



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ-ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ»**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ:

**«Συσχέτιση της έκφρασης των miRNAs με τις καθ' έξιν αποβολές:
Συστηματική Ανασκόπηση»**

ΜΑΡΙΑ-ΜΑΡΚΕΛΛΑ ΠΑΤΡΩΝΙΑ

ΑΘΗΝΑ, 2024

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Αναπαραγωγική-Αναγεννητική Ιατρική» της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η ανάθεση του θέματος της εργασίας έγινε από την επιβλέπουσα καθηγήτρια κ. Μαυρογιάννη Δέσποινα, τον Οκτώβρη του 2023. Για την εκπόνηση της εργασίας πραγματοποιήθηκε συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, που έχει δημοσιευθεί έως σήμερα και σχετίζεται με το θέμα της εργασίας.

Θα ήθελα, καταρχάς, να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια κ. Μαυρογιάννη Δέσποινα για την εμπιστοσύνη, που μου έδειξε με την ανάθεση αυτής της εργασίας, για τη συνεχή άριστη καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές και την αδιάκοπη υποστήριξή της. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω από καρδιάς τους υποψήφιους διδάκτορες της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ Χερουβείμ Παναγιώτη και Κουβουτσάκη Κωνσταντίνα για την εξαιρετική συνεργασία και όλες τις εποικοδομητικές υποδείξεις και συμβουλές κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.

Τέλος, οφείλω να εκφράσω τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου στην οικογένεια και τους φίλους μου για την πολύτιμη υποστήριξη, που έδειξαν κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου στην Ιατρική Σχολή του ΕΚΠΑ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1 ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA.....	6
1.2 ΤΑ ΜΙΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ microRNA.....	7
1.2.1 Η βιογένεση των microRNA.....	7
1.2.2 Μηχανισμός δράσης.....	8
1.2.3 Χρήση ως βιοδείκτες.....	9
1.3 ΚΑΘ’ ΕΞΙΝ ΑΠΟΒΟΛΕΣ.....	10
1.3.1 Γενετικοί παράγοντες.....	10
1.3.2 Ανατομικές παραλλαγές.....	12
1.3.3 Μεταβολικοί και ενδοκρινικοί παράγοντες.....	13
1.3.4 Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο.....	14
1.3.5 Συγγενείς θρομβοφιλίες.....	15
1.3.6 Ιδιοπαθή αίτια.....	16
1.4 MicroRNA ΚΑΙ ΚΑΘ’ ΕΞΙΝ ΑΠΟΒΟΛΕΣ.....	16
1.4.1 MicroRNA και εμφύτευση.....	16
1.4.2 MicroRNA και κυτταρική διαφοροποίηση της βλαστοκύστης.....	17
1.4.3 MicroRNA και τροφοβλάστη.....	18
1.5 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας.....	19
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	19
2.1 Αναζήτηση βιβλιογραφίας.....	19
2.2 Κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού.....	20
2.3 Εξαγωγή δεδομένων.....	21
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	22
3.1 Χαρακτηριστικά των επιλεγμένων μελετών.....	22
3.2 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα μελετών.....	32
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	39
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	42

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι καθ' έξιν αποβολές αποτελούν μια σημαντική επιπλοκή της κύησης, που απασχολεί το 2-6% των ζευγαριών, που προσπαθούν να τεκνοποιήσουν. Επί του παρόντος, σε ένα ποσοστό 50% των περιστατικών, τα αίτια παραμένουν άγνωστα, καθώς δεν έχει βρεθεί αξιόπιστος τρόπος πρόγνωσης, διάγνωσης, αλλά και θεραπείας τους. Τα miRNA διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πλήθος βιολογικών διαδικασιών και η απορρύθμιση της έκφρασής τους μπορεί να έχει σοβαρές επιπτώσεις για τις διαδικασίες αυτές. Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο να συσχετίσει την έκφραση των miRNA με τις καθ' έξιν αποβολές, μέσω συστηματική ανασκόπηση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας και να εξετάσει τον πιθανό ρόλος τους ως βιοδείκτες. Τα αποτελέσματα της ανασκόπησης δείχνουν την άμεση συσχέτιση της διαφοροποίησης της έκφρασης ορισμένων miRNA, μεταξύ των οποίων τα miR-155-5p, miR-21, miR-146a, miR-184, miR-100-5p, miR-23a-3p και miR-126 με ένα σημαντικό αριθμό καθ' έξιν αποβολών. Τα περισσότερα από τα παραπάνω miRNA φαίνεται να μπορούν να εντοπιστούν στον ιστό του αίματος, γεγονός που προτείνει ότι η ανίχνευση της έκφρασής τους στο αίμα των γυναικών έχει προοπτικές να χρησιμοποιηθεί ως μη επεμβατικός προγνωστικός και διαγνωστικός βιοδείκτης των καθ' έξιν αποβολών, που έχουν ως τώρα αδιάγνωστα αίτια.

ABSTRACT

Recurrent Pregnancy loss (RPL) is a major pregnancy complication, affecting 2-6% of couples trying to conceive. Currently, the cause remains unknown, in 50% of cases, as no reliable way of prognosis, diagnosis or treatment has been found. MiRNAs play an important role in multitude of biological processes and the dysregulation of their expression may have a serious impact on these processes. The present study aims to associate the expression of miRNAs with RPL, through a systematic review of the present literature and to examine their potential role as biomarkers. The results show the direct correlation of the differently expressed miRNAs, including miR-155-5p, miR-21, miR-146a, miR-184, miR-100-5p, miR-23a-3p and miR-126, with a significant number of RPL. Most of the above miRNAs appear to be detectable in blood samples, which suggests that detection of their expression in women's blood has the potential to be used as a non-invasive prognostic and diagnostic biomarker of RPL, with so far undiagnosed causes.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA

Ο όρος μη κωδικοποιητικό RNA ή ncRNA (non-coding RNA) χρησιμοποιείται για τα μόρια RNA τα οποία δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνη. Τα ncRNA είναι ευρέως διαδεδομένα στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, καθώς πιστεύεται ότι παίζουν το ρόλο ρυθμιστών της γονιδιακής έκφρασης για το 30% έως 70% των γονιδίων τους [B]. Τα ρυθμιστικά RNA χαρακτηρίζονται με βάση το μέγεθος (μικρά και μεγάλα), την προέλευση και τους μηχανισμούς από τους οποίους προκύπτουν. Το ανθρώπινο γονιδίωμα παράγει μη κωδικά RNA της τάξης των 10.000, τα οποία χρησιμεύουν ως δομικά, ρυθμιστικά και ενζυμικά συστατικά για μια ποικιλία διαδικασιών του κυττάρου, όπως και οι πρωτεΐνες [A]. Έτσι, ο βιολογικός τους ρόλος είναι ζωτικής σημασίας όσον αφορά την ανάπτυξη και φυσιολογία των οργανισμών, ενώ εμπλέκονται και στην εμφάνιση διαφόρων ασθενειών [1].

