (guide strand). Ο κλώνος χωρίς φορτίο ονομάζεται κλώνος επιβάτης (passenger strand), ο οποίος θα ξετυλιχθεί από τον οδηγό κλώνο μέσω διαφόρων μηχανισμών βάσει του βαθμού συμπληρωματικότητας. Οι passenger κλώνοι του miRNA που δεν περιέχουν αναντιστοιχίες διασπώνται από την AGO2 πρωτεΐνη και υποβαθμίζονται από κυτταρικούς μηχανισμούς. Διαφορετικά, τα διπλά μόρια miRNA με κεντρικές αναντιστοιχίες ή μη φορτωμένο miRNA με AGO2 ξετυλίγονται παθητικά και υποβαθμίζονται (Ha & Kim,

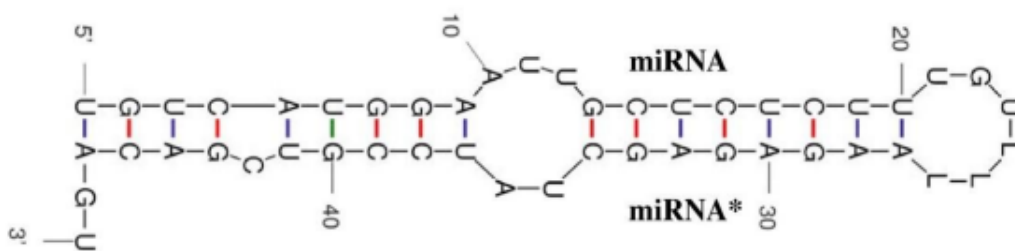
2014). Τα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωμάτια (RNPs) που περιέχουν τα δίκλινα miRNAs είναι αυτά που οδηγούν το ώριμο μόνο miRNA στο καταλυτικό σύμπλοκο RISC και κατ' επέκταση στο mRNA-στόχο για μετα-μεταγραφική αποσιώπηση (Khvorovna et al., 2003). Η συγκρότηση του συμπλόκου RISC είναι μία ATP-εξαρτώμενη διαδικασία, καθώς το ξεδίπλωμα του δίκλωνου miRNA και η αλλαγή στη διαμόρφωση ή στη σύσταση του ριβοπρωτεϊνικού συμπλόκου απαιτούν ενέργεια (Nykanen et al., 2001).

Μη Κανονική Οδός (Non-canonical Pathway) Βιογένεσης miRNA

Πολλαπλά είναι τα μη κανονικά μονοπάτια βιογένεσης miRNA, τα οποία έχουν διευκρινιστεί μέχρι και σήμερα. Αυτές οι οδοί χρησιμοποιούν διαφορετικούς συνδυασμούς των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην κανονική οδό, κυρίως των Drosha, Dicer, exportin 5 και AGO2. Γενικά, η μη κανονική βιογένεση του miRNA μπορεί να ομαδοποιηθεί σε μονοπάτια Drosha/DGCR8-ανεξάρτητο και σε Dicer-ανεξάρτητο. Τα pre-miRNA που παράγονται από την Drosha/DGCR8-ανεξάρτητη οδό μοιάζουν με υποστρώματα Dicer. Ένα παράδειγμα τέτοιων pre-miRNA είναι τα mirtron, τα οποία παράγονται από τα εσόνια του mRNA κατά τη διάρκεια του ματίσματος (Ruby et al., 2007; Babiarz et al., 2008). Ένα άλλο παράδειγμα είναι το 7-methylguanosine (m7G)-capped pre-miRNA. Αυτά τα εκκολλαπτόμενα RNA εξάγονται απευθείας στο κυτταρόπλασμα μέσω της εξορθίνης 1 (exportin 1), χωρίς την ανάγκη διάσπασης του ενζύμου Drosha. Υπάρχει μια προτίμηση του κλώνου 3p, πιθανότατα λόγω του καπακιού m7G (m7G-cap) που εμποδίζει τη φόρτωση κλώνου 5p στο Argonaute (Xie et al., 2013). Από την άλλη πλευρά, αυτά που προέρχονται από την Dicer-ανεξάρτητη οδό υπόκειται σε επεξεργασία από τη ριβονουκλεάση Drosha, από ενδογενή RNA κοντής φουρκέτας, τα shRNA (Yang et al., 2010). Αυτά τα pre-miRNA απαιτούν το AGO2 για να ολοκληρώσει την ωρίμανση τους μέσα στο κυτταρόπλασμα, επειδή δεν έχουν αρκετό μήκος για να είναι Dicer-υποστρώματα (Yang et al., 2010). Αυτό με τη σειρά του προάγει τη φόρτωση ολόκληρου του pre-miRNA στο AGO2 και τον εξαρτώμενο από AGO2 τεμαχισμό του κλώνου 3p. Το 3'-5' κόψιμο του κλώνου 5p ολοκληρώνει την ωρίμανση τους (Cheloufi et al., 2010).



Εικόνα 7. Κανονική και μη κανονική βιογένεση microRNA και μηχανισμός δράσης (<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2018.00402/full#B64>).



Εικόνα 8. Δευτεροταγής δομή του miRNA:miRNA* συμπλόκου (<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2018.00402/full#B64>).

1.4.3 Μηχανισμοί ρύθμισης γονιδίων με τη μεσολάβηση miRNA

Τα miRNA συνδέονται σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία στο 3' UTR των mRNA-στόχων τους με σκοπό να προκαλέσουν μεταφραστική καταστολή, αποαδενυλίωση και αποκάλυψη του mRNA (Huntzinger & Izaurralde, 2011; Ipsaro & Joshua-Tor, 2015). Σημεία δέσμευσης miRNA έχουν επίσης ανιχνευθεί και σε άλλες περιοχές mRNA συμπεριλαμβανομένου του 5' UTR και της κωδικής αλληλουχίας, καθώς και εντός των περιοχών του προαγωγέα (promoter) (Xu et al., 2014). Η δέσμευση των miRNAs στο 5' UTR και στις κωδικές περιοχές έχουν σιγαστικές επιδράσεις στη γονιδιακή έκφραση (Zhang et al., 2018), ενώ η αλληλεπίδραση miRNA με την περιοχή του προαγωγέα έχει αναφερθεί ότι επάγει τη μεταγραφή (Dharap et al., 2013).

Σίγαση γονιδίου με τη μεσολάβηση MicroRNA μέσω miRISC συμπλόκου

Το σύμπλεγμα σίγασης που προκαλείται από miRNA (miRISC) αποτελείται από τον οδηγό κλώνο και AGO πρωτεΐνη (Kawamata & Tomari, 2010). Η εξειδίκευση στόχου του miRISC οφείλεται στην αλληλεπίδρασή του με συμπληρωματικές αλληλουχίες στο mRNA στόχο, που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης miRNA (MREs). Ο βαθμός συμπληρωματικότητας του MRE καθορίζει εάν υπάρχει εξαρτώμενος από AGO2 τεμαχισμός του mRNA στόχου ή μεσολαβούμενη από miRISC αναστολή μετάφρασης και διάσπαση του mRNA στόχου (Jo et al., 2015). Μια πλήρως συμπληρωματική αλληλεπίδραση miRNA:MRE επάγει δραστηριότητα ενδονουκλεάσης AGO2 και στοχεύει τη διάσπαση του mRNA (Jo et al., 2015). Ωστόσο, αυτή η αλληλεπίδραση αποσταθεροποιεί τη συσχέτιση μεταξύ του AGO και του 3' άκρου του miRNA προάγοντας την αποδόμησή του (Krützfeldt et al., 2005; Ameres et al., 2010).

Στα ζωικά κύτταρα, η πλειονότητα των αλληλεπιδράσεων miRNA:MRE δεν είναι πλήρως συμπληρωματικές (Jonas & Izaurralde, 2015). Τα περισσότερα MRE περιέχουν τουλάχιστον κεντρικές αναντιστοιχίες με το miRNA που οδηγούν, αποτρέποντας τη δραστηριότητα της ενδονουκλεάσης AGO2. Κατά συνέπεια, το AGO2 δρα ως μεσολαβητής της παρεμβολής RNA, παρόμοια με τα μη ενδονουκλεολυτικά μέλη της οικογένειας AGO (AGO1, 3 και 4 στους ανθρώπους). Σε πολλές περιπτώσεις, μια λειτουργική αλληλεπίδραση miRNA:MRE λαμβάνει χώρα μέσω της περιοχής 5' seed (νουκλεοτίδια 2-8/ “seed sequence” ή “seed site”) (Xu et al., 2014; Ellwanger et al., 2011). Ωστόσο, η πρόσθετη αλληλεπίδραση στο άκρο 3' βοηθά στη σταθερότητα και την ειδικότητα της αλληλεπίδρασης miRNA-στόχου (Broughton et al., 2016). Γενικά, τα miRNAs μπορούν είτε να αναστείλουν τη μετάφραση,

είτε να επάγουν την διάσπαση του mRNA στόχου ή και τα δύο βάσει του βαθμού συμπληρωματικότητας με την περιοχή πρόσδεσης, του αριθμού των μοτίβων που αναγνωρίζει το 5' άκρο του και την προσβασιμότητα στις θέσεις πρόσδεσης (Broughton et al., 2016).

Ο σχηματισμός ενός συμπλέγματος σίγασης miRISC ξεκινά με τη στρατολόγηση της οικογένειας πρωτεϊνών GW182 από το miRISC. Οι GW182 παρέχουν τη σκαλωσιά που απαιτείται για τη στρατολόγηση άλλων τελεστικών πρωτεϊνών, όπως τα σύμπλοκα πολυ(A)-δεαδενυλάσης PAN2-PAN3 και CCR4-NOT, μετά την αλληλεπίδραση miRNA:mRNA στόχου (Jonas & Izaurralde, 2015; Christie et al., 2013). Η πολυ(A)-αποαδενυλίωση του mRNA στόχου ξεκινά με το PAN2/3 και ολοκληρώνεται από το σύμπλοκο CCR4-NOT. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των επαναλήψεων τρυπτοφάνης (W) του GW182 και της πρωτεΐνης C που δεσμεύει πολυ(A) (PABPC) προάγει την αποτελεσματική αποαδενυλίωση (Jonas & Izaurralde, 2015). Στη συνέχεια, η αποκάλυψη πραγματοποιείται με τη διευκόλυνση της αποκάλυψης της πρωτεΐνης 2 (DCP2) και των σχετικών πρωτεϊνών, ακολουθούμενη από αποικοδόμηση 5'-3' από την εξωριβονουκλεάση 1 (XRN1) (Braun et al., 2012).

Μεταγραφική και μετα-μεταγραφική γονιδιακή ρύθμιση

Μέσω της Importin-8 ή της Exportin-1, η ανθρώπινη AGO2 πρωτεΐνη μετακινείται μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος, μέσω της αλληλεπίδρασής του με την TNRC6A (μια πρωτεΐνη της οικογένειας GW182) που περιέχει ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού και εξαγωγής (Nishi et al., 2013). Το πυρηνικά εντοπισμένο miRISC βρέθηκε ότι ρυθμίζει, τόσο τους μεταγραφικούς ρυθμούς, όσο και τα μετα-μεταγραφικά επίπεδα του mRNA (Nishi et al., 2013; Pitchiaya et al., 2017) και συσχετίζεται με την ευχρωματίνη σε γονιδιακούς τόπους με ενεργή μεταγραφή (Cernilogar et al., 2011).

Το miRISC χαμηλού μοριακού βάρους μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα mRNA μέσα στον πυρήνα και να προκαλέσει την αποικοδόμηση του πυρηνικού mRNA, αν και ο μηχανισμός πίσω από αυτό είναι ασαφής (Bottini et al., 2017). Ο εμπλουτισμός του miRNA σε ενεργά μεταγραφόμενα γονίδια μπορεί να υποδηλώνει ότι το miRISC αλληλεπιδρά με το mRNA στόχο συν-/μετα-μεταγραφικά. Η συμμετοχή της AGO και της Droscha στο μάτισμα του mRNA υποστηρίζει περαιτέρω τις συν-μεταγραφικές αλληλεπιδράσεις miRISC:mRNA (Havens et al., 2014). Το miRISC μπορεί επίσης να ρυθμίζει απευθείας τη μεταγραφή (Benhamed et al., 2012). Ο συνολικός ρόλος του miRISC στη ρύθμιση της κατάστασης και της δομής της χρωματίνης και του μεταγραφικού ελέγχου είναι υπό μελέτες, αλλά τα

τρέχοντα δεδομένα υποδηλώνουν έναν ρόλο που μοιάζει με μεταγραφικό παράγοντα (Bottini et al., 2017).

1.4.4 miRNAs και υπογονιμότητα

Τα miRNAs μπορούν να επηρεάσουν την αναπαραγωγική ικανότητα τόσο των γυναικών, όσο και των ανδρών. Αναφορικά με τις γυναίκες τα miRNAs φέρουν ρόλο στη ρύθμιση του ενδομητρίου της μήτρας στον εμμηνορροϊκό κύκλο (Salas-Huetos et al., 2019). Επιπλέον, στο ωοθυλάκιο υπάρχουν ενδείξεις για το σημαντικό ρόλο των miRNAs στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κοκκιωδών κυττάρων, την ωρίμανση και την απόπτωση των ωαρίων (Guo et al., 2017). Η ποσότητα της έκφρασης miRNA είναι διαφορετική μεταξύ γόνιμων και υπογόνιμων γυναικών (Belguith et al., 2020) και υφίσταται δυσρύθμισή τους σε διάφορα είδη γυναικείων ασθενειών όπως PCO, πρωτοπαθή ωοθηκική ανεπάρκεια (POI) και ενδομητρίωση, οι οποίες είναι άμεσα συνδεδεμένες με την υπογονιμότητα (Naji et al., 2018; Loke et al., 2019; Kamalidehghan et al., 2020).

1.5 Οικογένεια γονιδίων miR-27

Η οικογένεια γονιδίων miR-27 είναι ευρέως κατανοημένη στα σπονδυλωτά και περιέχει κυρίως δύο ομόλογα, τα miR-27a και miR-27b. Λίγα μέλη της οικογένειας γονιδίων miR-27 εμφανίζουν πολλαπλές βάσεις παραγωγής, αν και οι πολλαπλοί πρόδρομοι είναι κοινοί σε άλλα miRNAs, όπως είναι το let-7a. Το miR-27-3p είναι το κυρίαρχο προϊόν στην οικογένεια αυτών των γονιδίων και εκφράζεται σε μεγαλύτερη συχνότητα, παρότι τα miR-27a-3p και miR-27b-3p διαφέρουν μόνο λόγω απόκλισης στα 3' άκρα τους και έχουν τις ίδιες λειτουργικές περιοχές. Τα χαρακτηριστικά της αλληλουχίας του miR-27 σε ομόλογα μέλη miRNA και διαφορετικά ζωικά είδη είναι πολύ παρόμοια με αυτά των πολλαπλών isomiR (αλληλουχίες miRNA που έχουν παραλλαγές σε σχέση με την αλληλουχία αναφοράς) σε μια μεμονωμένη θέση miRNA και η μη τυχαία φύση αυτών των χαρακτηριστικών έχει λειτουργικές και εξελικτικές συνέπειες. Συγκεκριμένα, η απόκλιση των άκρων 3' σε πολλαπλά isomiR υποδηλώνει ότι δημιουργήθηκαν κυρίως μέσω μετατόπισης διάσπασης, ανακριβούς διάσπασης, αποικοδόμησης των pre-miRNAs ή τροποποίησης των άκρων 3' μετά τη δημιουργία miRNAs, όπως στα συμβάντα προσθήκης 3' τελικού άκρου του miRNA κατά τις διαδικασίες ωρίμανσης. Η απόκλιση των μηχανισμών παραγωγής των miR-27a και miR-27b συμβάλλει επίσης στην απόκλιση αλληλουχίας στα 3' άκρα, αλλά όχι στην

απόκλιση μεταξύ πολλαπλών isomiR. Οι διατηρημένες αλληλουχίες “seed” διασφαλίζουν ότι αυτές οι αλληλουχίες έχουν τα ίδια ή παρόμοια mRNA-στόχους, βελτιώνοντας έτσι περαιτέρω την αποτελεσματικότητα της ρύθμισης, η οποία είναι κρίσιμη δεδομένου ότι κάθε miRNA μπορεί να έχει χιλιάδες mRNA-στόχους. Η σχετική διατήρηση των μελών miRNA στην οικογένεια των γονιδίων συνεπάγεται και τη σχετικά σταθερή έκφραση και λειτουργία, καθώς και την κυριαρχία του miR-27-3p στο ρυθμιστικό δίκτυο του κωδικοποιητικού-μη κωδικοποιητικού RNA.

Τα γονίδια της οικογένειας miR-27 έχει βρεθεί πως εμπλέκονται στη ρύθμιση της λιπογένεσης (Kang et al., 2013), της μόλυνσης από κυτταρομεγαλοϊό ποντικού (Buck et al., 2010), σχετίζονται με τη χημειοανθεκτικότητα στον καρκίνο του οισοφάγου, με τον καρκίνο του στήθους και μπορεί να ρυθμίζουν τα γονίδια που σχετίζονται με τα πολυδύναμα κύτταρα του ανθρώπινου εμβρυϊκού καρκινώματος (Fuchs et al., 2014). Επιπλέον, φέρεται να έχει ρόλο και στην ωρίμανση του σπέρματος, την υπογονιμότητα κ.α. (Drevet et al., 2015).

1.5.1 Πολυμορφισμός

Το ανθρώπινο πυρηνικό DNA δεν αποτελεί μία ομοιογενή αλληλουχία δεοξυριβονουκλεοτιδίων, αλλά ένα ασυνεχές, ανομοιογενές μόριο. Έχει υπολογιστεί ότι το μέσο μήκος ενός γονιδίου είναι 10.000 ζεύγη βάσεων (bp) και ότι ο συνολικός αριθμός των γονιδίων που εκφράζονται σε όλα τα διαφορετικά κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού είναι περίπου 50.000-100.000 γονίδια. Το ανθρώπινο DNA έχει μήκος $3 \cdot 10^9$ bp, άρα περίπου το 1/5 του γονιδιώματος αποτελείται από αλληλουχίες που κωδικοποιούν γονίδια ή σχετίζονται με γονίδια. Το ακριβές μέγεθος του γονιδιώματος, η ετερογένεια και η πολυπλοκότητα του μελετώνται με πειράματα αναδιάταξης. Η αρχή της μεθόδου έγκειται στην ιδιότητα του αποδιαταγμένου DNA να αναδιατάσσεται με τυχαία σύνδεση των αλυσίδων του, όπου αυτές είναι συμπληρωματικές, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας και συγκέντρωσης αλάτων (Benjamin, 2004).

Η ύπαρξη γενετικής ποικιλομορφίας σε έναν πληθυσμό λέγεται πολυμορφισμός. Σε μη κωδικές θέσεις του γονιδιώματος, συχνά η αλληλουχία των βάσεων διαφέρει μεταξύ ατόμων. Όταν μια τέτοια διαφορά απαντά σταθερά σε ποσοστό μεγαλύτερο από 1% σε έναν πληθυσμό, τότε ορίζεται ως πολυμορφισμός θέσης (Single nucleotide polymorphisms-SNPs). Τόσο στο μοναδικό, όσο και στο επαναλαμβανόμενο μη κωδικό DNA, καθώς και στα εσόνια, υπάρχει πληθώρα τέτοιων πολυμορφισμών θέσης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τυχαίες αλλαγές στην αλληλουχία των βάσεων συμβαίνουν και συντηρούνται στο ανθρώπινο

γονιδίωμα, όταν η θέση στην οποία συμβαίνει η αλλαγή δεν συνδέεται με κάποια γονιδιακή λειτουργία, που πιθανόν θα μεταβληθεί, οπότε δεν υπάρχει καμία επιλεκτική πίεση (Benjamin, 2004).

Πολυμορφισμοί θέσης στο γενωμικό DNA υπάρχουν περίπου κάθε 200-500bp. Οι πολυμορφισμοί αυτοί μπορεί να επηρεάσουν την θέση τομής του μορίου από κάποια περιοριστική ενδονουκλεάση, δημιουργώντας ή καταργώντας την αλληλουχία αναγνώρισης. Τα τμήματα που προκύπτουν μετά από επώαση του ολικού γενωμικού DNA κάθε ατόμου με την περιοριστική ενδονουκλεάση ονομάζονται πολυμορφισμοί μήκους τμημάτων περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphisms-RFLPs) (Benjamin, 2004).

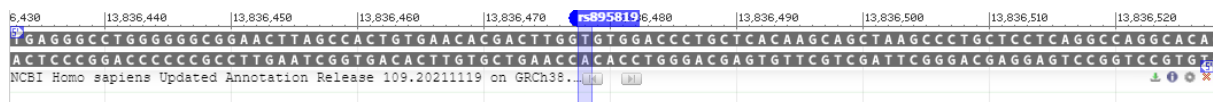
1.5.2 Πολυμορφισμός rs895819 του γονιδίου miR27a

Το miR-27a γονίδιο εδράζεται στο χρωμόσωμα 19, έχει έκταση 83 βάσεις [chr19:13,836,439-13,836,521(GRCh38/hg38)] και αποτελεί ένα από τα γονίδια που έχουν αυξημένη έκφραση κατά την εγκυμοσύνη (Sun et al., 2010). Ο πολυμορφισμός rs895819 του miR-27a γονιδίου (miR-27a A>G ή T>C), ο οποίος βρίσκεται στον τερματικό βρόχο του pre-miR-27a, φαίνεται πως μπορεί να επηρεάσει την ωρίμανση του miR-27a (Liu et al., 2009) (Εικόνα 9, Εικόνα 10). Συγκεκριμένα, πρόκειται για έναν ασυνήθιστο miRNA-πολυμορφισμό (miRNA-SNP), λόγω της θέσης του στην κωδικοποιητική περιοχή της φουρκέτας pre-miR-27a στον τερματικό βρόχο, μια θέση η οποία θα μπορούσε να κοπεί από το ένζυμο Dicer στη διαδικασία ωρίμανσης του pre-miRNA. Μελέτες υποθέτουν πως η αλλαγή A → G του rs895819 πολυμορφισμού θα μπορούσε να συντομεύσει τη δομή του βρόχου και να επηρεάσει την επεξεργασία του miR-27a, με αποτέλεσμα να αποτελεί ο rs895819 έναν λειτουργικό πολυμορφισμό (Yang et al., 2009).

Ο rs895819 πολυμορφισμός έχει συνδεθεί με κινδύνους ιδιοπαθούς υποτροπιάζουσας απώλειας εγκυμοσύνης (idiopathic recurrent pregnancy loss-RPL) (Rah et al., 2017), την ευαισθησία στον καρκίνο του στομάχου (Sun et al., 2010), το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα (Liu et al., 2009), τον καρκίνο του μαστού (Yang et al., 2009; Mashayekhi et al., 2018), με τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (Ghaedi et al., 2016) και τον κίνδυνο για καρκίνο (Daia et al., 2020).



Εικόνα 9. Θέση εντοπισμού του rs895819 πολυμορφισμού του miR-27a γονιδίου στο χρωμόσωμα 19, chr19:13836478 (GRCh38.p13) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/?assm=GCF_000001405.39).



Εικόνα 10. Θέση εντοπισμού του rs895819 πολυμορφισμού του miR-27a γονιδίου στο χρωμόσωμα 19, chr19:13836478 (GRCh38.p13) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/?assm=GCF_000001405.39).

1.6 Σκοπός της μελέτης

Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας εστιάζεται, τα τελευταία χρόνια, στα miRNA και τους διαφορετικούς πολυμορφισμούς που αυτά φέρουν, καθώς μπορούν να αποτελέσουν εν δυνάμει δείκτες μίας ή και περισσότερων νόσων και παθήσεων. Συνεπώς, η μελέτη και περαιτέρω διερεύνηση και συσχέτιση των ήδη υπαρχόντων και νέων πολυμορφισμών με νόσους και παθήσεις καθίσταται σημαντική και απαραίτητη.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση της πιθανής σχέσης του πολυμορφισμού rs895819 A>G του γονιδίου mir27a με τη γυναικεία υπογονιμότητα στον ελληνικό πληθυσμό, για την οποία έχει εφαρμοστεί κάποιο από τα πρωτόκολλα εξωσωματικής γονιμοποίησης, στην προσπάθεια αντιμετώπισής της.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Δείγμα

Πληθυσμό δείγμα της συγκεκριμένης μελέτης αποτέλεσαν 180 γυναίκες του ελληνικού πληθυσμού, εκ των οποίων οι 107 συγκροτούν την ομάδα ελέγχου, δηλαδή γυναίκες οι οποίες είχαν τουλάχιστον μία επιτυχημένη κύηση και οι υπόλοιπες 73 (ομάδα IVF) είναι γυναίκες, οι οποίες δεν είχαν καμία πετυχημένη κύηση και επέλεξαν τη λύση της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Τα δείγματα όλα είναι DNA απομονωμένο από περιφερικό αίμα και προέρχονται από ασθενείς του καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας, κ. Δημήτρη Χ. Λουτράδη. Στον Πίνακα 1 παρατίθενται τα κωδικά ονόματα των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν. Για καθένα από τα δείγματα IVF αντλήθηκαν δεδομένα από τους φακέλους των γυναικών, τα οποία αφορούσαν:

1. την ηλικία,
2. τη χρονική διάρκεια της υπογονιμότητας,
3. το βάρος,
4. το ύψος,
5. τον δείκτη μάζας σώματος (BMI),
6. την τιμή της θυλακιοτρόπου (FSH) ορμόνης,
7. την τιμή της ωχρινοτρόπου (LH) ορμόνης,
8. την τιμή της προλακτίνης (PRL),
9. την τιμή της αντιμυλλέριου (AMH) ορμόνης
10. τον αριθμό των ώριμων ωοκυττάρων (cumulus oocyte complex-COC),
11. τον αριθμό των ώριμων ωοκυττάρων καλής ποιότητας,
12. τον αριθμό των ωαρίων που γονιμοποιήθηκαν,
13. την τελική εγκυμοσύνη ή μη (Παράρτημα 1).

Σε κάθε περίπτωση είναι σημαντικό και απαραίτητο να υπογραμμιστεί πως τηρήθηκαν όλα όσα θεσπίζονται από το Άρθρο 13 του Νόμου 3418/2005 περί ιατρικού απορρήτου, ώστε να διασφαλιστεί η μη καταπάτηση των ανθρωπίνων δικαιωμάτων.

Πίνακας 1. Κωδικά ονόματα για τα 107 δείγματα της ομάδας ελέγχου και τα 75 δείγματα της ομάδας IVF.

αρίθμηση	Ομάδα Ελέγχου	Ομάδα IVF
1	1	Π1
2	2	Π4
3	3	Π5
4	4	Π6
5	5	Π7
6	6	Π8
7	7	Π9
8	8	Π10
9	9	Π11
10	10	Π12
11	11	Π13
12	12	Π14
13	13	Π15
14	14	Π22
15	15	Π24
16	16	Π25
17	17	Π26
18	18	Π27
19	19	Π29
20	192	Π30
21	193	Π31
22	194	Π32
23	195	Π33
24	196	Π34
25	197	Π35
26	198	Π36
27	199	Π37
28	201	Π38
29	202	Π39
30	203	Π40
31	204	Π41
32	205	Π42
33	206	Π43
34	207	Π44
35	208	Π45
36	209	Π47
37	211	Π49

38	215	П50
39	216	П54
40	217	П55
41	218	П56
42	219	П57
43	220	П58
44	221	П60
45	222	П61
46	224	П62
47	225	П63
48	226	П64
49	228	П65
50	229	П66
51	230	П67
52	231	П68
53	232	П69
54	233	П71
55	234	П72
56	235	П73
57	236	П74
58	237	П76
59	238	П78
60	239	П79
61	240	П81
62	241	П84
63	242	П89
64	243	П99
65	244	П100
66	245	П102
67	246	П103
68	247	П104
69	258	П105
70	259	П106
71	260	П107
72	273	П108
73	278	П109
74	279	
75	283	
76	287	
77	292	
78	293	
79	294	

80	297	
81	299	
82	300	
83	317	
84	318	
85	319	
86	320	
87	321	
88	322	
89	323	
90	324	
91	325	
92	326	
93	327	
94	328	
95	329	
96	330	
97	331	
98	332	
99	333	
100	334	
101	K57	
102	K58	
103	K60	
104	N3	
105	N4	
106	N5	
107	N7	

2.2 Χημικά και Ρυθμιστικά Διαλύματα

1. Ρυθμιστικό διάλυμα (Tris Acetic Acid EDTA - TAE) (50x) ως μέσο για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR.

Περιέχει: 242 g Tris - acetate, 1000 ml διαλύματος EDTA 0,5 M.

Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου και αραιώνεται 50 φορές, ώστε να παρασκευαστεί το διάλυμα εργασίας TAE (1x). Η αραιώση γίνεται λίγο πριν τη χρήση του (<http://cshprotocols.cshlp.org/>).

2. Διάλυμα Βρωμιούχου Αιθιδίου (EtBr) για χρώση του DNA κατά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης.
Περιέχει: 10 mg/ml βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma) σε αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό. Λόγω της τοξικότητας του διαλύματος το φιαλίδιο στο οποίο παρασκευάζεται καλύπτεται με αλουμινόχαρτο και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Χρωστική Gel Loading Dye, Purple (6X) (New England BioLabs) για ανάμειξη με τα προϊόντα της PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης), τα οποία προορίζονται να φορτωθούν στο πήκτωμα αγαρόζης για ηλεκτροφόρηση. Με αυτό τον τρόπο καθίσταται δυνατή η παρακολούθηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -4°C.
4. MgCl₂ (New England BioLabs) χρησιμοποιήθηκε ως βασικός συμπάραγοντας για την ενίσχυση της δραστηριότητας της Taq DNA πολυμεράσης, η οποία με τη σειρά της αυξάνει τον ρυθμό ενίσχυσης του DNA.

2.3 Απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από ολικό αίμα

Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από το περιφερικό αίμα των γυναικών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Monarch Genomic DNA Purification Kit από την εταιρεία New England Biolabs (<https://international.neb.com/>). Το συγκεκριμένο kit απομόνωσης χρησιμοποιείται για την λύση κυττάρων, την αφαίρεση του RNA και τον καθαρισμό ανέπαφου γονιδιωματικού DNA (gDNA) από ένα μεγάλο εύρος βιολογικών δειγμάτων, όπως κύτταρα καλλιέργειας, αίμα, ιστοί θηλαστικών, βακτήρια και μύκητες.

Το περιφερικό αίμα συλλέχθηκε μετά από απλή αιμοληψία περιφερικού αίματος περίπου 3 κυβικά εκατοστά (cc) και τοποθετήθηκε με το πέρας της αιμοληψίας σε φιαλίδια γενικής αίματος που περιείχαν αντιπηκτικό, (ηπαρίνη ή EDTA), για να αποφευχθεί η πήξη του.

Μετά το πέρας της απομόνωσης, βάσει του πρωτοκόλλου του Monarch Genomic DNA Purification Kit, τα δείγματα αποθηκεύονταν στους -20°C.

2.4 Ενίσχυση της αλληλουχίας mir27a

Η ενίσχυση της αλληλουχίας mir27a έγινε με σκοπό την επιβεβαίωση της ύπαρξης του RNA γονιδίου και την ενίσχυση της αλληλουχίας του, τόσο στα δείγματα ελέγχου, όσο

και στα δείγματα IVF, ώστε μετέπειτα στο ενισχυμένο αυτό τμήμα να καταστεί δυνατή η ανίχνευση ή μη του πολυμορφισμού rs895819. Για τον σκοπό αυτό εφαρμόστηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η μέθοδος PCR έγινε με τη χρήση του ενζύμου Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer (M0273S, New England Biolabs Inc.). Το τμήμα του γονιδίου που ενισχύθηκε ήταν μεγέθους 182bp, μεταξύ των βάσεων 13835450 και 13836631 του χρωμοσώματος 19. Τα μόρια εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα 27aF και 27aR και τα δεδομένα για το μήκος των αλληλουχιών, τη θερμοκρασία Tm, την περιεκτικότητα σε βάσεις GC και την συμπληρωματικότητά αντλήθηκαν μέσω του προγράμματος OligoAnalyzer της εταιρίας IDT (<https://eu.idtdna.com/>) (Πίνακας 2) (Rah et al., 2017). Ο εκκινητής 27aF έχει μέγεθος 27bp και ενισχύει το τμήμα μεταξύ των βάσεων 13836450 - 13836476 και ο εκκινητής 27aR έχει μέγεθος 25bp και ενισχύει το τμήμα μεταξύ των βάσεων 13836607 - 13836631 (Rah et al., 2017).

Πίνακας 2. Μόρια ενισχυτές (primers) 27aF και 27aR που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της αλληλουχίας του γονιδίου mir27a.

primer	sequence 5'-3'	Length (bp)	Tm °C	GC%	Self compl.	Self 3' compl.
27aF	GAACTTAGCCACTGTGAAC <u>C</u> ACCACTTG	27	59.7	48.15	5.00	2.00
27aR	TTGCTTCCTGTCACAAATCACATTG	25	56.3	40.00	5.00	3.00

Η βάση C που είναι υπογραμμισμένη στον 27aF εκκινητή αποτελεί βάση αναντιστοιχίας (mismatch sequence), καθώς έχει γίνει αλλαγή της βάσει G.

Η σύσταση του μίγματος της αντίδρασης PCR, για 25μl αντίδραση, περιλάμβανε τα συστατικά στις ποσότητες που φαίνονται στον Πίνακα 3 και το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε για την PCR φαίνεται αναλυτικά στον Πίνακα 4.

Πίνακας 3. Σύσταση του μίγματος για την αντίδραση PCR για την ενίσχυση της αλληλουχίας του mir27a γονιδίου. Τα αντιδραστήρια όλα είναι της εταιρίας New England BioLabs.

Συστατικά PCR	Ποσότητα ανά 25μl αντίδρασης	Τελική συγκέντρωση συστατικών
10x Standard Taq (Mg-free) Reaction Buffer	2,5μl	1x
25mM MgCl ₂	1,5μl	15mM
10mM dNTPs	1μl	400μM
10mM 27aF	5μl	2mM
10mM 27aR	5μl	2mM
template DNA	50-100ng	<1000ng/μl
Taq DNA polymerase	0,5μl	2,5 units/25μl
Nuclease-Free water	έως τα 25μl	-

Πίνακας 4. Πρόγραμμα που εφαρμόστηκε για την PCR.

Στάδιο αντίδρασης		Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη (Initial Denaturation)		95°C	2min
Αποδιάταξη (Denaturation)	35 κύκλοι	95°C	30sec
Πρόσδεση εκκινητών στο DNA (Primer Annealing)		60°C	45sec
Επιμήκυνση αλυσίδων (Elongation)		72°C	45sec
Τελική επιμήκυνση (Final elongation)		72°C	5min

2.5 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR ενίσχυσης της αλληλουχίας του mir27a γονιδίου έγινε με την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 3% (w/v). Συγκεκριμένα, συνολικά 150ml πηκτώματος αγαρόζης περιείχαν 4,5g αγαρόζης, 150ml ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x και 3,5μl διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR, αναμείχθηκαν πριν φορτωθούν στο πήκτωμα αγαρόζης με 2μl χρωστικής Gel Loading Dye, Purple (6X) (New England BioLabs) και από αυτά 10μl ηλεκτροφορήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1x). Σε κάθε ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας μοριακού βάρους, μεγέθους 1kb (Gene Ruler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific). Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 120V για περίπου 45 λεπτά. Η επιθυμητή ζώνη μεγέθους 182bp παρατηρήθηκε με υπεριώδη ακτινοβολία. Για τα δείγματα, στα οποία δεν παρατηρήθηκε η επιθυμητή ζώνη, έγινε επανάληψη της PCR ενίσχυσης της αλληλουχίας του mir27a γονιδίου.

2.6 Ανίχνευση πολυμορφισμού rs895819 (miR-27a A>G)

Η ανίχνευση του πολυμορφισμού rs895819 στην αλληλουχία miR-27a γονιδίου, που είναι υπεύθυνος για την αλλαγή της βάσης A στη θέση chr19:13836478 (GRCh38.p13) σε G (ή T>C), έγινε μετά από επώαση των ενισχυμένων με PCR αλληλουχιών με το περιοριστικό ένζυμο DraIII-HF[®] (New England BioLabs). Η επώαση γινόταν στο μηχανήμα της PCR ή σε υδατόλουτρο στους 37°C για 16 ώρες και το μίγμα της αντίδρασης περιείχε το ένζυμο DraIII-HF[®], την ενισχυμένη αλληλουχία, το buffer του ενζύμου και H₂O στις ποσότητες που αναγράφονται στον Πίνακα 5.

Το περιοριστικό ένζυμο DraIII-HF[®] κόβει την αλληλουχία 5'...CACNNN↓GTG...3'
3'...GTG↑NNNCAC...5'

Πίνακας 5. Σύσταση του μίγματος για την επώαση με το περιοριστικό ένζυμο DraIII-HF[®] τελικού όγκου 50μl.

Συστατικά	Ποσότητα ανά 50μl αντίδρασης	Τελική συγκέντρωση
DraIII-HF [®]	1μl	20units/50μl
rCutSmart [™] Buffer (10x)	5μl	1x
DNA	15μl	<1000ng/μl
Nuclease-Free water	έως τα 50μl	-

2.7 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων επώασης με το περιοριστικό ένζυμο DraIII-HF[®] σε πήκτωμα αγαρόζης.

Δεδομένου του σημείου κοπής του περιοριστικού ενζύμου, το οποίο αναγράφεται στην παράγραφο 2,6, οι γονότυποι αξιολογήθηκαν ως εξής:

- ένα μεμονωμένο θραύσμα 182bp για τον γονότυπο CC (GG), που αντιπροσωπεύει την ομοζυγωτία στον πολυμορφισμό,
- δύο θραύσματα 155bp και 27bp για τον γονότυπο TT (AA), που αντιπροσωπεύει την ομοζυγωτία φυσιολογικών πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων και
- τρία θραύσματα των 182bp, 155bp και 27bp για τον γονότυπο TC (AG), που αντιστοιχεί σε ετεροζυγωτία, δηλαδή μια πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα με τον πολυμορφισμό και μία άνευ.

Η παρατήρηση των προαναφερθέντων ζωνών έγινε έπειτα από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της επώασης με το περιοριστικό ένζυμο DraIII-HF[®] σε πήκτωμα αγαρόζης 3% (w/v). Συγκεκριμένα, συνολικά 150ml πήκτωματος αγαρόζης περιείχαν 4,5g αγαρόζης, 150ml ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x και 3,5μl διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR, αναμείχθηκαν πριν φορτωθούν στο πήκτωμα αγαρόζης με 2μl χρωστικής Gel Loading Dye, Purple (6X) (New England BioLabs) και από αυτά 25μl ηλεκτροφορήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1x). Σε κάθε ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας μοριακού βάρους, μεγέθους 1kb (Gene Ruler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific). Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 120V για περίπου 45 λεπτά.

Με το πέρασμα των ηλεκτροφορήσεων και την καταγραφή των ζωνών για όλα τα δείγματα, έγινε τυχαία επιλογή 10 δειγμάτων, για επανάληψη της PCR ενίσχυσης της αλληλουχία του mir27a γονιδίου και ακολούθως, της επώασης με το περιοριστικό ένζυμο DraIII-HF[®], ώστε να επιβεβαιωθεί η ορθότητα των αποτελεσμάτων.