Το 1965 δημοσιεύθηκε το πρώτο μη κωδικοποιητικό μόριο RNA, ένα μόριο tRNA, με βιολογικό ρόλο τη μεταφορά του αμινοξέως αλανίνη στα ριβοσώματα κατά την πρωτεϊνοσύνθεση [2]. Αργότερα, δημοσιεύθηκαν και τα μόρια ριβοσωμικού RNA ή rRNA, τα οποία μαζί με τα μόρια tRNA είναι υπεύθυνα για την ανάγνωση του γενετικού κώδικα και τη σύνθεση των πρωτεϊνών [A]. Στα μη κωδικοποιητικά μόρια RNA ανήκουν και τα μικρά μη κωδικοποιητικά RNA, που περιλαμβάνουν τα microRNA (miRNA) και τα μικρά παρεμβαλλόμενα RNA (siRNA), που είναι οι κύριοι ρυθμιστές της ευκαρυωτικής γονιδιωματικής έκφρασης, τα μικρά πυρηνικά RNA (snRNA) που συμμετέχουν στη διαδικασία συρραφής του RNA, τα μικρά πυρηνισκικά RNA (snoRNA) που τροποποιούν το rRNA και τα ribi-αλληλεπιδρώντα RNA (riRNA) που προστατεύουν τις γαμετικές σειρές από μεταθετά στοιχεία.

Μεγάλη έμφαση έχει, επίσης, δοθεί και στην έρευνα των μεγάλων μορίων RNA ή lncRNA (long non-coding RNA). Με βάση το πρωτόκολλο καθορισμού των μικρών μορίων μη κωδικοποιητικού RNA, τα lncRNA ορίζονται ως εκείνα που έχουν μήκος μεγαλύτερο των 200 νουκλεοτιδίων [3]. Τα lncRNA εμπλέκονται τόσο στη μεταγραφή, όσο και στη τη συρραφή και μετάφραση των mRNA. Στα lncRNA συγκαταλέγονται μόρια lincRNA (long intergenic non-coding RNA), όπως το HOTAIR που στον άνθρωπο ανήκει στην ομάδα HoxC και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων HoxC σε άλλα χρωμοσώματα [1,6-8]. Έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση του HOTAIR αυξάνεται σε ορισμένους τύπους καρκίνου [B]. Άλλο σημαντικό και γνωστό για το ρόλο του lncRNA είναι το RNA Xist, που εμπλέκεται στην απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος στα θηλαστικά, συμβάλλοντας έτσι στην αντιστάθμιση δόσης (dose compensation) στα θηλυκά άτομα [1,4,5,B].

1.2 ΤΑ ΜΙΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ microRNA

Τα microRNA (miRNA) είναι μικρά μη κωδικά μόρια RNA μήκους περίπου 22 νουκλεοτιδίων (μπορεί να κυμαίνονται από 19 ως 25 νουκλεοτίδια). Στους ζωικούς οργανισμούς ρυθμίζουν τη σίγαση γονιδίων, ελέγχοντας τη μεταγραφή των mRNA σε πρωτεΐνες [9]. Υπολογίζεται ότι τα miRNA ελέγχουν την έκφραση του 60% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες στα θηλαστικά [16], ενώ στο ανθρώπινο σώμα παράγονται περισσότερα από 1.000 miRNA, που ρυθμίζουν τουλάχιστον το ένα τρίτο όλων των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες [B]. Τα μόρια αυτά συμμετέχουν σε διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, της ανάπτυξης του μεταβολισμού και της απόπτωσης. Ορισμένα miRNA ρυθμίζουν μεμονωμένους στόχους, ενώ σε άλλες περιπτώσεις διαφορετικοί τύποι miRNA δρουν συνεργατικά, ρυθμίζοντας τα επίπεδα έκφρασης χιλιάδων γονιδίων σε μία διαδικασία [10,11]. Επομένως, λόγω του σημαντικού ρόλου τους στη σύνθεση των πρωτεϊνών, οποιαδήποτε αλλαγή στην έκφραση ή την αλληλουχία τους μπορεί να είναι καθοριστική για την εμφάνιση γενετικών ασθενειών στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου [12].

1.2.1 Η βιογένεση των microRNA

Τα miRNA προέρχονται από πρόδρομα μόρια RNA, τα πρώτο-μικροRNA (pri-miRNA), δηλαδή μόρια RNA μεγαλύτερου μήκους από το τελικό miRNA, με χαρακτηριστική δομή, η οποία συμβάλει στην ταυτοποίηση αυτών και των γονιδίων-στόχων τους. Τα pri-miRNA υφίστανται δύο αντιδράσεις τεμαχισμού, από δύο διαφορετικά ένζυμα RNAase, μέσω των οποίων προκύπτουν τελικά ένα ή δύο μόρια ώριμου miRNA [B]. Πρόκειται για τα ένζυμα Drosha και Dicer. Το ένζυμο Dicer είναι απαραίτητο για την παραγωγή των miRNA, ενώ συναντάται και στη βιογένεση των siRNA [13]. Αντίθετα, το Drosha έχει εξειδικευμένη δράση, που αφορά την επεξεργασία των miRNA [14]. Τόσο το Dicer όσο και το Drosha αναγνωρίζουν και κόβουν το RNA βάσει της στερεοδιάταξης και όχι βάσει της αλληλουχίας του.