2.8 Στατιστική Ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα IBM SPSS 20.0 Statistics Data Editor (www.ibm.com), το οποίο αποτελεί ένα ολοκληρωμένο στατιστικό πακέτο. Τα αποτελέσματα σχετικά με την ύπαρξη των πολυμορφισμών και τα

δεδομένα από το ιστορικό των ασθενών καταγράφηκαν στο πρόγραμμα και διενεργήθηκαν δοκιμασίες με τη μέθοδο χ^2 (Chi-square test) για τη σύγκριση ποιοτικών μεταβλητών και t-test ή one way ANOVA για τη σύγκριση ποιοτικών και ποσοτικών μεταβλητών, ανάλογα με τις μεταβλητές που συγκρίνονται κάθε φορά.

Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε στο $p < 0,05$. υγκεκριμένα, η τιμή p-value είναι η πιθανότητα να παρατηρηθεί ένα αποτέλεσμα τόσο ή περισσότερο ακραίο όσο το αποτέλεσμα ενός συγκεκριμένου δείγματος, δεδομένου ότι ισχύει η μηδενική υπόθεση. Το επίπεδο σημαντικότητας είναι το όριο που χρησιμοποιείται ώστε όλες οι p-values που είναι μικρότερες αυτού να οδηγούν σε απόρριψη της μηδενικής υπόθεσης. Όταν η τιμή p-value είναι μικρότερη από το 0,05 (5%) το αποτέλεσμα είναι στατιστικά σημαντικό. Όταν η τιμή p-value είναι μεγαλύτερη από το 0,05 (5%) το αποτέλεσμα δεν είναι στατιστικά σημαντικό.

3. Αποτελέσματα

3.1 Χαρακτηριστικά δείγματος

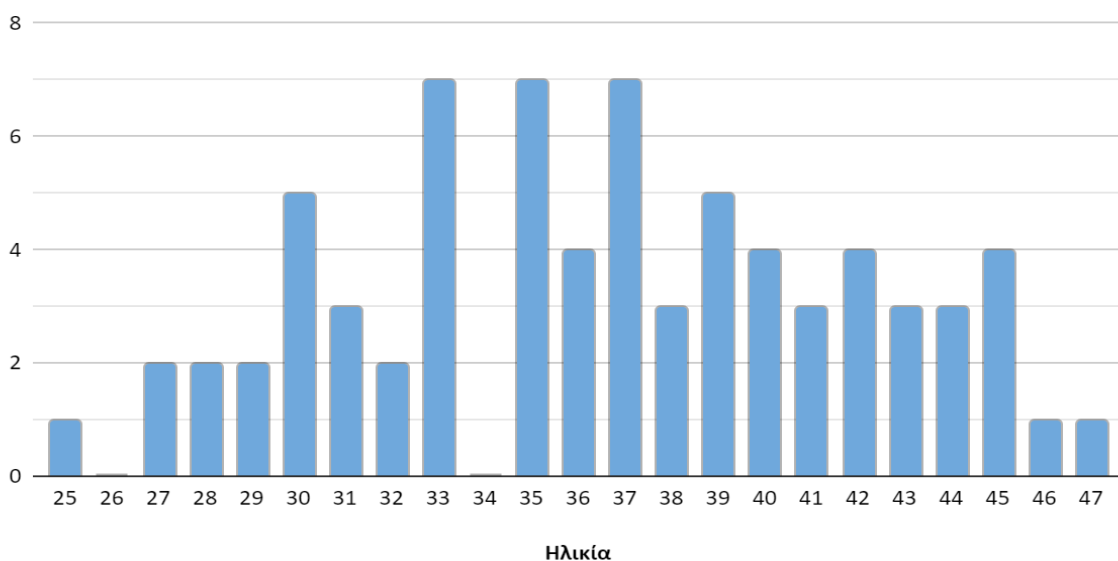
Τα χαρακτηριστικά του δείγματος αναφέρονται στα δεδομένα που αντλήθηκαν από τους ιατρικούς φακέλους των γυναικών που αποτέλεσαν την ομάδα IVF και αφορούν την ηλικία, τη χρονική διάρκεια της υπογονιμότητας, το βάρος, το ύψος, τον δείκτη μάζας σώματος (BMI), την τιμή της FSH ορμόνης, την τιμή της LH ορμόνης, την τιμή της PRL ορμόνης, την τιμή της AMH ορμόνης, τον αριθμό των ώριμων ωοκυττάρων (cumulus oocyte complex-COC), τον αριθμό των ώριμων ωοκυττάρων καλής ποιότητας, τον αριθμό των ωαρίων που γονιμοποιήθηκαν και την τελική εγκυμοσύνη ή μη.

Δεδομένα για την ομάδα ελέγχου δεν συλλέχθηκαν από τους ιατρικούς φακέλους πέρα της πληροφορίας περί μίας τουλάχιστον επιτυχημένης κύησης.

3.1.1 Ηλικία

Η ηλικία των γυναικών ακολουθεί σχεδόν κανονική κατανομή. Ο μέσος όρος ηλικίας των γυναικών της ομάδας IVF ήταν τα 36,6 έτη και ο αριθμητικός μέσος τα 37 έτη. Το ηλικιακό εύρος είναι 22 χρόνια, με ελάχιστη ηλικία τα 25 έτη και μέγιστη τα 47 (Γράφημα 1).

Κατανομή ηλικιών

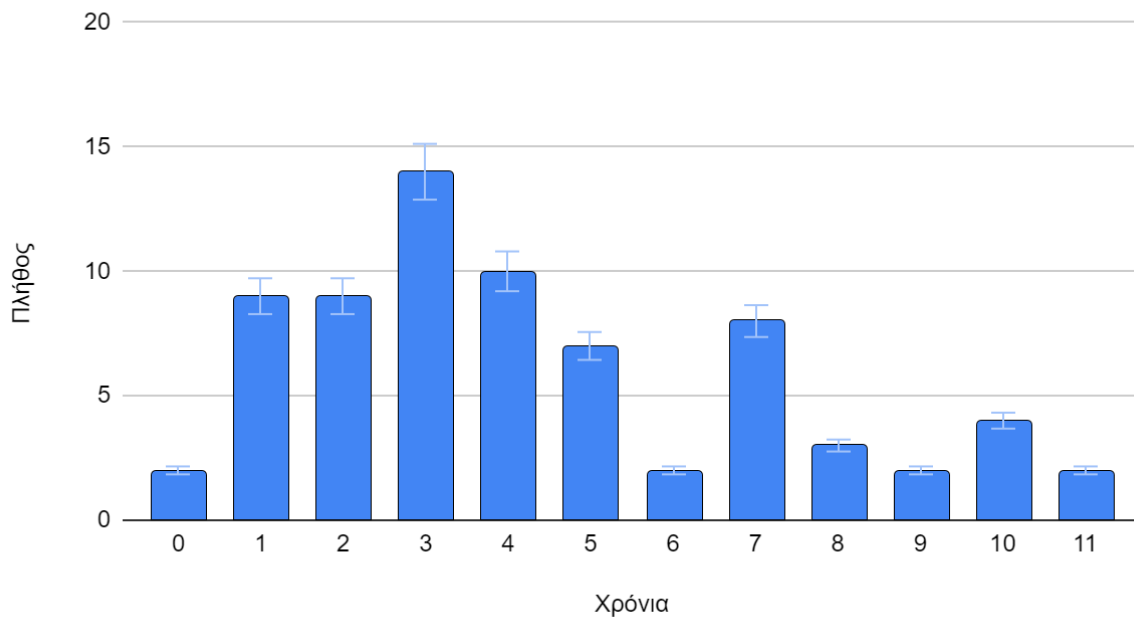


Γράφημα 1. Κατανομή των ηλικιών των γυναικών της ομάδας IVF.

3.1.2 Χρονικό Διάστημα Υπογονιμότητας

Η πλειοψηφία των γυναικών σε ποσοστό 19,44% φαίνεται πως κατέβαλε προσπάθεια γονιμοποίησης για διάστημα 3 χρόνων προτού προβεί στη λύση κάποιου πρωτοκόλλου IVF γονιμοποίησης. Ο μέσος όρος του χρονικού διαστήματος υπογονιμότητας είναι τα 4 χρόνια, σε ένα εύρος 1 χρόνων, με ελάχιστη τιμή τα 0 χρόνια και μέγιστη τα 11 (Γράφημα 2).

Χρονικό διάστημα υπογονιμότητας

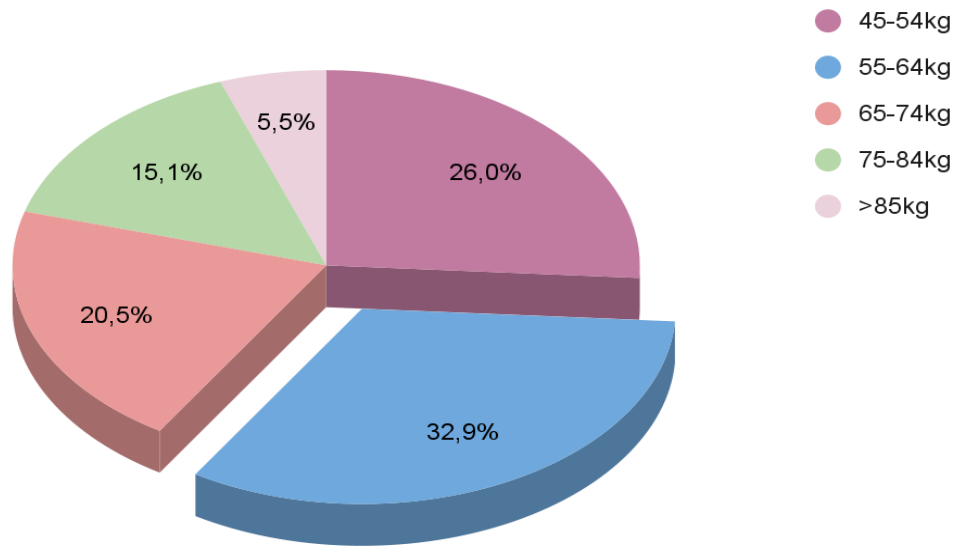


Γράφημα 2. Χρονικό διάστημα κατά το οποίο η ομάδα γυναικών IVF κατέβαλε προσπάθειες γονιμοποίησης προτού στραφεί στη λύση του ενός πρωτοκόλλου IVF γονιμοποίησης. Το τυπικό σφάλμα των δειγμάτων είναι 2,8 χρόνια.

3.1.3 Βάρος - Ύψος - BMI

Ο μέσος όρος του βάρους των γυναικών που αποτέλεσαν την ομάδα IVF ήταν τα 63,8kg, με εύρος βάρους τα 74kg, ελάχιστο βάρος τα 45kg και μέγιστο τα 115kg. Στο Γράφημα 3 διακρίνεται πως η πλειοψηφία των γυναικών της ομάδας IVF σε ποσοστό 32,9% ήταν μεταξύ 55kg και 64kg κιλά, ενώ η μειονότητα αυτών, σε ποσοστό 5,5%, ζύγιζαν περισσότερα από 85kg.

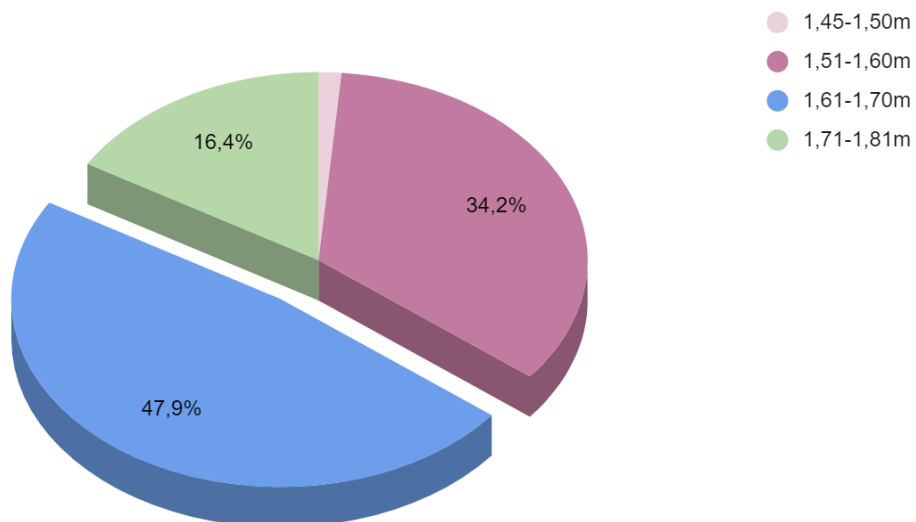
Βάρος γυναικών ομάδας IVF



Γράφημα 3. Βάρος γυναικών ομάδας IVF, με τυπική απόκλιση τα 12,9 κιλά.

Ο μέσος όρος του ύψους τους είναι τα 1,64m με εύρος ύψων 0,35m, με ελάχιστο ύψος τα 1,45m και μέγιστο τα 1,80m. Στο γράφημα 4 διακρίνεται πως η πλειοψηφία των γυναικών της ομάδας IVF έχουν ύψος μεταξύ 1,61 και 1,70m.

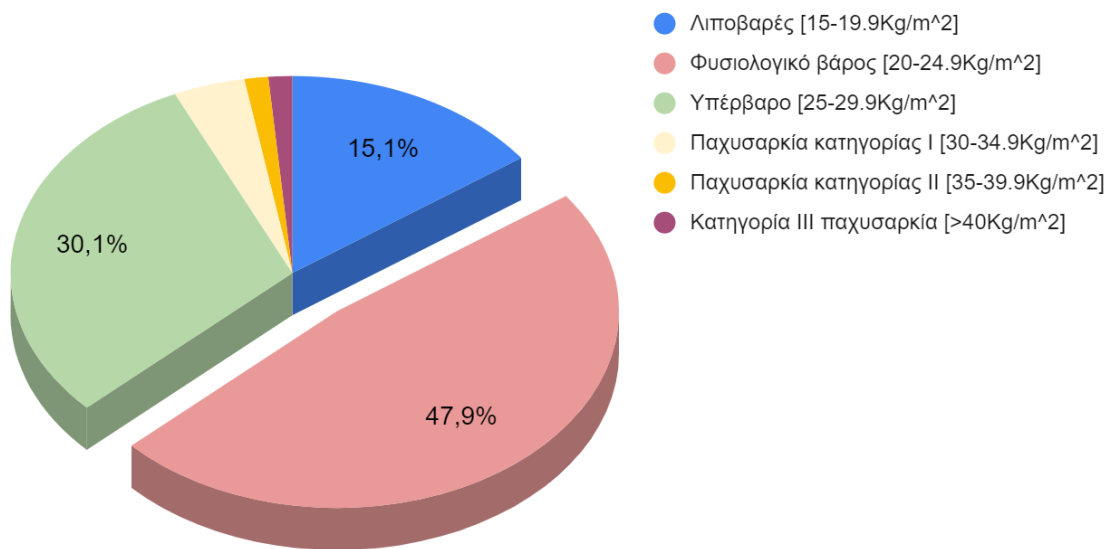
Ύψος γυναικών ομάδας IVF



Γράφημα 4. Ύψος γυναικών της ομάδας IVF, με τυπική απόκλιση τα 0,06m.

Ο υπολογισμός του Δείκτη Μάζας Σώματος των γυναικών της ομάδας IVF αποκάλυψε πως ο μέσος όρος ήταν η τιμή 23Kg/m^2 . Η πλειοψηφία των γυναικών αυτών σε ποσοστό 47,9% είχε φυσιολογικό βάρος, ενώ 30,1% των γυναικών ανήκαν στην κατηγορία των υπέρβαρων. Επιπλέον, 11 γυναίκες, ποσοστό 15,07% ήταν λιποβαρείς, ενώ 3 γυναίκες (4,11%) ήταν παχύσαρκες κατηγορίας I, μία (1,37%) παχύσαρκτη κατηγορίας II και μία (1,37%) παχύσαρκτη κατηγορίας III.

Δείκτης Μάζας Σώματος γυναικών ομάδας IVF



Γράφημα 5. Δείκτης Μάζας Σώματος γυναικών της ομάδας IVF, με τυπική απόκλιση τα $4,7\text{Kg/m}^2$.

3.1.4 FSH - LH - PRL - AMH

Το εύρος των τιμών της θυλακιοτρόπου ορμόνης-FSH που μετρήθηκε στις γυναίκες της ομάδας IVF ήταν $31,3\text{mIU/mL}$, με ελάχιστη τιμή $3,3\text{mIU/mL}$ και μέγιστη $84,6\text{mIU/mL}$. Μία μόλις γυναίκα είχε FSH $84,6\text{mIU/mL}$, μια τιμή αρκετά υψηλή που παραπέμπει σε εμμηνόπαυση και όλες οι υπόλοιπες τιμές που κυμαίνονταν μεταξύ $3,3\text{mIU/mL}$ και $24,1\text{mIU/mL}$, τιμές που παρατηρούνται σε ένα φυσιολογικό εμμηνορρυσιακό κύκλο, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 6.

Το εύρος των τιμών της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης-LH που μετρήθηκε στις γυναίκες της ομάδας IVF ήταν $40,8\text{mIU/mL}$, με ελάχιστη τιμή $1,6\text{mIU/mL}$ και μέγιστη $42,4\text{mIU/mL}$. Η γυναίκα με την αυξημένη τιμή FSH έχει και αυξημένη LH $42,4\text{mIU/mL}$, μια τιμή που επίσης παραπέμπει σε εμμηνόπαυση. Όλες οι υπόλοιπες τιμές που κυμαίνονταν μεταξύ

1,6mIU/mL και 14,8mIU/mL, τιμές που παρατηρούνται σε ένα φυσιολογικό εμμηνορρυσιακό κύκλο, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 7.

Πίνακας 6. Τιμές αναφοράς Θυλακιοτρόπου Ορμόνης (FSH) γυναικών ηλικίας 18 ετών και άνω.

Τιμές αναφοράς Θυλακιοτρόπου Ορμόνης-FSH	
Ωθυλακική φάση	2.5 - 12.5mIU/mL
Μέσο κύκλου	3.4 - 33.4mIU/mL
Ωχρινική φάση	1.0 - 9.1mIU/mL
Εμμηνόπαυση	23 - 116.3mIU/mL

Πίνακας 7. Τιμές αναφοράς Ωθυλακιοτρόπου Ορμόνης (LH) γυναικών ηλικίας 18 ετών και άνω.

Τιμές αναφοράς Ωθυλακιοτρόπου Ορμόνης-LH	
Παραγωγική φάση	1,9-12,6 mIU/mL
Ωορρηξία	8,7-76,3 mIU/mL
Εκκριτική φάση	0,5-16,9 mIU/mL
Εμμηνόπαυση	7,7-58,5 mIU/mL

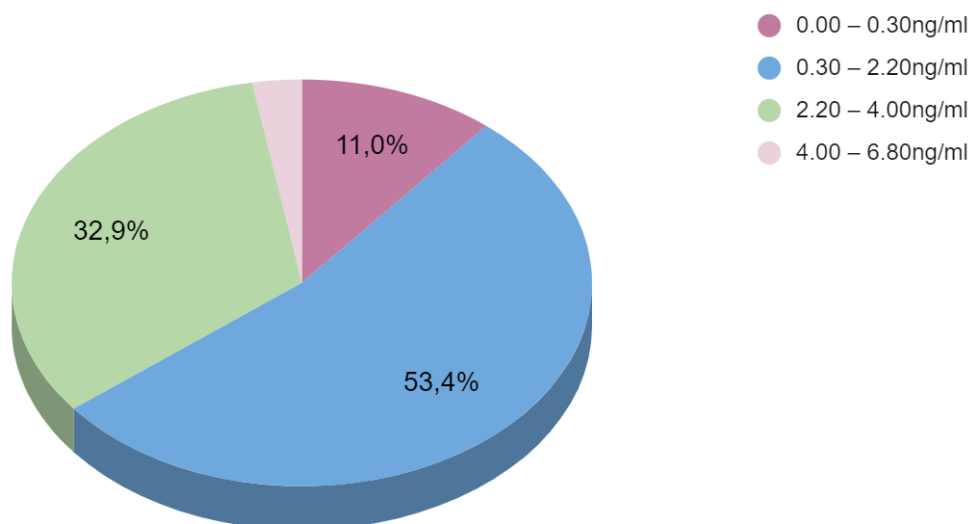
Το εύρος των τιμών της προλακτίνης ορμόνης-PRL που μετρήθηκε στις γυναίκες της ομάδας IVF ήταν 78,83ng/ml, με ελάχιστη τιμή 0,16ng/ml και μέγιστη 78,99ng/ml. Δέκα εκ των γυναικών έχουν τιμές μεταξύ 20,2ng/ml και 78,99ng/ml, γεγονός που παραπέμπει σε εγκυμοσύνη σύμφωνα με τον Πίνακα 8, όμως καμία δεν κυοφορούσε εκείνη τη χρονική στιγμή. Οι υπόλοιπες γυναίκες της ομάδας IVF έχουν τιμές PRL από 0,16ng/ml έως 18,7ng/ml.

Πίνακας 8. Τιμές αναφοράς Προλακτίνης Ορμόνης (PRL) γυναικών ηλικίας 18 ετών και άνω.

Τιμές αναφοράς Προλακτίνης Ορμόνης-PRL	
Ενήλικες	<20 ng/mL
Εγκυμοσύνη	10-300 ng/mL

Ο μέσος όρος των τιμών της ανθυμυλλέριου ορμόνης-AMH που μετρήθηκε στις γυναίκες της ομάδας IVF ήταν 1,59ng/ml και το εύρος 5,95ng/ml, με ελάχιστη τιμή 0,14ng/ml και μέγιστη 6,09ng/ml. Το 53,4% των γυναικών είχαν χαμηλή τιμή για την ορμόνη, το 32,9% ικανοποιητική και το 11,0% πολύ χαμηλή. Ωστόσο, ένα ποσοστό 2,7% είχε άριστη τιμή ανθυμυλλέριου ορμόνης (Γράφημα 6; Πίνακας 9).

Τιμή Αντιμυλλέριου Ορμόνης (AMH) γυναικών ομάδας IVF



Γράφημα 6. Τιμή Αντιμυλλέριου ορμόνης (AMH), η οποία μετρήθηκε στις γυναίκες της ομάδας IVF.

Πίνακας 9. Τιμές αναφοράς Αντιμυλλέριου Ορμόνης (PRL) γυναικών ηλικίας 18 ετών και άνω.

Τιμές αναφοράς Αντιμυλλέριου Ορμόνης-AMH	
Γονιμότητα	Εύρος τιμών (ng/ml)
Πολύ χαμηλή	0.00 – 0.30
Χαμηλή	0.30 – 2.20
Ικανοποιητική	2.20 – 4.00
Άριστη	4.00 – 6.80

(*1 ng/ml = 7.14 pmol/l)

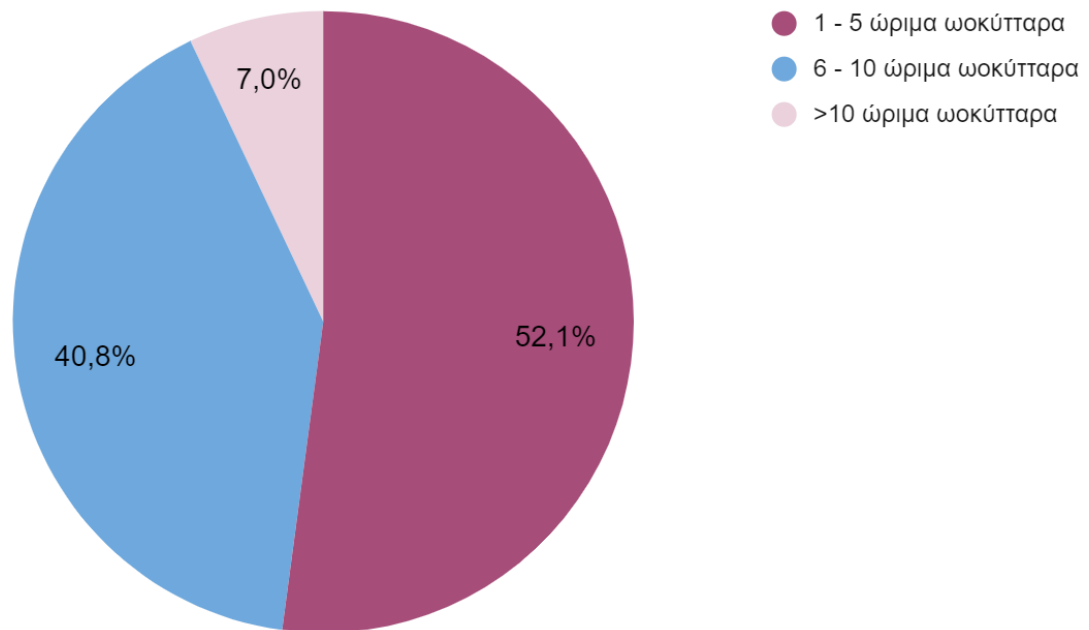
- πολύ χαμηλή→ φτωχή ανταπόκριση σε IVF με λιγότερα από 3 ωοθυλάκια ανά κύκλο,
- χαμηλή→ πιθανή καλή ανταπόκριση σε πρωτόκολλα IVF,
- ικανοποιητική→ αναμενόμενη καλή ανταπόκριση σε κύκλο IVF και
- άριστη→ προσοχή στη χορήγηση των φαρμάκων και συχνή υπερηχογραφική παρακολούθηση για την αποφυγή του συνδρόμου υπερδιέγερσης των ωοθηκών.

3.1.5 Αριθμός ώριμων ωοκυττάρων, ώριμων ωοκυττάρων καλής ποιότητας και γονιμοποιημένα ωάρια

Ο αριθμός των ώριμων ωοκυττάρων στις γυναίκες της ομάδας IVF κυμάνθηκε από 1 έως 17, εκ των οποίων το εύρος των ωοκυττάρων καλής ποιότητας ήταν 0 έως 15. Σύμφωνα με το Γράφημα 7, το 52,1% των γυναικών είχαν 1 έως 5 ώριμα ωοκύτταρα, το 40,8% 6 έως

10 και το 7,1% περισσότερα των 10. Παρατηρώντας τα δεδομένα για τα ώριμα ωοκύτταρα καλής ποιότητας και τα γονιμοποιημένα ωάρια (παράρτημα 1) διακρίνεται πως ένα ποσοστό της τάξης του 60% των ώριμων ωοκυττάρων ήταν καλής ποιότητας και από αυτά γονιμοποιήθηκαν όλα στις περισσότερες περιπτώσεις. Ωστόσο, υπήρξαν περιπτώσεις γονιμοποίησης λιγότερων ή περισσότερων ωαρίων από αυτά καλής ποιότητας.

Αριθμός ώριμων ωοκυττάρων γυναικών ομάδας IVF

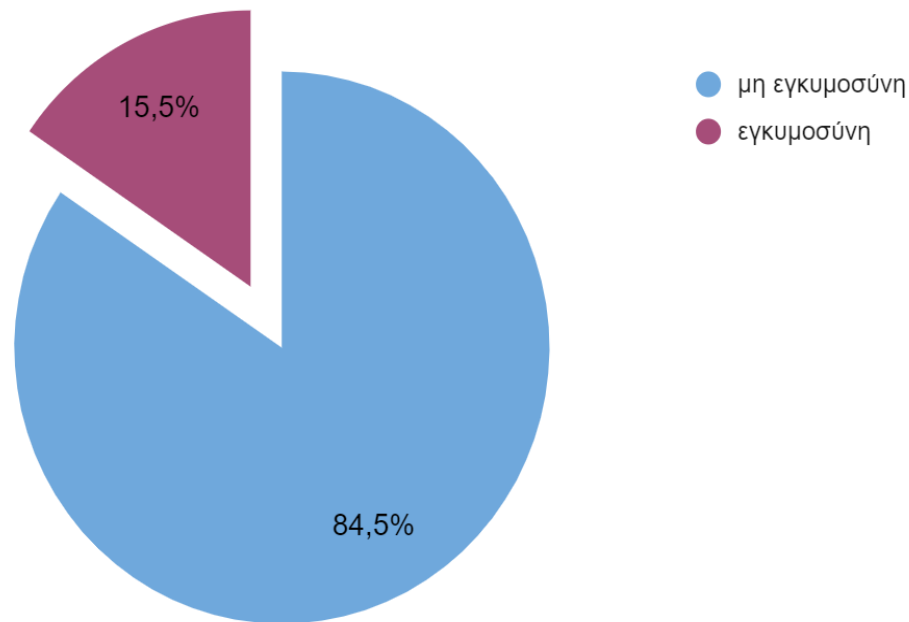


Γράφημα 7. Αριθμός ώριμων ωοκυττάρων που φέραν οι γυναίκες της ομάδας IVF.

3.1.6 Επίτευξη εγκυμοσύνης

Από το σύνολο των γυναικών της ομάδας IVF μόνο ένα ποσοστό 15,5%, που αντιστοιχεί σε 11 γυναίκες, κατάφεραν να πετύχουν εγκυμοσύνη. Οι γυναίκες της ομάδας ελέγχου όπως έχει προαναφερθεί είχαν όλες τουλάχιστον 1 πετυχημένη κύηση.

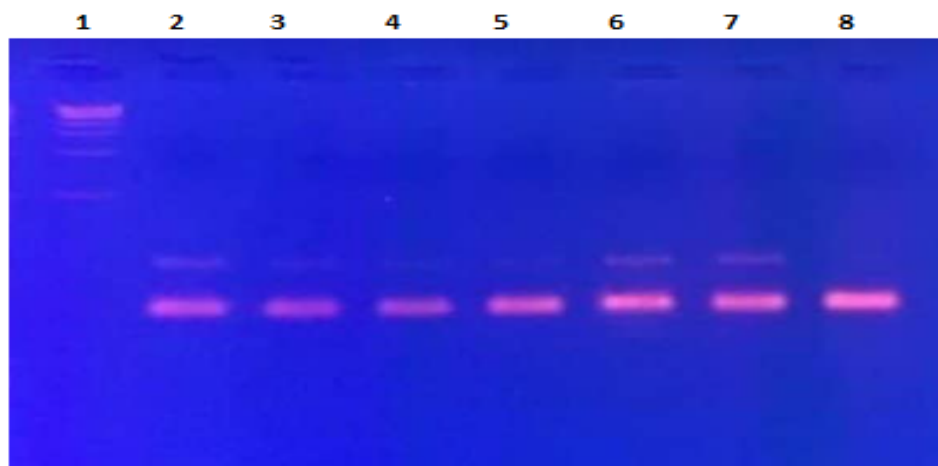
Επίτευξη Εγκυμοσύνης



Γράφημα 8. Επίτευξη ή μη εγκυμοσύνης από τις γυναίκες της ομάδας IVF.

3.2 Αλληλουχία mir27a

Η ενίσχυση της αλληλουχίας mir27a έγινε όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.4 και παρατηρήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 3% (w/v) σύμφωνα με την διαδικασία της παραγράφου 2.5. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων υπέδειξαν την παρουσία της αλληλουχίας στο σύνολο των 180 δειγμάτων. Στην Εικόνα 11 παρουσιάζεται μια ενδεικτική φωτογραφία πηκτώματος αγαρόζης, όπου φαίνονται από τα αριστερά προς τα δεξιά οι ζώνες του ladder 1kb στην πρώτη θέση, 6 διαδοχικές ζώνες μεγέθους 182bp που αναφέρονται στα δείγματα Π1, Π4, Π5, Π6, Π7, Π8 και Π9, στις θέσεις 2 έως 7, αντίστοιχα. Στη θέση 8 δεν παρατηρείται καμία ζώνη, καθώς φορτώθηκε ο αρνητικός μάρτυρας, δηλαδή ενισχυμένο προϊόν PCR (PCR product) με απεσταγμένο νερό, αντί για DNA και όλα τα υπόλοιπα συστατικά του διαλύματος ίδια.



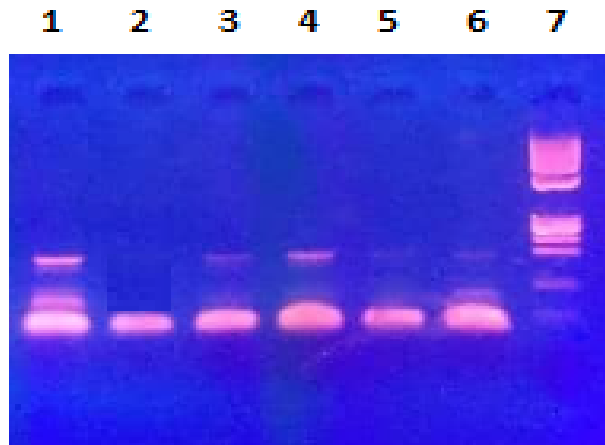
Εικόνα 11. Πηκτώμα αγαρόζης 3% (w/v) για παρατήρηση των ζωνών της αλληλουχίας mir27a μεγέθους 182bp.

- θέση 1→ ladder 1kb,
- θέση 2 έως θέση 7→ δείγματα Π1, Π4, Π5, Π6, Π7, Π8 και Π9,
- θέση 8→ αρνητικός μάρτυρας.

Άξιο αναφοράς καθίσταται το γεγονός ότι σε περίπτωση που κάποιο δείγμα δεν εμφάνιζε την αναμενόμενη ζώνη επαναλαμβανόταν γι αυτό εκ νέου η διαδικασία ενίσχυσης της αλληλουχίας mir27a και η ηλεκτροφόρηση τους προϊόντος.

3.3 Πολυμορφισμός rs895819 (mir-27a A>G)

Η επώαση των ενισχυμένων με PCR αλληλουχιών της παραγράφου 3.1, μετά από επώαση με το περιοριστικό ένζυμο DraIII-HF[®] (παράγραφος 2.6), ύστερα από ηλεκτροφόρηση παρουσίασαν τρεις διαφορετικούς γονότυπους (παράγραφος 2.7). Στην Εικόνα 12 φαίνεται μία φωτογραφία πηκτώματος αγαρόζης 3% (w/v), στην οποία από τα αριστερά προς τα δεξιά παρατηρούνται στη θέση 1 φορτώθηκε το δείγμα Π27, για το οποίο παρατηρούνται 3 ζώνες 182bp, 155bp και 27bp, στη θέση 2 βρίσκεται ο αρνητικός μάρτυρας, δηλαδή διάλυμα με απεσταγμένο νερό, αντί για ενισχυμένο με PCR τμήμα της αλληλουχίας και όλα τα υπόλοιπα συστατικά του διαλύματος ίδια, στις θέσεις 3, 4, 5 και 6 βρίσκονται διαδοχικά τα δείγματα Π1, Π7, Π8 και Π9 με δύο ζώνες 182bp και 27bp και τέλος στη θέση 7 είναι ο ladder 1kb.



Εικόνα 12. Πήκτωμα αγαρόζης 3% (w/v) για παρατήρηση της παρουσίας του πολυμορφισμού rs95819 (mir-27a A>G).

- θέση 1 → δείγμα Π27,
- θέση 2 → αρνητικός μάρτυρα,
- θέσεις 3 έως 6 → δείγματα Π1, Π7, Π8 και Π9,
- θέση 7 → ladder 1kb.

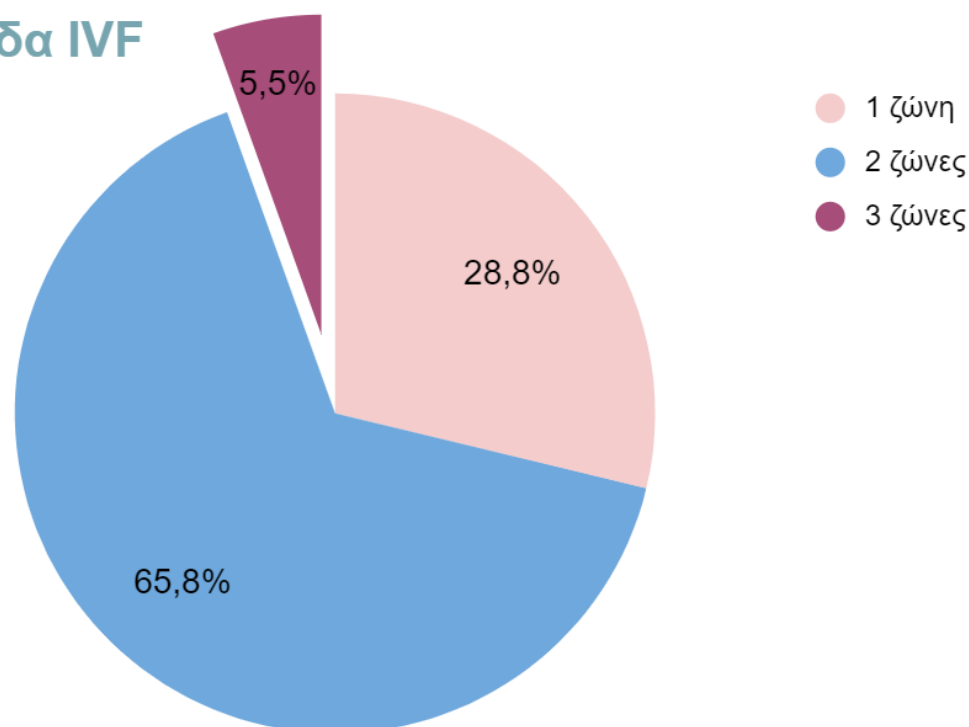
Για την επιβεβαίωση της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων, έγινε τυχαία επιλογή 10 δειγμάτων, για τα οποία έγινε επανάληψη των πειραμάτων και τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν πλήρως, χωρίς κανένα από τα δείγματα να εμφανίζει διαφορετικό γονότυπο από τον αρχικό που είχε παρατηρηθεί.

Ειδικότερα, όπως περιγράφεται και στα γραφήματα 9 και 10 και στον Πίνακα 10,

- ένα μεμονωμένο θραύσμα 182bp για τον γονότυπο CC (GG), ο οποίος αφορά ομοζυγωτία ως προς τον πολυμορφισμό φέραν τα δείγματα 21 γυναικών από την ομάδα IVF, ποσοστό 28,77% και 5 γυναικών από την ομάδα ελέγχου, ποσοστό 4,67%, εμφανώς χαμηλότερο από τα δείγματα των γυναικών που υπόκεινται σε πρωτόκολλα IVF.
- δύο θραύσματα 155bp και 27bp για τον γονότυπο TT (AA), τα οποία αφορούν την ομοζυγωτία φυσιολογικών πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων εμφάνισαν δείγματα 48 γυναικών της ομάδας IVF που αντιστοιχεί σε ποσοστό 65,75% επί του συνόλου των δειγμάτων και 50 γυναικών της ομάδας ελέγχου, που αντιστοιχούν σε ποσοστό 50,47%.

- τρία θραύσματα των 182bp, 155bp και 27bp για τον γονότυπο TC (AG), τα οποία αφορούν σε ετεροζυγωτία, παρουσίασαν 4 εκ των δειγμάτων που ανήκαν σε γυναίκες της ομάδας IVF, δηλαδή ποσοστό 5,48% και 48 δείγματα γυναικών της ομάδας ελέγχου, που αφορά ποσοστό 44,86%, σχεδόν 9 φορές μεγαλύτερο από αυτό της ομάδας IVF.