Κατά την πρώτη αντίδραση το ένζυμο Drosha (ανήκει στην οικογένεια των ενζύμων RNAase III) αποκόβει με δύο τομές στο pri-miRNA, εκείνο το μέρος του που έχει δομή βραχίονα-θηλιάς [14]. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα στον πυρήνα του κυττάρου, όπου εντοπίζεται το Drosha, σε συνεργασία με ένα πρωτεϊνικό Σύμπλοκο Μικροεπεξεργασίας, το Pasha ή το DGCR8, ανάλογα με τον οργανισμό [B]. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται το προ-μικροRNA (pre-miRNA), το οποίο έχει μήκος περίπου 65-70 νουκλεοτίδια. Τα pre-miRNA μπορεί να κωδικοποιούνται από οποιοδήποτε τμήμα του προϊόντος μεταγραφής, δηλαδή μπορεί να βρίσκονται στο εσωτερικό κωδικών περιοχών, περιοχών οδηγών ή εντός εσωνίων [B].

Ο βραχίονας του pre-miRNA είναι μια δίκλωνη δομή, μήκους 33 περίπου ζευγών βάσεων RNA, ενώ στην κορυφή του βραχίονα, η θηλιά έχει μήκος περίπου 10 νουκλεοτιδίων. Στα δύο

άκρα της δομής βραχίονα-θηλιάς εντοπίζονται μονόκλωνα τμήματα RNA, χωρίς σημαντικό βαθμό δευτεροταγούς δομής. Τα σημεία συμβολής των μονόκλωνων τμημάτων με τη δομή βραχίονα-θηλιάς είναι αυτά που καθορίζουν την εξειδικευμένη δράση του Drosha κατά τη θραύση, καθώς σε αυτά θα κόψει το pri-miRNA [14].

Μετά την πρώτη θραύση, το pre-miRNA, που προέκυψε εξάγεται στο κυτταρόπλασμα. Εκεί λαμβάνει χώρα η δεύτερη θραύση, που πραγματοποιείται με τη δράση του ενζύμου Dicer. Το Dicer αποτελείται από τρεις λειτουργικές περιοχές, δύο με ενεργότητα RNAase III και μία πρωτεΐνη δέσμευσης, την PAZ. Η περιοχή PAZ συνδέεται με το 3' άκρο του pre-miRNA με τέτοιο τρόπο, ώστε τα ενεργά κέντρα των δύο περιοχών με ενεργότητα RNAase να τοποθετούνται 22 νουκλεοτίδια μακριά από το 3' άκρο [13]. Τα ενεργά κέντρα των περιοχών με ενεργότητα RNAase, στη συνέχεια, κόβουν τις αλυσίδες του pre-miRNA και έτσι προκύπτει το ώριμο miRNA. Έχει αποδειχθεί ότι από ένα pre-miRNA μπορούν να προκύψουν δύο μόρια ώριμου miRNA, τα οποία έχουν το κάθε ένα τη δική τους διαφορετική ομάδα γονιδίων στόχων [B].

1.2.2 Μηχανισμός δράσης

Τα miRNA είναι μία από τις τρεις ομάδες μικρών μη κωδικών RNA, μαζί με τα siRNA και piwiRNA, που εκτελούν RNA παρεμβολή ή RNAi (RNA interference). Κατά την RNA παρεμβολή τα ρυθμιστικά RNA χρησιμεύουν ως RNA οδηγοί (guide RNA), αναγνωρίζοντας, μέσω ζευγαρώματος βάσεων, άλλα RNA στο κύτταρο (RNA στόχοι), με τα οποία συνδέονται [A].

Τα miRNA, ως ρυθμιστές, μπορούν να δράσουν σε ώριμα mRNA στόχους, αποικοδομώντας τα ή καταστέλλοντας τη μετάφρασή τους [15]. Μόλις το miRNA παραχθεί, συνδέεται με μία ομάδα πρωτεϊνών, σχηματίζοντας το σύμπλοκο επαγόμενης σίγασης από το RNA, RISC (RNA-induced silencing complex) [18,19]. Ακολούθως, το RISC κατευθύνεται σε ένα mRNA στόχο και το miRNA συνδέεται με αυτό, σύμφωνα με τη συμπληρωματικότητα των βάσεων τους. Εάν η σύνδεση miRNA-mRNA είναι εκτεταμένη, το mRNA αποικοδομείται [17]. Στη συνέχεια, το RISC με το miRNA, παραμένοντας συνδεδεμένα μεταξύ τους, απελευθερώνονται και αναζητούν άλλο mRNA με συμπληρωματική αλληλουχία με το miRNA [18,19]. Με αυτόν τον τρόπο ένα μόνο miRNA μπορεί να αποικοδομήσει πολλά συμπληρωματικά του mRNA.

Σε πολλούς οργανισμούς, ωστόσο, όπως στον άνθρωπο, το RISC σπάνια έχει ρόλο ενζύμου θραύσης. Αν η σύνδεση miRNA-mRNA δεν επεκτείνεται πέρα από μια αρχική περιοχή μήκους 7 νουκλεοτιδίων κοντά στο 5' άκρο του miRNA, το ζευγάρι των βάσεων θεωρείται λιγότερο εκτεταμένο. Σε αυτήν την περίπτωση, για τη σίγαση του γονιδίου στόχου εκτελείται ο μηχανισμός καταστολής της μετάφρασης. Το ζευγάρι των βάσεων σε αυτή τη μικρή περιοχή θα προκαλέσει αναστολή της μετάφρασης και αποσταθεροποίηση του

mRNA. Το mRNA τελικά μεταφέρεται σε ένα Ρ-σωμάτιο του κυττάρου, όπου απομακρύνεται από το ριβόσωμα της μετάφρασης [20].

Οι παραπάνω τρόποι ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, σε πολλούς οργανισμούς, όπως ο άνθρωπος, συμβαίνουν ταυτόχρονα. Η έκφραση ενός γονιδίου μπορεί να μειώνεται συνδυαστικά από την καταστροφή, ως ένα βαθμό, των mRNA που παράγονται από τη μεταγραφή του και την μερική παρεμπόδιση της μετάφρασης του σε πρωτεΐνη. Έτσι, τα κύτταρα διαθέτουν ένα σημαντικό αριθμό διαφορετικών ρυθμιστών για ένα συνδυαστικό έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων τους.