Ομάδα IVF

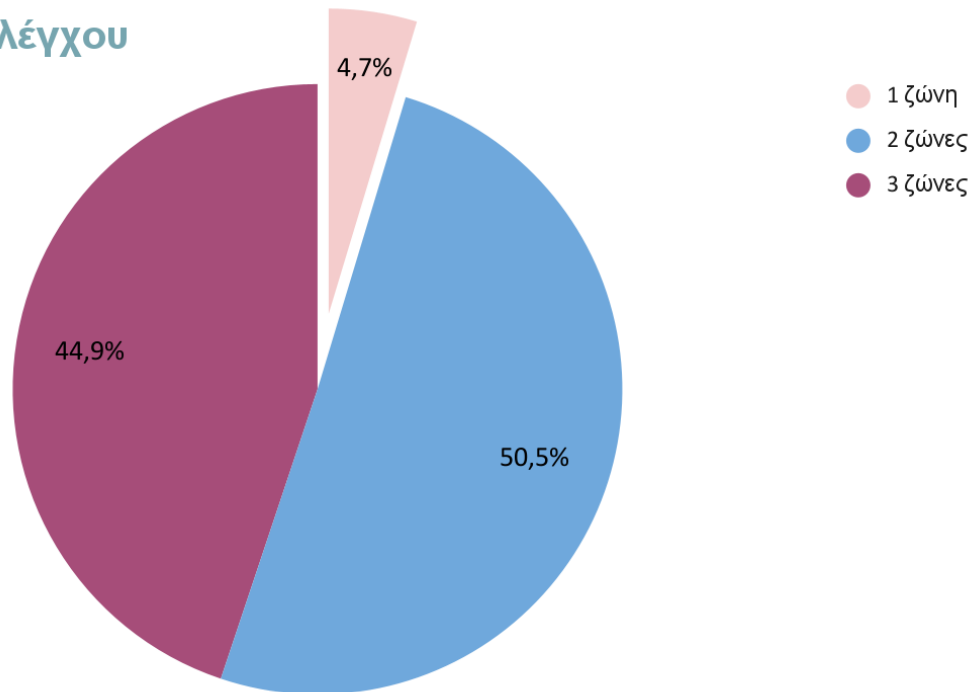


Γράφημα 9. Αριθμός θραυσμάτων των γονότυπων του πολυμορφισμού rs895819 (mir-27a A>G) στην ομάδα δειγμάτων IVF.

- ένα μεμονωμένο θραύσμα 182bp για τον γονότυπο CC (GG) εμφανίστηκε στο 28,77% των δειγμάτων,
- δύο θραύσματα 155bp και 27bp για τον γονότυπο TT (AA) παρουσιάστηκαν το 65,75% των δειγμάτων και
- τρία θραύσματα των 182bp, 155bp και 27bp για τον γονότυπο TC (AG) εμφανίστηκαν στο 5,48% των δειγμάτων, ένα ποσοστό που αποτελεί το μικρότερο των αποτελεσμάτων.

Αναλυτικά τα δεδομένα για για το γονότυπο κάθε δείγματος ύστερα από την ανίχνευση του πολυμορφισμού rs895819 (mir-27a A>G) παρατίθενται στο παράρτημα 2.

Ομάδα Ελέγχου



Γράφημα 10. Αριθμός θραυσμάτων των γονότυπων του πολυμορφισμού rs895819 (mir-27a A>G) στην ομάδα δειγμάτων ελέγχου.

- ένα μεμονωμένο θραύσμα 182bp για τον γονότυπο CC (GG) εμφανίστηκε στο 4,67% των δειγμάτων, ένα ποσοστό που αποτελεί το μικρότερο των αποτελεσμάτων,
- δύο θραύσματα 155bp και 27bp για τον γονότυπο TT (AA) παρουσιάστηκαν το 50,47% των δειγμάτων και
- τρία θραύσματα των 182bp, 155bp και 27bp για τον γονότυπο TC (AG) εμφανίστηκαν στο 44,86% των δειγμάτων.

Για τη στατιστική ανάλυση των συγκεκριμένων αποτελεσμάτων επιλέχθηκε η ανάλυση χ^2 (Chi-square test), όπως φαίνεται και στους Πίνακες 10 και 11. Συγκεκριμένα, από την ανάλυση προκύπτει ότι $p < 0.001$, γεγονός που αποδεικνύει πως τα αποτελέσματα είναι στατιστικώς σημαντικά και δεν αποτελούν οι διαφορές που παρατηρούνται τυχαίο γεγονός.

Γονότυπος ^ Ομάδα Crosstabulation

			Ομάδα		Total
			Ομάδα IVF	Ομάδα Ελέγχου	
Γονότυπος	CC (GG)	Count	21	5	26
		% within Γονότυπος	80,8%	19,2%	100,0%
		% within Ομάδα	28,8%	4,7%	14,4%
		% of Total	11,7%	2,8%	14,4%
	TC (AG)	Count	4	48	52
		% within Γονότυπος	7,7%	92,3%	100,0%
		% within Ομάδα	5,5%	44,9%	28,9%
		% of Total	2,2%	26,7%	28,9%
	TT (AA)	Count	48	54	102
		% within Γονότυπος	47,1%	52,9%	100,0%
		% within Ομάδα	65,8%	50,5%	56,7%
		% of Total	26,7%	30,0%	56,7%
Total	Count	73	107	180	
	% within Γονότυπος	40,6%	59,4%	100,0%	
	% within Ομάδα	100,0%	100,0%	100,0%	
	% of Total	40,6%	59,4%	100,0%	

Πίνακας 10. Στατιστική ανάλυση γονοτύπων Ομάδας IVF και Ομάδας Ελέγχου.

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	42,525 ^a	2	,000
Likelihood Ratio	48,363	2	,000
N of Valid Cases	180		

Πίνακας 11. Αποτελέσματα ανάλυσης χ^2 (Chi-square test).

3.4 Πολυμορφισμός rs895819 (mir-27a A>G) και επίτευξη εγκυμοσύνης

Η στατιστική ανάλυση αναφορικά με την επίτευξη εγκυμοσύνης παρουσία ενός από τους τρεις γονότυπους έγινε μέσω του τεστ χ^2 (Chi-square test). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι από το σύνολο των 26 γυναικών που είχαν γονότυπο CC (GG), οι 8 επίτευξαν εγκυμοσύνη (30,8%), ενώ οι υπόλοιπες 16 όχι (61,5%). Για 2 εκ των γυναικών δεν υπήρχαν δεδομένα

σχετικά με την εγκυμοσύνη. Από τις γυναίκες με γονότυπο TC (AG) 48 (92,3%) επίτευξαν εγκυμοσύνη, ενώ 4 (7,7%) όχι. Τέλος, από το σύνολο των 102 γυναικών που φέραν τον γονότυπο TT (AA), οι 62 (60,8%) επίτευξαν εγκυμοσύνη, ενώ οι 40 (39,2%) όχι (Πίνακας 12). Επομένως, οι γυναίκες που έχουν γονότυπο CC (GG) έχουν διπλάσια πιθανότητα αποτυχίας κύησης, ενώ οι γυναίκες με γονότυπο TC (AG) έχουν 12 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα εγκυμοσύνης και οι γυναίκες με πολυμορφισμό TT (AA) έχουν 1,55 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα εγκυμοσύνης σε σχέση με τις υπόλοιπες γυναίκες. Με άλλα λόγια, φαίνεται πως η ομοζυγωτία [CC (GG)] ως προς τον πολυμορφισμό rs895819 (mir-27a A>G) μειώνει τις πιθανότητες εγκυμοσύνης, εντείνοντας την υπογονιμότητα. Σύμφωνα με τον πίνακα 13 οι διαφορές αυτές που παρατηρούνται στα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικές, καθώς $p < 0,001$.

Γονότυπος * Εγκυμοσύνη

Crosstab

		Εγκυμοσύνη			Total	
		-	0	1		
Γονότυπος	CC (GG)	Count	2	16	8	26
		% within Γονότυπος	7,7%	61,5%	30,8%	100,0%
		% within Εγκυμοσύνη	100,0%	26,7%	6,8%	14,4%
	TC (AG)	Count	0	4	48	52
		% within Γονότυπος	0,0%	7,7%	92,3%	100,0%
		% within Εγκυμοσύνη	0,0%	6,7%	40,7%	28,9%
	TT (AA)	Count	0	40	62	102
		% within Γονότυπος	0,0%	39,2%	60,8%	100,0%
		% within Εγκυμοσύνη	0,0%	66,7%	52,5%	56,7%
Total	Count	2	60	118	180	
	% within Γονότυπος	1,1%	33,3%	65,6%	100,0%	
	% within Εγκυμοσύνη	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Πίνακας 12. Στατιστική ανάλυση δεδομένων επίτευξης εγκυμοσύνης βάσει του γονοτύπου κάθε γυναίκας.

- 0 → μη επίτευξη εγκυμοσύνης,
- 1 → επίτευξη εγκυμοσύνης,
- - → ανεπαρκή δεδομένα.

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	40,197 ^a	4	,000
Likelihood Ratio	40,011	4	,000
N of Valid Cases	180		

Πίνακας 13. Αποτελέσματα ανάλυσης χ^2 (Chi-square test).

Εστιάζοντας μόνο στις γυναίκες της Ομάδας IVF, 19 στο σύνολο είχαν γονότυπο CC(GG) και το 84,2% δεν επέτευξε εγκυμοσύνη, 48 στο σύνολο είχαν γονότυπο TC (AG) και το 83,3% δεν επέτευξε εγκυμοσύνη και 4 στο σύνολο είχαν γονότυπο TT (AA) και καμία τους δεν επέτευξε εγκυμοσύνη (για 2 εκ των γυναικών δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με την εγκυμοσύνη).

3.5 Πολυμορφισμός rs895819 (mir-27a A>G) και λοιποί παράγοντες

Για τις 73 γυναίκες που αποτέλεσαν την ομάδα IVF, για τις οποίες ήταν γνωστά τα δεδομένα που περιγράφονται στην παράγραφο 2.1 και παρατίθενται στο παράρτημα 1, πέρα από την επίτευξη ή όχι εγκυμοσύνης, έγινε περαιτέρω στατιστική ανάλυση, για τη συσχέτιση αυτών με τον πολυμορφισμό rs895819 (mir-27a A>G). Η στατιστική ανάλυση περιλάμβανε την πραγματοποίηση t-test και one way ANOVA test.

Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται τα δεδομένα από την ανάλυση της διάρκειας υπογονιμότητας, της ηλικίας, του βάρους, του ύψους και του δείκτη BMI, σε σχέση με τους τρεις διαφορετικούς γονότυπους στις γυναίκες της Ομάδας IVF. Στον παρών πίνακα παρατηρείται πως για κάθε μεταβλητή υπάρχει κατηγοριοποίηση με βάση το γονότυπο και ολικά αποτελέσματα, για τα οποία γίνεται καταγραφή του αριθμού των γυναικών (N), του μέσου (mean), της τυπικής απόκλισης (St. deviation), του τυπικού σφάλματος (std Error), του διαστήματος αξιοπιστίας για τον μέσο (95% Confidence Interval for Mean), ελάχιστη (Minimum) και μέγιστη (Maximum) τιμή. Στον Πίνακα 15 παρουσιάζονται οι τιμές p-value (sig) για κάθε μεταβλητή που προσδιορίζουν τη στατιστική σημαντικότητα των διακυμάνσεων. Διακρίνεται ότι μόνο για το βάρος και το δείκτη BMI το p-value<0.005 που σημαίνει πως οι διαφορές που παρατηρούνται στις διακυμάνσεις είναι στατιστικά σημαντικές. Ανατρέχοντας στον Πίνακα 16, παρατηρείται ότι δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των πιθανών συγκρίσεων ανά τις ομάδες.

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Διάρκεια_Υπογονιμότητας	1	20	4,55	3,203	,716	3,05	6,05	0	11
	2	48	4,19	2,671	,386	3,41	4,96	1	10
	3	4	6,00	3,464	1,732	,49	11,51	3	11
	Total	72	4,39	2,856	,337	3,72	5,06	0	11
Ηλικία	1	21	38,43	5,134	1,120	36,09	40,77	30	47
	2	48	35,85	5,508	,795	34,25	37,45	25	45
	3	4	36,25	2,500	1,250	32,27	40,23	35	40
	Total	73	36,62	5,361	,627	35,37	37,87	25	47
Βάρος	1	21	62,52	10,741	2,344	57,63	67,41	45	80
	2	48	63,46	11,485	1,658	60,12	66,79	45	97
	3	4	75,25	31,127	15,564	25,72	124,78	52	119
	Total	73	63,84	12,898	1,510	60,83	66,84	45	119
Ύψος	1	21	1,6195	,06910	,01508	1,5881	1,6510	1,48	1,72
	2	48	1,6513	,06837	,00987	1,6314	1,6711	1,53	1,80
	3	4	1,6375	,03500	,01750	1,5818	1,6932	1,60	1,68
	Total	73	1,6414	,06808	,00797	1,6255	1,6573	1,48	1,80
BMI	1	21	23,81	3,234	,706	22,34	25,28	19	30
	2	48	23,33	4,259	,615	22,10	24,57	17	35
	3	4	28,25	12,312	6,156	8,66	47,84	19	46
	Total	73	23,74	4,723	,553	22,64	24,84	17	46

Πίνακας 14. Στατιστικά δεδομένα για τη Διάρκεια Υπογονιμότητας, την Ηλικία, το Βάρος, το Ύψος και το BMI των γυναικών της ομάδας IVF σε σχέση με το γονότυπο.

- 1→ γονότυπος CC (GG)
- 2→ γονότυπος TT (AA)
- 3→ γονότυπος TC (AG)

Test of Homogeneity of Variances				
	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Διάρκεια_Υπογονιμότητας	1,186	2	69	,311
Ηλικία	1,866	2	70	,162
→ Βάρος	6,263	2	70	,003
Ύψος	,898	2	70	,412
→ BMI	10,091	2	70	,000

Πίνακας 15. Τεστ ομοιογένειας διακυμάνσεων.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Διάρκεια_Υπογονιμοτητας	Between Groups	16,693	2	8,346	1,244	,295
	Within Groups	469,801	70	6,711		
	Total	486,493	72			
Ηλικία	Between Groups	97,388	2	48,694	1,729	,185
	Within Groups	1971,872	70	28,170		
	Total	2069,260	72			
Βάρος	Between Groups	31,879	2	15,940	1,563	,217
	Within Groups	714,039	70	10,201		
	Total	745,918	72			
Ύψος	Between Groups	19,143	2	9,571	1,477	,235
	Within Groups	453,515	70	6,479		
	Total	472,658	72			
BMI	Between Groups	89,400	2	44,700	2,063	,135
	Within Groups	1516,655	70	21,666		
	Total	1606,055	72			

Πίνακας 16. Αποτελέσματα πιθανών συγκρίσεων μεταξύ των ομάδων.

Στον Πίνακα 17 όπου καταγράφονται τα Post Hoc Tests φαίνονται οι επιμέρους συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων. Ειδικότερα, είναι καταγεγραμμένες οι διαφορές που παρουσιάζονται στις τιμές των μέσων, όταν συγκρίνονται ανά δύο κάθε φορά οι γονότυποι (Mean Difference), το τυπικό σφάλμα (std Error), η τιμή p-value (Sig) και το διάστημα αξιοπιστίας (95% Confidence Interval). Διακρίνεται πως για καμία σύγκριση τα αποτελέσματα δεν κρίνονται στατιστικώς σημαντικά, καθώς για όλες τις επιμέρους συγκρίσεις ισχύει ότι $p\text{-value} > 0.05$.

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Bonferroni

Dependent Variable	(I) Γονότυπος	(J) Γονότυπος	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Διάρκεια_Υπογονιμότητας	1	2	-1,039	,678	,390	-2,70	,62
		3	-,226	1,413	1,000	-3,69	3,24
	2	1	1,039	,678	,390	-,62	2,70
		3	,813	1,348	1,000	-2,49	4,12
	3	1	,226	1,413	1,000	-3,24	3,69
		2	-,813	1,348	1,000	-4,12	2,49
Ηλικία	1	2	2,574	1,389	,204	-,83	5,98
		3	2,179	2,895	1,000	-4,92	9,28
	2	1	-2,574	1,389	,204	-5,98	,83
		3	-,396	2,762	1,000	-7,17	6,38
	3	1	-2,179	2,895	1,000	-9,28	4,92
		2	,396	2,762	1,000	-6,38	7,17
Βάρος	1	2	-1,366	,836	,320	-3,42	,68
		3	,155*	1,742	1,000	-4,12	4,43
	2	1	1,366	,836	,320	-,68	3,42
		3	1,521*	1,662	1,000	-2,56	5,60
	3	1	-,155*	1,742	1,000	-4,43	4,12
		2	-1,521*	1,662	1,000	-5,60	2,56
Ύψος	1	2	-1,057	,666	,351	-2,69	,58
		3	,131	1,389	1,000	-3,28	3,54
	2	1	1,057	,666	,351	-,58	2,69
		3	1,188	1,325	1,000	-2,06	4,44
	3	1	-,131	1,389	1,000	-3,54	3,28
		2	1,188	1,325	1,000	-2,06	4,44
BMI	1	2	,476	1,218	1,000	-2,51	3,46
		3	-4,440	2,539	,254	-10,67	1,79
	2	1	-,476	1,218	1,000	-3,46	2,51
		3	-4,917	2,422	,139	-10,86	1,03
	3	1	4,440	2,539	,254	-1,79	10,67
		2	4,917	2,422	,139	-1,03	10,86

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Πίνακας 17. Post Hoc Tests-Επιμέρους συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων.

- 1→ γονότυπος CC (GG)
- 2→ γονότυπος TT (AA)
- 3→ γονότυπος TC (AG)

Στον Πίνακα 18 παρουσιάζονται τα δεδομένα από την ανάλυση των ορμονών FSH, LH, PRL, AMH, τον αριθμό των ώριμων ωοκυττάρων, των ώριμων ωοκυττάρων καλής ποιότητας και των γονιμοποιημένων ωαρίων, σε σχέση με τους τρεις διαφορετικούς γονότυπους στις γυναίκες της Ομάδας IVF. Για κάθε μεταβλητή και σε αυτό τον πίνακα, υπάρχει κατηγοριοποίηση με βάση το γονότυπο και ολικά αποτελέσματα, για τα οποία

γίνεται καταγραφή του αριθμού των γυναικών (N), του μέσου (mean), της τυπικής απόκλισης (St. deviation), του τυπικού σφάλματος (std Error), του διαστήματος αξιοπιστίας για τον μέσο (95% Confidence Interval for Mean), ελάχιστη (Minimum) και μέγιστη (Maximum) τιμή.

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
FSH	1	21	11,455	17,5531	3,8304	3,465	19,445	,0	84,6
	2	48	7,933	3,1624	,4564	7,014	8,851	3,6	14,8
	3	4	8,280	2,0824	1,0412	4,966	11,594	7,1	11,4
	Total	73	8,965	9,7386	1,1398	6,693	11,237	,0	84,6
LH	1	21	6,330	8,5255	1,8604	2,449	10,211	,0	42,4
	2	48	5,221	2,6972	,3893	4,437	6,004	,0	14,8
	3	4	5,623	3,7585	1,8793	-,358	11,603	2,3	11,0
	Total	73	5,562	5,0772	,5942	4,377	6,746	,0	42,4
PRL	1	21	8,016	6,6687	1,4552	4,981	11,052	,0	20,2
	2	48	11,978	8,0649	1,1641	9,636	14,320	,0	30,0
	3	4	28,465	34,0277	17,0139	-25,681	82,611	5,4	79,0
	Total	73	11,742	11,0761	1,2964	9,158	14,326	,0	79,0
AMH	1	21	12,126	10,6302	2,3197	7,287	16,965	1,0	43,5
	2	48	11,008	8,9286	1,2887	8,416	13,601	1,2	37,3
	3	4	11,075	6,5322	3,2661	,681	21,469	4,6	16,7
	Total	73	11,333	9,2447	1,0820	9,176	13,490	1,0	43,5
COC	1	21	4,90	3,081	,672	3,50	6,31	0	12
	2	48	6,27	3,273	,472	5,32	7,22	1	17
	3	4	4,75	2,630	1,315	,57	8,93	1	7
	Total	73	5,79	3,219	,377	5,04	6,55	0	17
ποιοτικάCOC	1	21	3,38	2,269	,495	2,35	4,41	0	8
	2	48	4,44	2,697	,389	3,65	5,22	0	15
	3	4	3,25	1,708	,854	,53	5,97	1	5
	Total	73	4,07	2,562	,300	3,47	4,67	0	15
γονιμοποιημένα_ωάρια	1	21	3,52	2,400	,524	2,43	4,62	0	8
	2	48	4,56	2,697	,389	3,78	5,35	0	14
	3	4	3,75	2,062	1,031	,47	7,03	1	6
	Total	73	4,22	2,599	,304	3,61	4,83	0	14

Πίνακας 18. Στατιστικά δεδομένα για τις ορμόνες FSH, LH, PRL, AMH, τον αριθμό των ώριμων ωοκυττάρων, των ώριμων ωοκυττάρων καλής ποιότητας και των γονιμοποιημένων ωαρίων των γυναικών της ομάδας IVF σε σχέση με το γονότυπο.

- 1→ γονότυπος CC (GG)
- 2→ γονότυπος TT (AA)
- 3→ γονότυπος TC (AG)

Στον Πίνακα 19 παρουσιάζονται οι τιμές p-value (sig) για κάθε μεταβλητή που προσδιορίζουν τη στατιστική σημαντικότητα των διακυμάνσεων. Διακρίνεται πως για την ορμόνη FSH είναι p-value=0.012 (<0.05) και για την ορμόνη PRL p-value<0.001, που

σημαίνει πως οι διαφορές στις διακυμάνσεις που παρατηρούνται είναι στατιστικά σημαντικές. Ανατρέχοντας στον Πίνακα 20, παρατηρείται ότι υφίσταται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των πιθανών συγκρίσεων ανά τις ομάδες για την τιμή της ορμόνης PRL, καθώς $p\text{-value}=0.002 (<0.05)$.

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
→ FSH	4,678	2	70	,012
LH	1,546	2	70	,220
→ PRL	21,370	2	70	,000
AMH	,600	2	70	,552
COC	,335	2	70	,717
ποιοτικάCOC	,478	2	70	,622
γονιμοποιημένα_ωάρια	,301	2	70	,741

Πίνακας 19. Τεστ ομοιογένειας διακυμάνσεων.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
FSH	Between Groups	183,254	2	91,627	,965	,386
	Within Groups	6645,224	70	94,932		
	Total	6828,478	72			
LH	Between Groups	17,995	2	8,997	,343	,711
	Within Groups	1837,993	70	26,257		
	Total	1855,988	72			
→ PRL	Between Groups	1412,826	2	706,413	6,664	,002
	Within Groups	7420,076	70	106,001		
	Total	8832,902	72			
AMH	Between Groups	18,522	2	9,261	,106	,900
	Within Groups	6134,857	70	87,641		
	Total	6153,379	72			
COC	Between Groups	31,879	2	15,940	1,563	,217
	Within Groups	714,039	70	10,201		
	Total	745,918	72			
ποιοτικάCOC	Between Groups	19,143	2	9,571	1,477	,235
	Within Groups	453,515	70	6,479		
	Total	472,658	72			
γονιμοποιημένα_ωάρια	Between Groups	16,693	2	8,346	1,244	,295
	Within Groups	469,801	70	6,711		
	Total	486,493	72			

Πίνακας 20. Αποτελέσματα πιθανών συγκρίσεων μεταξύ των ομάδων.

Στον Πίνακα 21 όπου καταγράφονται τα Post Hoc Tests, φαίνονται οι επιμέρους συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων. Συγκεκριμένα, είναι καταγεγραμμένες οι διαφορές που παρουσιάζονται στις τιμές των μέσων, όταν συγκρίνονται ανά δύο κάθε φορά οι γονότυποι (Mean Difference), το τυπικό σφάλμα (std Error), η τιμή p-value (Sig) και το διάστημα αξιοπιστίας (95% Confidence Interval).

Για τις συγκρίσεις των μέσων της τιμής της ορμόνης PRL για τους γονότυπους 1 [CC (GG)] με 3 [TC (AG)], 2 [TT (AA)] με 3 [TC (AG)], 3 [TC (AG)] με 1 [CC (GG)] και 3 [TC (AG)] με 2 [TT (AA)] διακρίνεται πως η τιμή p-value <0,05, που σημαίνει πως οι παρατηρήσεις είναι στατιστικά σημαντικές. Η στατιστική σημαντικότητα αυτή επιβεβαιώνεται και από την έλλειψη της τιμής 0 από το 95% διάστημα αξιοπιστίας. Επομένως, φαίνεται πως για τις γυναίκες της Ομάδας IVF, οι τιμές της ορμόνης PRL στις γυναίκες που φέραν ετεροζυγωτία ως προς τον πολυμορφισμό rs895819 (mir-27a A>G), με γονότυπο TC (AG) (μέση τιμή=28,465ng/ml) είναι 2,33 φορές υψηλότερη από τις γυναίκες που είναι ομόζυγες ως προς τις φυσιολογικές πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες, με γονότυπο TT (AA) (μέση τιμή=11,978ng/ml) και 3,55 φορές υψηλότερη από τις γυναίκες που είναι ομόζυγες ως προς τον πολυμορφισμό, με γονότυπο CC (GG) (μέση τιμή=8,016ng/ml).

Multiple Comparisons

Bonferroni

Dependent Variable	(I) Γονότυπος	(J) Γονότυπος	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
FSH	1	2	3,5225	2,5492	,514	-2,730	9,775
		3	3,1752	5,3154	1,000	-9,863	16,213
	2	1	-3,5225	2,5492	,514	-9,775	2,730
		3	-,3473	5,0706	1,000	-12,785	12,090
	3	1	-3,1752	5,3154	1,000	-16,213	9,863
		2	,3473	5,0706	1,000	-12,090	12,785
LH	1	2	1,1094	1,3407	1,000	-2,179	4,398
		3	,7075	2,7955	1,000	-6,149	7,564
	2	1	-1,1094	1,3407	1,000	-4,398	2,179
		3	-,4019	2,6667	1,000	-6,943	6,139
	3	1	-,7075	2,7955	1,000	-7,564	6,149
		2	,4019	2,6667	1,000	-6,139	6,943
PRL	1	2	-3,9619	2,6937	,437	-10,569	2,645
		3	-20,4488*	5,6168	,002	-34,226	-6,672
	2	1	3,9619	2,6937	,437	-2,645	10,569
		3	-16,4869*	5,3580	,009	-29,629	-3,344
	3	1	20,4488*	5,6168	,002	6,672	34,226
		2	16,4869*	5,3580	,009	3,344	29,629
AMH	1	2	1,1174	2,4493	1,000	-4,891	7,125
		3	1,0507	5,1072	1,000	-11,477	13,578
	2	1	-1,1174	2,4493	1,000	-7,125	4,891
		3	-,0667	4,8720	1,000	-12,017	11,884
	3	1	-1,0507	5,1072	1,000	-13,578	11,477
		2	,0667	4,8720	1,000	-11,884	12,017
COC	1	2	-1,366	,836	,320	-3,42	,68
		3	,155	1,742	1,000	-4,12	4,43
	2	1	1,366	,836	,320	-,68	3,42
		3	1,521	1,662	1,000	-2,56	5,60
	3	1	-,155	1,742	1,000	-4,43	4,12
		2	-1,521	1,662	1,000	-5,60	2,56
ποιοτικάCOC	1	2	-1,057	,666	,351	-2,69	,58
		3	,131	1,389	1,000	-3,28	3,54
	2	1	1,057	,666	,351	-,58	2,69
		3	1,188	1,325	1,000	-2,06	4,44
	3	1	-,131	1,389	1,000	-3,54	3,28
		2	-1,188	1,325	1,000	-4,44	2,06
γονιμοποιημένα_ωάρια	1	2	-1,039	,678	,390	-2,70	,62
		3	-,226	1,413	1,000	-3,69	3,24
	2	1	1,039	,678	,390	-,62	2,70
		3	,813	1,348	1,000	-2,49	4,12
	3	1	,226	1,413	1,000	-3,24	3,69
		2	-,813	1,348	1,000	-4,12	2,49

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Πίνακας 21. Post Hoc Tests-Επιμέρους συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων.

- 1→ γονότυπος CC (GG)
- 2→ γονότυπος TT (AA)
- 3→ γονότυπος TC (AG)

4. Συζήτηση

Σε όλο τον κόσμο περισσότεροι από 186 εκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν από υπογονιμότητα, η πλειοψηφία των οποίων είναι κάτοικοι αναπτυσσόμενων χωρών (Inhorn & Patrizio, 2015). Ο επιπολασμός της υπογονιμότητας σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας έχει υπολογιστεί ότι είναι ένα στα επτά ζευγάρια στον δυτικό κόσμο και ένα στα τέσσερα ζευγάρια στις αναπτυσσόμενες χώρες. Σε ορισμένες περιοχές του κόσμου, συμπεριλαμβανομένης της Νότιας Ασίας, ορισμένες χώρες της υποσαχάριας Αφρικής, της Μέσης Ανατολής και της Βόρειας Αφρικής, της Κεντρικής και Ανατολικής Ευρώπης και της Κεντρικής Ασίας, τα ποσοστά υπογονιμότητας μπορεί να φτάσουν ακόμα και το 30% (Mascarenhas et al., 2012). Τα αίτια που μπορούν να προκαλέσουν την υπογονιμότητα μπορεί να είναι είτε βιολογικά, είτε και κοινωνικά.

Οι γενετικές ιδιομορφίες, όπως οι γονιδιακοί πολυμορφισμοί σε γυναίκες υπογόνιμες, οι οποίες επιλέγουν τη λύση κάποιου προγράμματος εξωσωματικής γονιμοποίησης, αποτελούν πλέον στόχο πολλών ερευνών, χωρίς να έχει αποφανθεί πλήρως ο ρόλος τους στην υπογονιμότητα. Ειδικότερα, οι πολυμορφισμοί σε miRNAs έχουν ξεκινήσει να μελετώνται και να συσχετίζονται με παράγοντες που φέρουν κάποιο ρόλο στην υπογονιμότητα των γυναικών (Rah et al., 2017; Di Pietro et al., 2018; Tabrizi et al., 2020).

Ειδικότερα, ο πολυμορφισμός rs895819 του γονιδίου mir27a (A>G), το οποίο από μελέτες φαίνεται πως επηρεάζει τη γονιμότητα (Drevet et al., 2015) βρίσκεται στον τερματικό βρόχο του pre-miR-27a και ενδεχομένως μπορεί να επηρεάσει την ωρίμανση του miR-27a (Liu et al., 2009). Για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό η μελέτη των Tabrizi και συνεργατών (2020) ανέφερε πως μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πιθανός διαγνωστικός δείκτης για τη διάγνωση του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS). Επίσης, μια πρόσφατη εργασία ανέφερε ότι ο πολυμορφισμός rs895819 miR-27a σχετίζεται με κίνδυνο ιδιοπαθούς υποτροπιάζουσας απώλειας εγκυμοσύνης (RPL-καθ' έξιν αποβολή) (Rah et al., 2017). Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της έρευνας υποδηλώνουν ότι οι ασθενείς με μειωμένο κίνδυνο για καθ' έξιν αποβολές σχετίζονταν με τους γονότυπους του miR-27a (AG και AG+GG). Επιπλέον, τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν πως οι γονότυποι miR-27a AG και AG+GG φέρουν σημαντική συμβολή στην πρόβλεψη των επιπέδων φυλλικού οξέος σε ασθενείς με καθ' έξιν αποβολές. Η μελέτη αφορούσε γυναίκες από την Κορέα, με 387 να αποτελούν την ομάδα μελέτης και 255 την ομάδα ελέγχου.

Για το ρόλο του miR-27a γονιδίου, ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή μη του πολυμορφισμού rs895819, έχει αποδειχθεί πως είναι σημαντικός στην παθολογία της

ενδομητρίωσης και η παρατήρησή του μέσα από μελέτη πρότεινε ότι θα μπορούσε να αντιπροσωπεύσει μη επεμβατικό δείκτη για τη χρόνια ενδομητρίτιδα (Di Pietro et al., 2018). Πρόκειται δηλαδή για miRNA που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για για θεραπευτικούς σκοπούς στις διαδικασίες εξωσωματικής γονιμοποίησης IVF για την αξιολόγηση της ποιότητας του ενδομητρίου. Η μελέτη έγινε σε σύνολο 30 γυναικών, εκ των οποίων οι 15 είχαν ενδομητρίωση και οι υπόλοιπες όχι.

Τόσο το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, όσο οι καθ' ἑξίν αποβολές, όσο και η ενδομητρίωση που προαναφέρθηκαν, αποτελούν αιτίες υπογονιμότητας για τις οποίες όπως φάνηκε το γονίδιο mir27a και ο πολυμορφισμός rs895819 (mir-27a A>G) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο. Η παρούσα εργασία, που συμφωνα με την έως τώρα βιβλιογραφία είναι η πρώτη που εξετάζει τον παρόν πολυμορφισμό σε γυναίκες του ελληνικού πληθυσμού, επιβεβαιώνει τη συσχέτιση του πολυμορφισμού με την υπογονιμότητα. Ειδικότερα, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι από το σύνολο των 26 γυναικών που ήταν ομόζυγες για τον πολυμορφισμό, με γονότυπο CC (GG), οι 8 επέτευξαν εγκυμοσύνη (30,8%), ενώ οι υπόλοιπες 16 όχι (61,5%) (για 2 εκ των γυναικών δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με την εγκυμοσύνη). Από τις γυναίκες με ομοζυγωτία ως προς τις φυσιολογικές αλληλουχίες του γονιδίου mir-27a, με γονότυπο TC (AG), 48 (92,3%) επέτευξαν εγκυμοσύνη, ενώ 4 (7,7%) όχι. Τέλος, από το σύνολο των 102 γυναικών που παρουσίασαν ετεροζυγωτία ως προς τον πολυμορφισμό, με γονότυπο TT (AA), οι 62 (60,8%) επέτευξαν εγκυμοσύνη, ενώ οι 40 (39,2%) όχι. Φαίνεται ότι γυναίκες που έχουν γονότυπο CC (GG) έχουν 2 φορές περισσότερες πιθανότητες αποτυχίας κύησης σε σχέση με τις υπόλοιπες. Αντίθετα, οι γυναίκες με γονότυπο TC (AG) ή TT (AA) έχουν αυξημένες πιθανότητες επίτευξης εγκυμοσύνης. Πρέπει να αναφερθεί πως τα αποτελέσματα κρίθηκαν στατιστικά σημαντικά μετά από ανάλυση χ^2 , γιατί παρουσίασαν τιμή p-value <0.005. Άρα δείχθηκε πως η ομοζυγωτία [CC (GG)] ως προς τον πολυμορφισμό rs895819 (mir-27a A>G) μειώνει τις πιθανότητες εγκυμοσύνης, εντείνοντας την υπογονιμότητα. Μελετώντας μόνο την ομάδα ελέγχου 19 στο σύνολο είχαν γονότυπο CC(GG) και το 84,2% δεν επέτευξε εγκυμοσύνη, 48 στο σύνολο είχαν γονότυπο TC (AG) και το 83,3% δεν επέτευξε εγκυμοσύνη και 4 στο σύνολο είχαν γονότυπο TT (AA) και καμία τους δεν επέτευξε εγκυμοσύνη (για 2 εκ των γυναικών δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με την εγκυμοσύνη).

Αναφορικά με τα κλινικά χαρακτηριστικά του υπό μελέτη πληθυσμού γυναικών που ακολούθησαν προγράμματα εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF), από τις στατιστικές αναλύσεις δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την ηλικία, το χρονικό διάστημα υπογονιμότητας, το ύψος, την τιμή της ορμόνης LH, την τιμή της ορμόνης

AMH. Πολλές είναι οι μελέτες που υποστηρίζουν πως η ηλικία της γυναίκας όταν είναι άνω των 40 ετών αποτελεί δυσμενή παράγοντα που επηρεάζει την πορεία του πρωτοκόλλου της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Ωστόσο, στην παρούσα εργασία η πλειοψηφία των γυναικών ήταν μικρότερες από τα 40 και μόλις το 31,5% των γυναικών ήταν άνω των 40 ετών, επομένως ο παράγοντας ηλικία δε φαίνεται πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο (Lledo et al., 2013). Επιπλέον, μελέτες αποδεικνύουν ότι η τιμή της AMH έχει υψηλή προγνωστική αξία στην αξιολόγηση του αποθέματος των ωοθηκών, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερη αποτελεσματικότητα των διαδικασιών εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) (Bedenk et al., 2020), όμως μόνο 11% των γυναικών της ομάδας IVF της παρούσας εργασίας είχαν χαμηλές τιμές, μεταξύ 0.00 – 0.30 ng/ml, για την ορμόνη που χαρακτηρίζουν πολύ χαμηλή τη γονιμότητά τους. Επίσης, η υψηλή συγκέντρωση LH και FSH συνδέονται με μειωμένες πιθανότητες σύλληψης (Bala et al., 2021), όμως στην παρούσα μελέτη μόνο μία γυναίκα της υπό μελέτη ομάδας (1,3%) είχε αυξημένες τιμές για τις ορμόνες αυτές. Επιπλέον, αναφορικά με τον αριθμό των ώριμων των ώριμων ωαρίων, των ωαρίων καλής ποιότητας και των γονιμοποιημένων ωαρίων δεν παρατηρήθηκαν στον αριθμό τους μεταξύ γυναικών με διαφορετικό γονότυπο

Μελέτη αναφορικά με το βάρος και τον δείκτη μάζας σώματος BMI και τη συσχέτισή τους με την υπογονιμότητα δείχνει ότι για κάθε μονάδα αύξηση του BMI αυξάνει την πιθανότητα υπογονιμότητα κατά 1,69 φορές (Moridi et al., 2019). Η στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές του βάρους και του δείκτη BMI σε γυναίκες ομάδας IVF με έναν από τους τρεις γονοτύπους που μελετήθηκαν, επιβεβαιώνεται, όμως δεν έχει διερευνηθεί στην παρούσα μελέτη η επίδραση των δεικτών αυτών στην υπογονιμότητα, που ενδεχομένως να επηρεάζεται ως ένα, καθώς μόνο περίπου το 50% των γυναικών είχαν φυσιολογικές τιμές BMI. Η διαφορά ωστόσο, τόσο του βάρους σώματος των γυναικών αυτών, ανάλογα με τον γονότυπο που φέρουν, όσο και του δείκτη BMI, αν και είναι στατιστικά σημαντική, δεν είναι μεγάλη για να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί είτε το βάρος, είτε το BMI ως δείκτες πρόγνωσης του πολυμορφισμού rs895819 (mir-27a A>G).