1.2.3 Χρήση ως βιοδείκτες

Πολυάριθμες μελέτες έχουν προτείνει συγκεκριμένους τύπους miRNA ως χρήσιμους βιοδείκτες για τη διάγνωση ασθενειών στον άνθρωπο. Εφόσον εμπλέκονται στη ρύθμιση μιας σειράς αναπτυξιακών και φυσιολογικών διαδικασιών σε διαφορετικούς ιστούς και κυτταρικούς τύπους, η απορρύθμιση της έκφρασής τους μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στην υγεία των οργανισμών, συμπεριλαμβανομένου της εμφάνισης καρκίνου [21]. Τα miRNAs εντοπίζονται και στον ορό, το αίμα και το πλάσμα των ασθενών σε περιπτώσεις ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, μελανώματος, καρκίνου του παγκρέατος και άλλους τύπους καρκίνου [24,25,26], αλλά και σε περιπτώσεις ιικών λοιμώξεων, διαταραχών του νευρικού συστήματος και καρδιαγγειακών δυσλειτουργιών [27,28,29]. Έτσι, η ανάλυση της έκφρασής τους αποτελεί πολύτιμη διαγνωστική στρατηγική [21].

Τα miRNA χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά ως βιοδείκτες στο ορό για την εξέταση ασθενών με έναν τύπο καρκίνου, το μεγάλο λέμφωμα Β-κυττάρων [22]. Στους περισσότερους τύπους καρκίνου παρατηρείται μείωση των επιπέδων πολλών ειδών miRNA, κάτι που υποδεικνύει την ογκοκατασταλτική τους δράση [B,9]. Η απορρύθμιση των miRNA στον καρκίνο οφείλεται σε επιγενετικές αλλαγές ή γονιδιακές μεταλλάξεις, κάτι που επηρεάζει την παραγωγή του pri-miRNA, την ωρίμανσή του και την αλληλεπίδραση του ώριμου miRNA με τα mRNA στόχους [9]. Γνωστό παράδειγμα αποτελεί η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, που είναι στενά συνδεδεμένη με εξαλείψεις σε μια περιοχή του χρωμοσώματος 13. Στην περιοχή αυτή εδράζονται τα γονίδια miR-15 και miR-16, των οποίων τα αντίστοιχα miRNA επάγουν την απόπτωση των κυττάρων. Όταν αυτά τα δύο γονίδια εξαλείφονται, καταστέλλεται η ικανότητα απόπτωσης των κυττάρων και διευκολύνεται η δημιουργία όγκων στους ιστούς [23].

Πολλοί τύποι miRNA είναι, επίσης, υπεύθυνοι για τη σωστή λειτουργία του νευρικού συστήματος. Το 70% περίπου των miRNA εκφράζονται, μεταξύ άλλων οργάνων, στον εγκέφαλο [30]. Η απορρύθμιση της έκφρασης των miRNA έχει περιγραφεί σε πολλές νευρολογικές διαταραχές, όπως στο σύνδρομο Down, η νόσος Alzheimer και Parkinson [31,32]. Η πρωτεΐνη FMR1, γνωστή ως πρωτεΐνη νοητικής καθυστέρησης από το εύθραυστο Χ (Fragile X Mental Retardation Protein, FMRP1) αλληλεπιδρά με ένα σημαντικό αριθμό

miRNA, που χρησιμεύουν στη νευρική πλαστικότητα [9]. Μεταλλάξεις που προκαλούν απώλεια της FMRP1 οδηγούν σε αναπτυξιακές δυσλειτουργίες και νοητική υστέρηση τους ασθενείς [33].

Επιπλέον, πολλά δεδομένα αναφέρουν τη συσχέτιση των miRNA με τις καρδιαγγειακές δυσλειτουργίες. Το miR-1, το συχνότερο miRNA στα καρδιακά μυϊκά κύτταρα, φαίνεται να εμπλέκεται στην εμφάνιση αρρυθμιών, μειώνοντας την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα κανάλια ιόντων στα καρδιακά μυϊκά κύτταρα [36, 37].

Τέλος, τα miRNA έχουν συσχετιστεί με ορισμένες ιικές λοιμώξεις, συμπεριλαμβανομένου του HBV, του HCV, του HIV και του EBV. Στις περιπτώσεις αυτές, τα miRNA ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό του ιού και περιορίζουν την μόλυνση [38-40], όπως συμβαίνει στην ηπατίτιδα Β, όπου τα miR-199a και miR-210 μειώνουν σημαντικά τον πολλαπλασιασμό του HBV [41]. Αντίστροφα, στην λοίμωξη από τον HCV της ηπατίτιδας C, το miR-122 διευκολύνει την αντιγραφή του ιικού RNA, ενώ η απουσία του miR-122 οδηγεί σε μείωση του αριθμού των αντιγράφων του ιικού RNA στο κύτταρο-ξενιστή [38].

1.3 ΚΑΘ' ΕΞΙΝ ΑΠΟΒΟΛΕΣ

Σύμφωνα με το Βρετανικό Κολλέγιο Μαιευτήρων-Γυναικολόγων, ο όρος αποβολή αναφέρεται στην αυτόματη απώλεια κύησης, πριν το έμβρυο καταστεί βιώσιμο, δηλαδή πριν τις 24 εβδομάδες κύησης. Όταν συμβούν δύο ή περισσότερες συνεχόμενες αποβολές, τότε πλέον πρόκειται για καθ' έξιν αποβολές, βάσει της Αμερικανικής Εταιρίας Αναπαραγωγικής Ιατρικής (American Society of Reproductive Medicine).

Οι καθ' έξιν αποβολές είναι, πλέον, συχνό φαινόμενο, που απασχολεί το 2-6% των ζευγαριών που προσπαθούν να τεκνοποιήσουν [42], με τις καθ' έξιν αποβολές πρώτο τριμήνου να απαντώνται σε περίπου 1% των διαγνωσμένων κυήσεων [43]. Παράγοντες αυξημένου κινδύνου για αποβολή αποτελούν οι ενδοκρινικές δυσλειτουργίες, όπως το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, θρομβοφιλίες, οι αυτοάνοσες παθήσεις, γενετικοί παράγοντες, όπως χρωμοσωμικές ανωμαλίες του εμβρύου και ορισμένες λοιμώξεις. Παρόλα' αυτά σε ένα ποσοστό 50% των γυναικών που βιώνουν καθ' έξιν αποβολές τα αίτια παραμένουν άγνωστα και χαρακτηρίζονται ως ιδιοπαθείς [44].

1.3.1 Γενετικοί παράγοντες

Οι γενετικοί παράγοντες αποτελούν το συχνότερο αίτιο για τις καθ' έξιν αποβολές, αγγίζοντας το 30-50% των περιστατικών [45]. Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες μπορεί να κληρονομικές, δηλαδή να προέρχονται από τους γονείς ή να προκύπτουν de novo, δηλαδή από λάθη που συμβαίνουν κατά τη μειωτική διαίρεση των γαμετών, κυρίως των ωαρίων [46]. Η ηλικία της μητέρας αποτελεί έναν σοβαρό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση de novo

χρωμοσωμικών ανωμαλιών, ενώ η ηλικία του πατέρα δεν έχει ακόμα συσχετιστεί με αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης χρωμοσωμικών ανωμαλιών [47].

Οι συχνότερες κληρονομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, που συσχετίζονται με τις καθ' έξιν αποβολές είναι οι ισοζυγισμένες μετατοπίσεις (balanced translocation), οι οποίες είναι αμοιβαίες ή μετατοπίσεις κατά Robertson. Στην πρώτη περίπτωση γίνεται αμοιβαία ανταλλαγή τμημάτων μεταξύ δύο μη ομολόγων χρωμοσωμάτων, ενώ στη δεύτερη περίπτωση παρατηρείται συνένωση των μακρών άκρων από δύο ακροκεντρικά χρωμοσώματα [47]. Και στις δύο περιπτώσεις οι γονείς μπορεί να μην εμφανίζουν συμπτώματα, δηλαδή η μετάθεση να μην εκφράζεται στον φαινότυπο τους. Το έμβρυο που προκύπτει μπορεί να μην κληρονομήσει τα χρωμοσώματα που φέρουν τη χρωμοσωμική ανωμαλία και να είναι φυσιολογικό ή να φέρει τις συγκεκριμένες δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες και να οδηγηθεί σε αποβολή, λόγω φυσικής επιλογής [46].

Οι ισοζυγισμένες μεταθέσεις εμφανίζονται στο 2-4% των περιστατικών καθ' έξιν αποβολών και μπορούν να ανιχνευθούν με την εξέταση καρυότυπου από το περιφερικό αίμα των γονέων [48]. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε έρευνα που διεξάχθηκε στην Ιαπωνία, εξετάστηκαν 2.382 ζευγάρια, που εμφάνισαν καθ' έξιν αποβολές. Από αυτά το 5,4% διαγνώστηκαν με παθολογικό καρυότυπο για έναν από τους δύο γονείς, με το 3,6% αυτών να εμφανίζει αμοιβαία μετάθεση και το υπόλοιπο 1,4% μετατόπιση κατά Robertson [49].

Όσον αφορά τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες που προκύπτουν de novo έχουν συσχετιστεί κυρίως με σποραδικές απώλειες κήσης, αλλά υποστηρίζεται ότι μπορούν να εμφανιστούν και σε ορισμένες περιπτώσεις επαναλαμβανόμενων αποβολών. Οι ανωμαλίες αυτές αφορούν κυρίως τρισωμίες στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα, με συχνότερη την τρισωμία 16 [47]. Σε λιγότερο συχνές περιπτώσεις οι ανευπλοειδία του εμβρύου μπορεί να πρόκειται για μία πολυπλοειδία, δομική χρωμοσωμική ανωμαλία και να εμφανίζει μωσαϊκισμό [50]. Για τη διάγνωση αυτών των χρωμοσωμικών ανωμαλιών συστήνεται ο συμβατικός καρυότυπος, κατά τον οποίο ελέγχεται ο αριθμός, η δομή και το μέγεθος των χρωμοσωμάτων του εμβρύου [45,47]. Συστήνεται επίσης και η διάγνωση με τη μέθοδο ανίχνευσης μικροσυστοιχιών microarray-CGH, που επιτρέπει την αξιολόγηση των αλλαγών των αντιγράφων στην αλληλουχία του γενετικού υλικού, οι οποίες σχετίζονται με χρωμοσωμικές ανωμαλίες και πολυμορφισμούς στο έμβρυο [51]. Οι παραπάνω διαγνωστικές μέθοδοι δεν πρέπει να αποτελούν εξετάσεις ρουτίνας, αλλά μπορούν να εφαρμοστούν ως διαγνωστικές εξετάσεις σε περιπτώσεις ιστορικού καθ' έξιν αποβολών, συνδυαστικά πάντα με τη συμβουλευτικού από γενετιστές.

1.3.2 Ανατομικές παραλλαγές

Οι ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας είναι παρούσες σε γυναίκες που παρουσιάζουν ανατομικές δυσκολίες, συμπεριλαμβανομένου τις αποβολές πρώτου και δεύτερου τριμήνου, τους πρόωρους τοκετούς και την παρουσία ανωμαλιών στα έμβρυα. Στατιστικά το 15% των γυναικών με τρεις ή περισσότερες αυτόματες αποβολές παρουσιάζει κάποια ανατομική ανωμαλία στη μήτρα [52]. Αυτές οι ανωμαλίες ταξινομούνται ως συγγενείς και επίκτητες. Για το λόγο αυτόν απαιτείται μια έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση για να ακολουθηθεί η κατάλληλη για κάθε ασθενή θεραπευτική στρατηγική.