Ευρήματα ερευνών αναφέρουν πως υψηλή συγκέντρωση της ορμόνης PRL (υπερπρολακτιναιμία), που ορίζεται ως βασικό επίπεδο PRL ορού ≥ 15 ng/mL, παρατηρείται σε υπογόνιμες γυναίκες (Sharma et al., 2012; Triggianese et al., 2014). Στην παρούσα, μελέτη η διαφοράς που παρατηρήθηκαν στις τιμές τις PRL μεταξύ των γυναικών που παρουσίαζαν είτε ομοζυγωτία ως προς τον πολυμορφισμό rs895819 (mir-27a A>G), είτε ομοζυγωτία ως προς τις φυσιολογικές πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες του γονιδίου mir-27a, είτε ετεροζυγωτία, ήταν στατιστικά σημαντικές. Συγκεκριμένα, οι τιμές της ορμόνης PRL στις γυναίκες που

φέραν ετεροζυγωτία ως προς τον πολυμορφισμό, με γονότυπο TC (AG) είχαν μέση τιμή PRL 28,465ng/ml, ομόζυγες ως προς τις φυσιολογικές πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες, με γονότυπο TT (AA) είχαν μέση τιμή PRL 11,978ng/ml και γυναίκες που είναι ομόζυγες ως προς τον πολυμορφισμό, με γονότυπο CC (GG) είχαν μέση τιμή PRL 8,016ng/ml. Απο τις γυναίκες την Ομάδας IVF με PRL>15ng/ml, δηλαδή αυτών που παρουσίαζαν ετεροζυγωτία, ποσοστό 83,3% αυτών δεν επίτευξε εγκυμοσύνη. Σε πρώτη ανάγνωση επιβεβαιώνει τις προηγούμενες μελέτες που θέλουν τις γυναίκες με υπερπρολακτιναιμία να είναι υπογόνιμες, όμως στην προκειμένη περίπτωση υψηλά ποσοστά υπογονιμότητας εμφάνισαν και οι γυναίκες με χαμηλότερες τιμές PRL, αλλά διαφορετικούς γονοτύπους. Επομένως, η τιμή της ορμόνης PRL, εφόσον παρουσιάζει μεγάλες και στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάλογα με τους γονότυπους που μελετώνται, μπορεί δυνητικά να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης πρόβλεψης της ομοζυγωτίας ως προς τον πολυμορφισμό, της ομοζυγωτίας ως προς τις φυσιολογικές πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες ή την ετεροζυγωτία.

5. Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής μελέτης φαίνεται πως επιβεβαιώνουν την εμπλοκή του πολυμορφισμού rs895819 (mir-27a A>G) στη γυναικεία υπογονιμότητα και έρχονται να ενισχύσουν τη λιγοστή βιβλιογραφία που αφορά τη συσχέτιση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με ζητήματα υπογονιμότητας. Η παρούσα μελέτη του πολυμορφισμού rs895819 (mir-27a A>G) είναι η πρώτη που γίνεται στον ελληνικό πληθυσμό και δεδομένου του μικρού σχετικά δείγματος γυναικών (n=180), των οποίων ο γονότυπος μελετήθηκε ως προς τον πολυμορφισμό, κρίνεται σημαντικό να εμπλουτιστούν οι ήδη υπάρχουσες καταγραφές γονοτύπων με νέες, περισσότερων δειγμάτων, για να επιτευχθεί η περαιτέρω συσχέτιση του πολυμορφισμού, τόσο με την έκβαση της εγκυμοσύνης, όσο και άλλους παράγοντες που την επηρεάζουν. Επιπλέον, η συσχέτιση του πολυμορφισμού με τη συγκέντρωση της ορμόνης PRL φαίνεται στατιστικά σημαντική, οπότε μπορεί να είναι πεδίο περαιτέρω μελέτης, καθώς πρώτη φορά φαίνεται να γίνεται η συσχέτισή της με τον πολυμορφισμό rs895819 (mir-27a A>G) και να παρουσιάζεται η δυνητική χρήση της ως δείκτη πρόβλεψης ύπαρξης ή μη του πολυμορφισμού.

Η πραγματοποίηση γενετικής μελέτης πριν και μετά από την αποτυχία επίτευξης εγκυμοσύνης σε γυναίκες που ακολουθούν προγράμματα εξωσωματικής γονιμοποίησης, τόσο για τον παρόν πολυμορφισμό, όσο και για άλλους που αφορούν microRNAs, μπορούν να βελτιώσουν τη γνώση σχετικά με τη συσχέτισή τους με τη γυναικεία υπογονιμότητα, τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση και την ικανότητά τους να χρησιμοποιηθούν μεμονωμένα ή συνδυαστικά ως προγνωστικοί δείκτες.

6. Βιβλιογραφία

1. Alarcon, C., Lee, H., Goodarzi, H., Halberg, N., & Tavazoie, S. (2015). N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature*, *519*, 482-485. 10.1038/nature14281
2. Alles, J., Fehlmann, T., Fischer, U., & Backes, C. (2019). An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Research*, *47*(7). 10.1093/nar/gkz097
3. Almeida, M., Reis, R., & Calin, G. (2011). MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutat Res.*, *717*, 1-8. 10.1016/j.mrfmmm.2011.03.009
4. Ambros, V., & Horvitz, H. (1987). The lin-14 locus of *Caenorhabditis elegans* controls the time of expression of specific postembryonic developmental events. *Genes Dev.*, *1*, 398-414. 10.1101/gad.1.4.398
5. Ameres, S., Horwich, M., Hung, J., Xu, J., Ghildiyal, M., & Weng, Z. (2010). Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. *Science*, *328*, 1534-1549. 10.1126/science.1187058
6. Anyalechi, G. E., Hong, J., Kreisel, K., Torrone, E., Boulet, S., Gorwitz, R., Kirkcaldy, R., & Bernstein, K. (2019). Self-reported infertility and associated pelvic inflammatory disease among women of reproductive age — National Health and Nutrition Examination Survey, United States, 2013–2016. *Sex Transm Dis*, *46*(7), 446–451. 10.1097/OLQ.0000000000000996
7. Avidor-Reiss, T., Khire, A., Fishman, E. L., & Jo, K. H. (2015). Atypical centrioles during sexual reproduction. *Frontiers Cell and Development Biology*, *3*(21). PubMed. 10.3389/fcell.2015.00021
8. Babiarz, J., Ruby, J., Wang, Y., Bartel, D., & Blelloch, R. (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev.*, *22*, 2773-2785. 10.1101/gad.1705308

9. Bala, R., Singh, V., Rajender, S., & Singh, K. (2021). Environment, Lifestyle, and Female Infertility. *Reproductive Sciences*, (255), 617-638. 10.1007/s43032-020-00279-3
10. Bedenk, J., Vrtačnik-Bokal, E., & Virant-Klun, I. (2020). The role of anti-Müllerian hormone (AMH) in ovarian disease and infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37, 89-100. 10.1007/s10815-019-01622-7
11. Belguith, I., Dhieb, D., & Turki, M. (2020). Diagnostic value of miR-199a and miR-21 in the plasma of infertile women with dysregulated AMH levels. *Hum Fertil*, 1-12.
12. Benhamed, M., Herbig, U., Ye, T., Dejean, A., & Bischof, O. (2012). Senescence is an endogenous trigger for microRNA-directed transcriptional gene silencing in human cells. *Nat Cell Biol.*, 14, 266-275. 10.1038/ncb2443
13. Benjamin, L. (2004). *GENES VIII*. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.
14. Bosch, E., Broer, S., Griesinger, G., Grynberg, M., Humaidan, P., Kolibianakis, E., Kunicki, M., La Marca, A., Lainas, G., Le Clef, N., Massin, N., Mastenbroek, S., Polyzos, N., Sunkara, S., Timeva, T., Töyli, M., Urbancsek, J., Vermeulen, N., & Broekmans, F. (2020). ESHRE guideline: ovarian stimulation for IVF/ICSI. *Human Reproduction Open*, 1-13. 10.1093/hropen/hoaa009
15. Bottini, S., Hamouda-Tekaya, N., Mategot, R., Zaragosi, L., Audebert, S., & Pisano, S. (2017). Post-transcriptional gene silencing mediated by microRNAs is controlled by nucleoplasmic Sfpq. *Nat Commun.*, 8, 1189. 10.1038/s41467-017-01126-x
16. Brandt, J., Cruz Ithier, M., Rosen, T., & Ashkinadze, E. (2018). Advanced paternal age, infertility, and reproductive risks: A review of the literature. *Prenatal Diagnosis*, 39(2), 81-87. <https://doi.org/10.1002/pd.5402>

17. Braun, J., Truffault, V., Boland, A., Huntzinger, E., Chang, C., & Haas, G. (2012). A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nat Struct Mol Biol.*, *19*, 1324-1331. 10.1038/nsmb.2413
18. Broughton, J., Lovci, M., Huang, J., Yeo, G., & Pasquinelli, A. (2016). Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Mol Cell.*, *64*, 320-333. 10.1016/j.molcel.2016.09.004
19. Buck, A., Perot, J., Chisholm, M., Kumar, D., Tuddenham, L., Cognat, V., Marcinowski, L., Dolken, L., & Pfeffer, S. (2010). Post-transcriptional regulation of miR-27 in murine cytomegalovirus infection. *RNA*, *16*, 307-315.
20. Cernilogar, F., Onorati, M., Kothe, G., Burroughs, A., Parsi, K., & Breiling, A. (2011). Chromatin-associated RNA interference components contribute to transcriptional regulation in *Drosophila*. *Nature*, *480*, 391-395. 10.1038/nature10492
21. Chalfie, M., Horvitz, H., & Sulston, J. (1981). Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. Elegans*. *Cell*, *24*, 59-69. 10.1016/0092-8674(81)90501-8
22. Cheloufi, S., Dos Santos, C., Chong, M., & Hannon, G. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*, *465*, 584-589. 10.1038/nature09092
23. Cho, C. L., & Agarwal, A. (2017). Role of sperm DNA fragmentation in male factor infertility: A systematic review. *Arab Journal of Ourology*, *16*(1), 21-34. NCBI. 10.1016/j.aju.2017.11.002
24. Christie, M., Boland, A., Huntzinger, E., Weichenrieder, O., & Izaurralde, E. (2013). Structure of the PAN3 pseudokinase reveals the basis for interactions with the PAN2 deadenylase and the GW182 proteins. *Mol Cell.*, *51*, 360-373. 10.1016/j.molcel.2013.07.011

25. Daia, J., Chena, Y., Gong, Y., Gua, D., & Chen, J. (2020). Association of microRNA-27a rs895819 polymorphism with the risk of cancer: An updated meta-analysis. *Gene*, 728, 144185. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144185>
26. Davis-Dusenbery, B., & Hata, A. (2010). Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J Biochem.*, 148, 381-392. 10.1093/jb/mvq096
27. Denli, A., Tops, B., Plasterk, R., Ketting, R., & Hannon, G. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432, 231-235. 10.1038/nature03049
28. de Rie, D., Abugessaisa, I., Alam, T., Arner, E., Arner, P., & Ashoor, H. (2017). An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nat Biotechnol.*, 35, 872-878. 10.1038/nbt.3947
29. Dharap, A., Pokrzywa, C., Murali, S., Pandi, G., & Vemuganti, R. (2013). MicroRNA miR-324-3p induces promoter-mediated expression of RelA gene. *PLoS ONE*, 8. 10.1371/journal.pone.0079467
30. Di Pietro, C., Caruso, S., Battaglia, R., Iraci Sareri, M., & La Ferlita, A. (2018). MiR-27a-3p and miR-124-3p, upregulated in endometrium and serum from women affected by Chronic Endometritis, are new potential molecular markers of endometrial receptivity. *American Journal of Reproductive Immunology*, 80(3). doi:10.1111/aji.12858
31. Dosiou, C. (2020). Thyroid and Fertility: Recent Advances. *Thyroid*, 30(4), 479-486. PubMed. 10.1089/thy.2019.0382
32. Drevet, J., Pollet-Villard, X., Levy, R., Saez, F., & Whitfield, M. (2015). Post-testicular sperm maturation, infertility and hypercholesterolaemia. *Asian Journal of Andrology*.

33. Ellwanger, D., Buttner, F., Mewes, H., & Stumpflen, V. (2011). The sufficient minimal set of miRNA seed types. *Bioinformatics*, 27, 1346-1350. 10.1093/bioinformatics/btr149
34. ESHRE. (n.d.). ESHRE. Retrieved February 8, 2022, from <https://www.eshre.eu/>
35. Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*, 18(12), 861-874. PubMed. 10.1038/nrg3074
36. Ferguson, E., Sternberg, P., & Horvitz, H. (1987). A genetic pathway for the specification of the vulval cell lineages of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 326, 259-267.
37. Ferraz-de-Souza, B., Lin, L., & Achermann, J. (2011). Steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) and human disease. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 336(1-2), 198-205. PubMed. 10.1016/j.mce.2010.11.006.
38. Friedlander, M., Lizano, E., Houben, A., Bezdan, D., Banez-Coronel, M., & Kudla, G. (2014). Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. *Genome Biol.*, 15, 57. 10.1186/gb-2014-15-4-r57
39. Fu, G., Brkic, J., Hayder, H., & Peng, C. (2013). MicroRNAs in human placental development and pregnancy complications. *Int J Mol Sci.*, 14, 5519-5544. 10.3390/ijms14035519
40. Fuchs, H., Theuser, M., Wruck, W., & Adjaye, J. (2014). miR-27 negatively regulates pluripotency-associated genes in human embryonal carcinoma cells. *PLoS One*, 9.
41. Ghaedi, H., Tabasinezhad, M., Alipoor, B., Shokri, F., Movafagh, A., Mirfakhraie, R., Omrani, D., & Masotti, A. (2016). The pre-mir-27a variant rs895819 may contribute to type 2 diabetes mellitus susceptibility in an Iranian cohort. *Journal of Endocrinological Investigation*, 39, 1187-1193. 10.1007/s40618-016-0499-4#Sec15

42. Gharagozloo, P., & Aitken, J. (2011). The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Human Reproduction*, *26*(7), 1628-1640. PubMed. 10.1093/humrep/der132
43. Guo, Y., Sun, J., & Lai, D. (2017). Role of microRNAs in premature ovarian insufficiency. *Reprod Biol Endocrinol.*, *15*(1), 1-7.
44. Ha, M., & Kim, V. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *15*, 509-524. 10.1038/nrm3838
45. Han, J., Lee, Y., Yeom, K., Kim, Y., Jin, H., & Kim, V. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.*, *18*, 3016-3027. 10.1101/gad.1262504
46. Havens, M., Reich, A., & Hastings, M. (2014). Drosha promotes splicing of a pre-microRNA-like alternative exon. *PLoS Genet.*, *10*. 10.1371/journal.pgen.1004312
47. Hayes, J., Peruzzi, P., & Lawler, S. (2014). MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med.*, *20*, 460-469. 10.1016/j.molmed.2014.06.005
48. Horvitz, H., & Sulston, J. (1980). Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, *69*, 435-454.
49. Huang, W. (2017). MicroRNAs: biomarkers, diagnostics, and therapeutics. *Methods Mol Biol.*, *1617*, 57-67. 10.1007/978-1-4939-7046-9_4
50. Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet.*, *12*, 99-110. 10.1038/nrg2936
51. Inhorn, M., & Patrizio, P. (2015). Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human Reproduction Update*, *21*(4), 411–426. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv016>

52. Inhorn, M., & Patrizio, P. (2015). Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum. Reprod. Update*, 21(4), 411-426. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv016>
53. Ipsaro, J., & Joshua-Tor, L. (2015). From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. *Nat Struct Mol Biol.*, 22, 22-28. 10.1038/nsmb.2931
54. Jangir, R. N., & Jain, G. C. (2014). Diabetes mellitus induced impairment of male reproductive functions: a review. *Current Diabetes Review*, 10(3), 147-157. PubMed. 10.2174/1573399810666140606111745
55. Jo, M., Shin, S., Jung, S., Kim, E., Song, J., & Hohng, S. (2015). Human Argonaute 2 Has diverse reaction pathways on Target RNAs. *Mol Cell.*, 59, 117-124. 10.1016/j.molcel.2015.04.027
56. Jonas, S., & Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet.*, 16, 421-433. 10.1038/nrg3965
57. Kamalidehghan, B., Habibi, M., & Afjeh, S. (2020). The importance of small non-coding RNAs in human reproduction: a review article. *Appl Clin Genet.*, 13, 1-11.
58. Kang, T., Lu, W., Xu, W., Anderson, L., Bacanamwo, M., Thompson, W., Chen, Y., & Liu, D. (2013). MicroRNA-27 (miR-27) targets prohibitin and impairs adipocyte differentiation and mitochondrial function in human adipose-derived stem cells. *J. Biol. Chem.*, 288, 34394-34402.
59. Kawamata, T., & Tomari, Y. (2010). Making RISC. *Biochem Sci.*, 35, 368-376. 10.1016/j.tibs.2010.03.009
60. Khatun, A., Rahman, S., & Pang, M.-G. (2018). Clinical assessment of the male fertility. *Obstetrics & Gynecology Science*, 61(2), 179-191. <https://doi.org/10.5468/ogs.2018.61.2.179>

61. Khvorova, A., Reynolds, A., & Jayasena, S. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, *115*, 209-216. 10.1016/S0092-8674(03)00801-8
62. Kim, Y., & Kim, V. (2007). Processing of intronic microRNAs. *EMBO J.*, *26*, 775-783. 10.1038/sj.emboj.7601512
63. Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K., Tuschl, T., & Manoharan, M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*, *43*, 685-689. 10.1038/nature04303
64. Krzastek, S., Farhi, J., Gray, M., & Smith, R. (2020). Impact of environmental toxin exposure on male fertility potential. *Translational Andrology and Urology*, *9*(3), 2797–2813. NCBI. 10.21037/tau-20-685
65. Leaver, R. B. (2016). Male infertility: an overview of causes and treatment options. *British Journal of Nursing*, *25*(18). <https://doi.org/10.12968/bjon.2016.25.18.S35>
66. Lee, R., Feinbaum, R., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, *75*, 843-854. 10.1016/0092-8674(93)90529-Y
67. Lee, R., Feinbaum, R., & Ambros, V. (2004). A short history of a short RNA. *Cell*, *116*(2), 89-92. 10.1016/S0092-8674(04)00035-2
68. Li, S., Chan, W., Hu, L., Lai, C., Hsu, C., & Lin, W. (2010). Identification of homologous microRNAs in 56 animal genomes. *Genomics*, *96*, 1-9. 10.1016/j.ygeno.2010.03.009
69. Lis, R., Rowhani-Rahbar, A., & Manhart, L. (2015). *Mycoplasma genitalium* infection and female reproductive tract disease: a meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, *61*(3), 418-426. pubmed. 10.1093/cid/civ312

70. Liu, T., Tang, H., Lang, Y., Liu, M., & Li, X. (2009). MicroRNA-27a functions as an oncogene in gastric adenocarcinoma by targeting prohibitin. *Cancer Letters*, 273(2), 233-242. [10.1016/j.canlet.2008.08.003](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.08.003)
71. Lledo, B., Guerrero, J., Turienzo, A., Ortiz, J., Morales, R., Llacer, J., & Bernabeu, R. (2013). Effect of follicle-stimulating hormone receptor N680S polymorphism on the efficacy of follicle-stimulating hormone stimulation on donor ovarian response. *Pharmacogenetics and Genomics*, 23(5), 262-268.
72. Loke, H., Rainczuk, K., & Dimitriadis, E. (2019). MicroRNA biogenesis machinery is dysregulated in the endometrium of infertile women suggesting a role in receptivity and infertility. *J Histochem Cytochem.*, 67(8), 589-599.
73. Mascarenhas, M., Flaxman, Σ., Boerma, T., Vanderpoel, S., & Stevens, G. (2012). National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Med*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001356>
74. Mashayekhi, S., Saeidi, H., Salehi, Z., Soltanipour, S., & Mirzajani, E. (2018). Effects of miR-27a, miR-196a2 and miR-146a polymorphisms on the risk of breast cancer. *British Journal of Biomedical Science*, 75(2), 76-81. <https://doi.org/10.1080/09674845.2017.1399572>
75. Meijer, H., Smith, E., & Bushell, M. (2014). Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochem Soc Trans.*, 42, 1135-1140. [10.1042/BST20140142](https://doi.org/10.1042/BST20140142)
76. Moridi, A., Roozbeh, N., Yaghoobi, H., Soltani, S., Dashti, S., Shahrahmani, N., & Banaei, M. (2019). Etiology and Risk Factors Associated With Infertility International. *International Journal of Women's Health and Reproduction Sciences*, 7(3), 346-353. [10.15296/ijwhr.2019.57](https://doi.org/10.15296/ijwhr.2019.57)