Οι συγγενείς ανωμαλίες της μήτρας υπάρχουν εκ γενετής στις ασθενείς και περιλαμβάνουν τη δύσμορφη μήτρα, τη μήτρα με πλήρες ή μερικό διάφραγμα, τη δίσωμη μήτρα, την ημιμήτρια μήτρα και την απλαστική μήτρα, βάσει την κατηγοριοποίηση της ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) το 2013 [56]. Οι πόροι του Müller κατά την εμβρυογένεση δημιουργούν τη μήτρα τις σάλπιγγες και το άνω τμήμα του κόλπου [53]. Οποιαδήποτε διαταραχή σε αυτό το στάδιο μπορεί να προκαλέσει μία ανωμαλία στην ανατομία του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος. Στη μορφογένεση της μήτρας εμπλέκονται επίσης και τα γονίδια της οικογένειας HOX, οι μεταλλάξεις των οποίων οδηγούν σε συγγενείς ανωμαλίες κατά την εμβρυογένεση [54].

Το διάφραγμα μήτρας αποτελεί τη συχνότερη συγγενή ανωμαλία, καθώς συναντάται στο 6% των γυναικών με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών [55]. Η συγκεκριμένη κατάσταση προκύπτει από την αδυναμία συνένωσης των πόρων του Müller κατά την εμβρυογένεση, γεγονός που οδηγεί στην ανάπτυξη ενός ινομυώδους ιστού που εμποδίζει την εμφύτευση και την φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου [57]. Η δίσωμη ή αλλιώς δίκερως μήτρα αποτελεί το δεύτερο συχνότερο αίτιο αποβολών και συναντάται σε ποσοστό 1,2% των γυναικών που έχουν ιστορικό καθ' έξιν αποβολών [55]. Είναι αποτέλεσμα της αποτυχίας συνένωσης των παραμεσονεφρικών πόρων κατά την εμβρυογένεση στον πυθμένα της μήτρας, κάτι που διαμορφώνει τη μήτρα με χαρακτηριστικό σχήμα δίκερου και δυσκολεύει την ομαλή ανάπτυξη του εμβρύου στην κύηση [58].

Οι επίκτητες ανωμαλίες, αντίθετα, προκύπτουν κατά τη διάρκεια της ζωής της ασθενούς, απαντούν στο 12% των ασθενών με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών [55] και διακρίνονται σε λειομύματα ή ινομύματα, πολύποδες και ενδομήτριες συμφύσεις. Τα ινομύματα διαγιγνώσκονται στο 3% των περιστατικών καθ' έξιν αποβολών και οφείλονται στην επαναδιάταξη, την απόπτωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ενδομητρίου [59]. Διακρίνονται ανάλογα με τη θέση τους στη μήτρα σε υποβλεννογόνια, ενδοτοιχωματικά και υπορογόνια. Μόνο τα υποβλεννογόνια ινομύματα ανευρίσκονται στο 4,5% των περιστατικών καθ' έξιν αποβολών. Η υπερέκφραση ορισμένων miRNA έχει ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση των ινομυμάτων με κυριότερα τα miR-21, miR-23b, miR-29b και miR-197 [62]. Τα ινομύματα προκαλούν μείωση της συστατικότητας και της αιμάτωσης του ενδομητρίου και διαταραχή της ισορροπίας των κυτοκινών, με αποτέλεσμα τη χρόνια φλεγμονή [60]. Έτσι, επηρεάζεται αρνητικά η έκκριση της ωχρινότροπου ορμόνης (LH), που θα καταστήσει το ενδομήτριο κατάλληλο για εμφύτευση του εμβρύου [61].

Οι πολύποδες εντοπίζονται σε ποσοστό 2-3% των γυναικών με ιστορικό καθ' ἑξιν αποβολών [63]. Πρόκειται για καλοήθεις ορμονοεξαρτώμενους όγκους του ενδομητρίου, που αποτελούνται από αδενικά κύτταρα και κύτταρα του στρώματος και δημιουργούνται όταν διαταράσσεται ο μηχανισμός απόπτωσης των κυττάρων αυτών [64]. Στα περιστατικά καθ' ἑξιν αποβολών, οι πολύποδες προκαλούν φλεγμονώδη αντίδραση στο ενδομήτριο και δρουν αρνητικά στην εμφύτευση του εμβρύου. Το miR-152 έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση πολυπόδων σε περιστατικά καθ' ἑξιν αποβολών, ενώ έχει αποδειχθεί ότι η προγεστερόνη συμβάλλει στην αντιμετώπιση του ενδομητρίου πολύποδα, ρυθμίζοντας της έκφραση αυτού του miRNA [65].

Τέλος, οι ενδομήτριες συμφύσεις δημιουργούνται με την ανάπτυξη ινώδους ιστού σε σημεία του ενδομητρίου, όπου το βασικό στρώμα των κυττάρων έχει καταστραφεί, λόγω αποξέσεων, χειρουργείων ή μολύνσεων [66]. Το ενδομήτριο σε αυτές τις περιπτώσεις δεν μπορεί αναπτύσσεται φυσιολογικά ώστε να υποστηρίξει την εμφύτευση. Το miRNA-543 δείχνει να έχει προοπτικές για μελλοντική θεραπευτική χρήση, αφού εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την εισχώρηση των κυττάρων στο ενδομήτριο, άρα και τη δημιουργία ινώδους ιστού [67].

1.3.3 Μεταβολικοί και ενδοκρινικοί παράγοντες

Οι γυναίκες με ιστορικό καθ' ἑξιν αποβολών εμφανίζουν μεταβολικές και ενδοκρινικές διαταραχές σε σημαντικά υψηλό ποσοστό, που ανέρχεται από 8% έως και 12% [68]. Η ισορροπία του ορμονικού περιβάλλοντος είναι ζωτικής σημασίας για την εμφύτευση του εμβρύου στο ενδομήτριο και την ομαλή εξέλιξη του πρώτου τρίμηνου της κύησης [68]. Στις ενδοκρινικές διαταραχές περιλαμβάνονται οι διαταραχές του θυρεοειδή αδένου, το σύνδρομο των Πολυκυστικών Ωοθηκών (Polycystic Ovary Syndrome, PCOS), την υπερπρολακτιναιμία, το σακχαρώδη διαβήτη και την ανεπάρκεια βιταμίνης D.

Ο υποθυρεοειδισμός, μια πολύ συχνή διαταραχή του θυρεοειδούς αδένου εντοπίζεται στο 7% των κυήσεων [69] και έχει συσχετιστεί με τις καθ' ἑξιν αποβολές. Όταν αυτός προκαλείται από αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα (Thyroid Autoimmunity, TAI) τότε ο οργανισμός της γυναίκας παράγει τα αντιθυρεοειδικά αντισώματα anti-TPO. Τα anti-TPO μπορούν να απορυθμίσουν την ομαλή λειτουργία του θυρεοειδή αδένου της μητέρας, έχοντας αρνητικό αντίκτυπο στην κύηση και επιπλέον, διαπερνούν τον πλακούντα, επηρεάζοντας αρνητικά την ομαλή ανάπτυξη του εμβρύου [70], οδηγώντας σε ορισμένες περιπτώσεις σε αποβολές.

Συχνός παράγοντας κινδύνου για τις καθ' ἑξιν αποβολές φαίνεται να είναι το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS). Το σύνδρομο αυτό εμφανίζεται σε ποσοστό από 8% έως και 10% των γυναικών με ιστορικό καθ' ἑξιν αποβολών [71], δηλαδή στην πλειονότητα των περιστατικών καθ' ἑξιν αποβολών που οφείλονται σε ενδοκρινική διαταραχή (8% ως 12%, όπως αναφέρθηκε παραπάνω). Το PCOS σχετίζεται με την αραιομηνόρροια ή αμμηνόρροια, την αντίσταση στην ινσουλίνη, την παχυσαρκία, την υπερομοκυστειναιμία και την

υπερανδρογοναιμία στις γυναίκες που διαγιγνώσκονται με αυτό [72]. Πιο συγκεκριμένα, η υπερανδρογοναιμία κατά την κύηση δρα κατασταλτικά στην ανάπτυξη του ενδομητρίου για την εμφύτευση του εμβρύου και την επίτευξη κλινικής εγκυμοσύνης, ενώ η υπερομοκυστειναιμία ενοχοποιείται για τη δημιουργία θρομβώσεων σε ορισμένες περιπτώσεις αποβολών [72]. Είναι γνωστό ότι σε γυναίκες που εμφανίζουν το σύνδρομο, παρατηρείται αυξημένη δραστικότητα του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (plasminogenactivatorinhibitor 1,PAI), ενός παράγοντα που συμμετέχει στην τροφοβλαστική διείσδυση και υπό αυτές τις συνθήκες οδηγεί σε μειωμένη διείσδυση στο ενδομήτριο [72].

Η υπερπρολακτιναιμία συσχετίζεται με την απώλεια της κύησης σε ορισμένα περιστατικά καθ' έξιν αποβολών. Η προλακτίνη είναι μία πολυπεπτιδική ορμόνη της υπόφυσης και στόχοι της αποτελούν ο υποθάλαμος και οι ωοθήκες. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στη διατήρηση του ωχρού σωματίου κύησης και την παραγωγή προγεστερόνης για την υποστήριξη της κύησης, όσο και στην παραγωγή γάλακτος από το μαστικό αδέννα κατά τον θηλασμό [73]. Για το λόγο αυτό η αύξηση των επιπέδων της στον οργανισμό, που παρατηρείται στην υπερπρολακτιναιμία, διαταράσσουν την ομαλή λειτουργία των ωοθηκών και μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στην κύηση [74].

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο κίνδυνος αποβολής αυξάνεται όταν μία έγκυος πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη. Ωστόσο, ο κίνδυνος αυτός μειώνεται σημαντικά με τη χορήγηση κατάλληλης φαρμακευτικής αγωγής και τη ρύθμισή των επιπέδων σακχάρου [77]. Μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη DICER, που οδηγούν σε παθολογική έκφραση ορισμένων microRNA, έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση παχυσαρκίας, σακχαρώδους διαβήτη και διαταραχές στην έκκριση ινσουλίνης και λιπιδίων [75,76].

Τέλος, η βιταμίνη D, μία στεροειδής ορμόνη, που παράγεται στο δέρμα, τις ωοθήκες και τον πλακούντα, παίζει σημαντικό ρόλο στην ομαλή λειτουργία του ανοσοποιητικού και αναπαραγωγικού συστήματος [78,79]. Έχει αποδειχθεί ότι η βιταμίνη D συμβάλλει στην ομοιοστάση του ασβεστίου, του φωσφόρου και το μεταβολισμό των οστών, ενώ κατά την κύηση είναι αναγκαίες μεγάλες ποσότητες ασβεστίου για την ανάπτυξη του εμβρύου. Επιπλέον, έχουν εντοπιστεί υποδοχείς της στα κύτταρα του ενδομητρίου και είναι γνωστό ότι παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των κυτοκινών, όπως οι ιντερφερόνη-γ, η ιντερλευκίνη-2, και των βοηθητικών T-κυττάρων. Επομένως, παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφύτευση και η ανεπάρκεια της συνδέεται με επιπλοκές της κύησης, όπως προεκλαμψία και καθ' έξιν αποβολές [78].

1.3.4 Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο

Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο εμφανίζεται σε ποσοστό 10% με 15% των γυναικών με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών [80]. Πρόκειται για μία αυτοάνοση νόσο, που χαρακτηρίζεται από την παρουσία αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων στην κυκλοφορία του αίματος, τα

οποία στρέφονται εναντίων φωσφολιπιδίων και πρωτεϊνών και δημιουργούν θρόμβους στα αγγεία [81].

Τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα είναι μία οικογένεια 20 περίπου αντισωμάτων και χωρίζονται σε κατηγορίες, εκ των οποίων οι κυριότερες είναι τα αντιπηκτικά του λύκου (lupus anticoagulant, LA), τα αντικαρδιολιπινικά αντισώματα (anticardiolipin antibodies, aCLs) και τα αντισώματα έναντι της β2-γλυκοπρωτεΐνης I (anti-β2- glycoprotein I antibodies, aβ2GPI) [82]. Τα αντισώματα αυτά προκαλούν μείωση της έκκρισης της χοριακής γοναδοτροπίνης, εξασθενημένη διείσδυση της τροφοβλάστης στο ενδομήτριο και ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και των αιμοπεταλίων με αποτέλεσμα το σχηματισμό θρόμβων και κατά συνέπεια την απώλεια της κύησης [83,85]. Τα miR-19b και miR-20a έχουν ρυθμιστικό ρόλο για τον αντιθρομβωτικό παράγοντα TF και φαίνεται να συνδέονται με την εμφάνιση του συνδρόμου σε γυναίκες με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών [84].