77. Naji, M., Nekoonam, S., & Aleyasin, A. (2018). Expression of miR-15a, miR-145, and miR-182 in granulosa-lutein cells, follicular fluid, and serum of women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Expression of miR-15a, miR-145, and miR-182 in granulosa-lutein cells, follicular fluid, and serum of women with polycystic ovary syndrome (PCOS).*, 297(1), 221-231.
78. Nishi, K., Nishi, A., Nagasawa, T., & Ui-Tei, K. (2013). Human TNRC6A is an Argonaute-navigator protein for microRNA-mediated gene silencing in the nucleus. *RNA*, 19, 17-35. 10.1261/rna.034769.112
79. Nykanen, A., Haley, B., & Zamore, P. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, 107, 309-321.
80. Okada, C., Yamashita, E., Lee, S., Shibata, S., Katahira, J., & Nakagawa, A. (2009). A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science*, 326, 1275-1279. 10.1126/science.1178705
81. Oliveto, S., Mancino, M., Manfrini, M., & Biffo, S. (2017). Role of microRNAs in translation regulation and cancer. *World J Biol Chem*, 26(1), 45-56. PubMed. 10.4331/wjbc.v8.i1.45
82. Pasquinelli, A., Reinhart, B., Slack, F., Martindale, M., Kuroda, M., & Maller, B. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408, 86-89. 10.1038/35040556
83. Paul, P., Chakraborty, A., Sarkar, D., Langthasa, M., Rahman, M., & Bari, M. (2018). Interplay between miRNAs and human diseases. *J Cell Physiol.*, 233, 2007-2018. 10.1002/jcp.25854
84. Pitchiaya, S., Heinicke, L., Park, J., Cameron, E., & Walter, N. (2017). Resolving subcellular miRNA trafficking and turnover at single-molecule resolution. *Cell Rep.*, 19, 630-642. 10.1016/j.celrep.2017.03.075

85. Quaas, A., & Legro, R. (2019). Pharmacology of medications used for ovarian stimulation. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 33(1), 21-33. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2018.10.002>
86. Rah, H., Chung, K., Ko, K., Kim, E., Kim, J., Sakong, J., Kim, J., Lee, W., & Kim, N. (2017). miR-27a and miR-449b polymorphisms associated with a risk of idiopathic recurrent pregnancy loss. *PLoS ONE*, 12(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177160>
87. Rah, H., Chung, K., Ko, K., Kim, E., Kim, J., Sakong, J., Kim, J., Lee, W., & Kim, N. (2017). miR-27a and miR-449b polymorphisms associated with a risk of idiopathic recurrent pregnancy loss. *PLoS One*, 12(5). doi: 10.1371/journal.pone.0177160
88. Rodríguez, A. G., de la Casa, M., Johnston, S., Gosálvez, J., & Roy, R. (2018). Association of polymorphisms in genes coding for antioxidant enzymes and human male infertility. *Annals of Human Genetics*, 83(1), 63-72. <https://doi.org/10.1111/ahg.12286>
89. Ruby, J., Jan, C., & Bartel, D. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 448, 83-86. 10.1038/nature05983
90. Salas-Huetos, A., James, E., Aston, K., Jenkins, T., Carrell, D., & Yeste, M. (2019). The expression of miRNAs in human ovaries, oocytes, extracellular vesicles, and early embryos: a systematic review. *Cell*, 8(12), 1564.
91. Sharma, N., Baliarsingh, S., & Kaushik, G. (2012). Biochemical association of hyperprolactinemia with hypothyroidism in infertile women. *Clin Lab*, 58, 805-810.
92. Sherwood, L. (2016). *Εισαγωγή στη φυσιολογία του Ανθρώπου- Από τα κύτταρα στα συστήματα* (8η ed.). Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι.Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
93. Steptoe, P., & Edwards, R. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 12(2). PubMed. 10.1016/s0140-6736(78)92957-4

94. Sun, Q., Gu, H., Zeng, Y., Xia, Y., Wang, Y., Jing, Y., Yang, L., & Wang, B. (2010). Hsa-mir-27a genetic variant contributes to gastric cancer susceptibility through affecting miR-27a and target gene expression. *Cancer Sci*, *101*, 2241–2247. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01667.x>
95. Tabrizi, Z., Miraj, S., Tahmasebian, S., & Ghasemi, S. (2020). Plasma Levels of miR-27a, miR-130b, and miR-301a in Polycystic Ovary Syndrome. *Int J Mol Cel Med*, *9*(3), 198-206. 10.22088/IJMCM.BUMS.9.3.198
96. Tanzer, A., & Stadler, P. (2004). Molecular evolution of a microRNA cluster. *J Mol Biol.*, *339*, 327-335. 10.1016/j.jmb.2004.03.06
97. Tersigni, C., Castellani, R., de Waure, C., Fattorossi, A., De Spirito, M., Gasbarrini, A., Scambia, G., & Di Simone, N. (2014). Celiac disease and reproductive disorders: meta-analysis of epidemiologic associations and potential pathogenic mechanisms. *Human Reproduction Update*, *20*(4), 582-593. PubMed. 10.1093/humupd/dmu007
98. Tomassetti, C., & D'Hooghe, T. (2018). Endometriosis and infertility: Insights into the causal link and management strategies. *Clinical Obstetrics & Gynaecology*, *51*, 25-33. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.06.002>
99. Triggianese, P., Perricone, C., Perricone, R., & De Carolis, C. (2014). Prolactin and Natural Killer Cells: Evaluating the Neuroendocrine-immune Axis in Women with Primary Infertility and Recurrent Spontaneous Abortion. *American Journal of Reproductive Immunology*, *73*(1), 56-65. <https://doi.org/10.1111/aji.12335>
100. Tufekci, K., Oner, M., Meuwissen, R., & Genc, S. (2014). The role of microRNAs in human diseases. *Methods Mol Biol.*, *1107*, 33-50. 10.1007/978-1-62703-748-8_3
101. Unuane, D., & Velkeniers, B. (2020). Impact of thyroid disease on fertility and assisted conception. *Clinical Endocrinology & Metabolism*, *34*(4). <https://doi.org/10.1016/j.beem.2020.101378>

102. Vander, A., Sherman, J., Luciano, D., & Τσακόπουλος, Μ. (2011). *Human Physiology-The Mechanisms of Body Function* (8η ed.). Broken Hill Publishers.
103. Vickram, A., Dhama, K., Chakraborty, S., Samad, H. A., Latheef, S., Sharun, K., Khurana, S., Tiwari, R., Bhatt, P., & Chaicumpa, W. (2019). Role of Antisperm Antibodies in Infertility, Pregnancy, and Potential for Contraceptive and Antifertility Vaccine Designs: Research Progress and Pioneering Vision. *Vaccines*, 7(3), 116. NCBI. 10.3390/vaccines7030116
104. Wang, J., Chen, J., & Sen, S. (2016). MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J Cell Physiol.*, 231, 25-30. 10.1002/jcp.25056
105. Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2013). *Μοριακή Βιολογία του Γονιδίου*. Utopia.
106. Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75, 855-862. 10.1016/0092-8674(93)90530-4
107. Xie, M., Li, M., Vilborg, A., Lee, N., Shu, M., & Yartseva, V. (2013). Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA. *Cell*, 155, 1568-1580. 10.1016/j.cell.2013.11.027
108. Xu, W., San Lucas, A., Wang, Z., & Liu, Y. (2014). Identifying microRNA targets in different gene regions. *BMC Bioinformatics*, 15(7), 4. 10.1186/1471-2105-15-S7-S4
109. Yang, J., Maurin, T., Robine, N., Rasmussen, K., Jeffrey, K., & Chandwani, R. (2010). Conserved vertebrate *mir-451* provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 107, 15163-15168. 10.1073/pnas.1006432107
110. Yang, R., Schlehe, B., Hemminki, K., Sutter, C., Bugert, P., Wappenschmidt, B., Volkmann, J., Varon, R., Weber, B., Niederacher, D., Arnold, N., Meindl, A., Bartram,

- C., Schmutzler, R., & Burwinkel, B. (2009). A genetic variant in the pre-miR-27a oncogene is associated with a reduced familial breast cancer risk. *Breast Cancer Research and Treatment*, *121*, 693-702. 10.1007/s10549-009-0633-5
111. Yoda, M., Kawamata, T., Paroo, Z., Ye, X., Iwasaki, S., & Liu, Q. (2010). ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat Struct Mol Biol.*, *17*, 17-23. 10.1038/nsmb.1733
112. Zegers-Hochschild, F., Adamson, D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I., Simpson, J., & van der Poel, S. (2017). The International Glossary on Infertility and Fertility Care. *Human Reproduction*, *32*(9), 1786–1801. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex234>
113. Zehravi, M., Maqbool, M., & Ara, I. (2021). Polycystic ovary syndrome and infertility: an update. *International Journal of Adolescent Medicine and Health*. <https://doi.org/10.1515/ijamh-2021-0073>
114. Zenzes, M. (2000). Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos. *Human Reproduction Update*, *6*(2), 122-131. PubMed. 10.1093/humupd/6.2.122.
115. Zhang, H., Kolb, F., Jaskiewicz, L., Westhof, E., & Filipowicz, W. (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*, *118*, 57-68. 10.1016/j.cell.2004.06.017.
116. Zhang, J., Zhou, W., Liu, Y., Liu, T., Li, C., & Wang, L. (2018). Oncogenic role of microRNA-532-5p in human colorectal cancer via targeting of the 5' UTR of RUNX3. *Oncol Lett*, *15*, 7215-7220. 10.3892/ol.2018.8217.

Παράρτημα 1

Καταγραφή δεδομένων ιστορικού γυναικών που αποτέλεσαν την ομάδα IVF.

Δείγμα	Ηλικία	Διάρκεια Υπογονιμότητας (χρόνια)	Βάρος (kg)	Ύψος (m)	BMI (Kg/m ²)	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	PRL (ng/ml)	AMH (ng/ml)	COC	Ποιοτικά COC	Γονιμοποιημένα ωάρια	Εγκυμοσύνη
Π1	28	1	51	1,6	20	6,6	7,2	3,9	8,6	4	3	3	0
Π4	33	2	70	1,72	24	84,6	42,4	8,4	4,2	-	-	-	-
Π5	42	3	45	1,48	21	8,8	5,1	-	43,5	-	-	-	-
Π6	42	6	72	1,65	26	6,25	4,94	9,4	21,41	5	3	5	0
Π7	31	10	50	1,55	21	5,9	5,7	5,68	2,7	3	2	2	0
Π8	43	2	68	1,6	27	12	5,4	17,8	2,7	1	1	1	0
Π9	25	5	65	1,65	24	9,2	4	-	6,6	3	2	2	0
Π10	42	1	75	1,65	28	8,02	3,83	13,4	5,1	2	1	1	0
Π11	33	1	49	1,53	21	8,5	8,8	7	22,6	5	4	4	1
Π12	39	5	54	1,58	22	8,62	6,26	-	1,4	4	2	3	1
Π13	30	9	57	1,55	24	6,81	4,71	8,9	4	3	2	2	0
Π14	37	4	59	1,68	21	5,8	3,6	-	3,4	4	2	3	0
Π15	45	0	49	1,53	21	24,1	9,1	20,2	20	2	1	1	0
Π22	35	5	53	1,65	19	11,42	6,8	11,7	4,4	4	2	3	1
Π24	38	11	80	1,68	28	5,28	3,98	16,7	1,8	5	3	3	0
Π25	39	2	63	1,73	21	12,3	7,4	11,01	6,9	3	2	2	0
Π26	39	8	85	1,6	33	13,3	1,71	8,73	1,3	2	0	2	0
Π27	40	3	54	1,62	21	11,4	11	17,17	6,3	5	3	4	0
Π29	36	3	75	1,62	29	3,3	2,7	15,58	20,7	9	6	8	0
Π30	37	3	55	1,51	24	8,4	1,6	-	9,7	7	5	4	0
Π31	35	2	60	1,72	20	7,1	5,1	11,7	8,23	12	8	8	1
Π32	40	2	71	1,63	27	3,6	5,2	23,1	19,6	9	7	5	0
Π33	31	2	61	1,65	22	4,8	3,2	12,3	13	6	3	4	0
Π34	35	5	76	1,68	27	7,3	4,2	12,3	16,7	7	4	6	0
Π35	45	3	73	1,6	29	14,8	11,2	7,1	3,1	7	4	6	0

П36	38	7	78	1,67	28	5,4	4,6	-	20,8	4	2	3	0
П37	31	3	60	1,76	19	13,7	7,7	6,91	8,9	6	5	5	1
П38	47	7	60	1,6	23	19,4	9,4	10,5	11,2	4	3	3	0
П39	39	-	58	1,6	23	7,1	5,7	15,5	18	7	5	4	1
П40	33	1	60	1,75	20	6,1	6,4	26	7,12	12	8	10	1
П41	43	3	52	1,6	20	-	-	-	1,2	3	2	2	0
П42	29	4	75	1,71	26	7,3	3,2	7,5	21,2	13	11	10	1
П43	33	4	70	1,57	28	6,2	9	13,7	17,8	9	6	5	0
П44	36	3	60	1,55	25	8,6	8	17	8,4	5	3	2	0
П45	32	6	60	1,6	23	4,11	5,57	15,68	22,2	9	6	5	0
П47	29	1	45	1,62	17	8,4	5,8	10,2	37,3	9	6	5	0
П49	35	4	58	1,75	19	5,1	2,8	12,2	17,6	10	8	10	0
П50	33	4	55	1,72	19	6,1	2,1	16,1	6,5	8	6	5	0
П54	44	1	74	1,6	29	4,1	2,8	11,1	4	6	5	4	1
П55	36	7	55	1,6	21	6,02	3,37	8,84	4	5	3	4	0
П56	37	10	53	1,6	21	11,9	14,8	-	3,1	5	5	5	0
П57	27	7	56	1,8	17	6,35	3,13	4,94	4,9	4	2	3	0
П58	30	7	53	1,69	19	10	4,5	-	3	9	8	6	1
П60	45	4	61	1,7	21	9,4	3,2	22,6	3,9	4	4	3	0
П61	38	4	63	1,6	25	13	-	-	7,2	5	4	4	0
П62	30	5	54	1,63	20	5,46	4,65	5,96	25,8	11	7	6	0
П63	35	3	72	1,65	26	4,3	5,5	28,3	19	9	6	7	1
П64	37	8	55	1,56	23	4,8	4,1	9	24,7	9	6	8	0
П65	27	5	50	1,61	19	3,6	8,4	29	21	6	4	4	0
П66	42	10	63	1,65	23	6	4,1	30	3	4	2	3	0
П67	37	10	53	1,7	18	7,89	9,38	10,32	10,5	10	7	9	0
П68	46	0	50	1,56	21	3,9	3,5	0,16	15	6	4	4	0
П69	32	2	50	1,61	19	6,3	6,6	17	6,63	8	6	6	0
П71	33	3	50	1,69	18	8,18	3,99	14,7	2,75	8	5	7	0
П72	30	3	65	1,65	24	6,7	6,3	18,7	20,1	17	15	14	0

Π73	37	4	55	1,63	21	6,8	4,4	3,1	6,1	8	5	6	0
Π74	45	1	65	1,65	24	14,6	5,4	8,2	20	3	3	3	0
Π76	35	5	52	1,65	19	7,32	4,99	78,99	16,7	6	5	4	0
Π78	35	11	119	1,6	46	7,1	2,3	5,4	4,6	1	1	1	0
Π79	44	2	55	1,65	20	7,4	2,2	-	1,2	1	1	0	0
Π81	33	2	85	1,7	29	9,05	6,39	3,65	18,5	4	3	3	0
Π84	44	1	65	1,7	22	6,22	6,5	16,9	13,7	4	3	3	0
Π89	40	8	60	1,7	21	13,58	4,73	10,06	24	2	2	2	0
Π99	43	3	80	1,8	25	9,3	2,8	5,5	2,7	6	5	4	0
Π100	39	1	78	1,78	25	5,1	2,7	21	6	5	3	3	0
Π102	30	9	70	1,62	27	6,2	3,9	7,7	1	5	4	4	0
Π103	41	7	64	1,67	23	4,89	5,17	6,7	1,7	5	3	2	0
Π104	36	4	84	1,74	28	10,8	3,5	15,9	2,1	8	4	6	0
Π105	41	7	77	1,6	30	5,2	4,2	13,5	18,6	8	6	6	0
Π106	28	4	66	1,53	28	6,1	3,7	12,6	28	7	5	4	0
Π107	37	3	70	1,63	26	6,8	4,2	9,6	4	2	2	1	0
Π108	40	7	97	1,67	35	4,08	1,91	26,27	18,6	8	6	6	0
Π109	41	3	80	1,64	30	10,3	3,3	8,1	5,1	3	2	2	0

- - → ελλιπή δεδομένα,
- 0 (εγκυμοσύνη) → αποτυχία επίτευξης εγκυμοσύνης
- 1 (εγκυμοσύνη) → επίτευξη εγκυμοσύνης

Παράρτημα 2

Δεδομένα για το γονότυπο κάθε δείγματος ύστερα από την ανίχνευση του πολυμορφισμού rs895819 (mir-27a A>G).

Δείγμα (Ομάδα IVF)	Πολυμορφισμός	Δείγμα (Ομάδα Ελέγχου)	Πολυμορφισμός
Π1	2	1	3
Π4	1	2	3
Π5	1	3	3
Π6	1	4	2
Π7	2	5	2
Π8	2	6	3
Π9	2	7	3
Π10	2	8	3
Π11	2	9	2
Π12	2	10	3
Π13	1	11	2
Π14	1	12	3
Π15	1	13	3
Π22	2	14	3
Π24	1	15	3
Π25	2	16	3
Π26	2	17	2
Π27	3	18	2
Π29	1	19	2
Π30	1	192	3
Π31	1	193	3

П32	2	194	3
П33	2	195	3
П34	3	196	3
П35	2	197	2
П36	1	198	2
П37	2	199	3
П38	1	201	3
П39	1	202	3
П40	2	203	3
П41	1	204	2
П42	2	205	1
П43	2	206	2
П44	2	207	2
П45	2	208	2
П47	2	209	2
П49	2	211	2
П50	2	215	2
П54	2	216	3
П55	2	217	2
П56	2	218	3
П57	2	219	3
П58	1	220	2
П60	2	221	2
П61	2	222	2
П62	2	224	2
П63	2	225	2
П64	1	226	3

П65	2	228	2
П66	2	229	2
П67	2	230	2
П68	1	231	2
П69	2	232	3
П71	2	233	1
П72	2	234	1
П73	2	235	3
П74	2	236	2
П76	3	237	2
П78	3	238	2
П79	2	239	2
П81	2	240	2
П84	1	241	2
П89	2	242	2
П99	2	243	1
П100	2	244	2
П102	1	245	2
П103	2	246	1
П104	2	247	2
П105	2	258	2
П106	2	259	2
П107	1	260	3
П108	2	273	3
П109	1	278	2
		279	2
		283	3

		287	3
		292	2
		293	2
		294	2
		297	2
		299	3
		300	3
		317	3
		318	3
		319	3
		320	3
		321	2
		322	3
		323	2
		324	3
		325	3
		326	3
		327	3
		328	2
		329	2
		330	3
		331	2
		332	3
		333	3
		334	3
		K57	2
		K58	3

		K60	3
		N3	2
		N4	2
		N5	2
		N7	2

- 1 → CC (GG)
- 2 → TT (AA)
- 3 → TC (AG)