1.3.5 Συγγενείς Θρομβοφιλίες

Ως θρομβοφιλία ορίζεται η κατάσταση ανωμαλίας του πήκτικού μηχανισμού κατά την οποία το αίμα έχει αυξημένη τάση πήξης [86]. Η θρομβοφιλία διακρίνεται σε επίκτητη και κληρονομική. Η επίκτητη προκύπτει μετά από καταστάσεις, όπως νόσηση από κάποιους τύπους καρκίνου, τραύμα σε σημεία του σώματος, όπως το πόδι και μεγάλες περιόδους ακινησίας μετά από χειρουργικές επεμβάσεις. Αντίθετα, η κληρονομική ή συγγενής θρομβοφιλία αφορά μεταλλάξεις του DNA σε συγκεκριμένες περιοχές γονιδίων, με αποτέλεσμα τα άτομα που τις φέρουν να μην παράγουν τις φυσιολογικές ποσότητες των παραγόντων πήξης ή να προκύπτουν παράγοντες πήξης με ανωμαλία στη δομή και τη λειτουργία τους.

Οι πιο γνωστές μεταλλάξεις, που ενοχοποιούνται για τα περιστατικά θρομβοφιλίας είναι η μετάλλαξη του παράγοντα V Leiden (FVL), η μετάλλαξη του γονιδίου της προθρομβίνης (PTG20210A) και οι μεταλλάξεις που προκαλούν έλλειψη των πρωτεϊνών C και S (PSD) [86]. Κατά τη φυσιολογική διαδικασία αιμόστασης ενεργοποιείται ο παράγοντας V Leiden και στη συνέχεια ενεργοποιεί την προθρομβίνη προς παραγωγή θρομβίνης για την πήξη του αίματος [87]. Αντίστροφα, ο παράγοντας αυτός καταλύεται από την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C και αναστέλλεται η δράση του, για να ρυθμιστεί η τάση πήξης και να μη δημιουργηθεί θρόμβος στο αίμα [87,89]. Γίνεται, επομένως, αντιληπτό ότι οποιαδήποτε διαταραχή στην παραπάνω διαδικασία μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικά αυξημένη τάση πήκτικότητας του αίματος.

Φυσιολογικά, κατά την περίοδο της εγκυμοσύνης παρατηρείται αύξηση των παραγόντων πήξεως και μείωση της δραστηριότητας της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C [88]. Ο μηχανισμός αυτός έχει ως στόχο να προστατεύσει την έγκυο από κάποια σοβαρή αιμορραγία κατά τον τοκετό. Αν, ωστόσο, διαταραχθεί η ισορροπία αυτή η έγκυος κινδυνεύει να αντιμετωπίσει θρομβοεμβολικές επιπλοκές κατά την εγκυμοσύνη [89] και ο κίνδυνος

αυτός αυξάνεται σημαντικά σε γυναίκες, που εμφανίζουν συγγενή θρομβοφιλία. Οι θρομβώσεις στα αγγεία μπορεί να παρεμποδίσουν τη διείσδυση του πλακούντα και να προκαλέσουν φλεγμονές, οδηγώντας σε αποβολές.

1.3.6 Ιδιοπαθή αίτια

Αν και ένα μεγάλο ποσοστό καθ' ἑξιν αποβολών αποδίδεται σε ένα από τα παραπάνω αίτια, στην πραγματικότητα περίπου το 50% των περιστατικών δεν αποδίδεται σε κάποιο σαφές αίτιο σε κανέναν από τους δύο συντρόφους [90]. Σε αυτήν την περίπτωση μιλάμε για καθ' ἑξιν αποβολές με ιδιοπαθή αίτια και σοβαρές ψυχολογικές επιπτώσεις στα ζευγάρια που τις βιώνουν. Οι ιδιοπαθείς καθ' ἑξιν αποβολές παρουσιάζουν σημαντική ετερογένεια και τα αίτιά τους είναι δύσκολο να διευκρινιστούν, πιθανόν, λόγω του ότι συμμετέχουν σε αυτές πολλαπλοί παθογενετικοί μηχανισμοί. Σημαντική κρίνεται η μελέτη των miRNA, τα οποία φαίνεται να εμπλέκονται σε πολλές περιπτώσεις επιπλοκών κύησης. Συγκεκριμένα, η διαφοροποίηση της έκφρασής τους έχει προοπτικές να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά ως διαγνωστικό εργαλείο για τις ιδιοπαθείς καθ' ἑξιν αποβολές [91].

1.4 MicroRNA ΚΑΙ ΚΑΘ' ΕΞΙΝ ΑΠΟΒΟΛΕΣ

Τα miRNA διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πλήθος βιολογικών διαδικασιών, όπως είναι η ανάπτυξη και διαφοροποίηση της τροφοβλάστης, η ενεργοποίηση και εμφύτευση του εμβρύου, η ανοσοανοχή και η δεκτικότητα του ενδομητρίου κατά την εμφύτευση [92]. Η απορρύθμιση της έκφρασης τους μπορεί να έχει σοβαρές επιπτώσεις για τις διαδικασίες αυτές, αποτελώντας πολλές φορές αιτία αποβολών. Πλήθος μελετών έχουν αποδείξει ότι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) σε γονίδια miRNA επηρεάζουν την παραγωγή και την διαδικασία ωρίμανσης του, οδηγώντας πολλές γυναίκες σε προβλήματα που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη [93,94]. Για το λόγο αυτόν μελετάται το μοτίβο έκφρασης των miRNA σε γυναίκες με ιστορικό καθ' ἑξιν αποβολών και εξετάζεται ο πιθανός τους ρόλος ως μη επεμβατικοί διαγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες στις καθ' ἑξιν αποβολές [95].

1.4.1 MicroRNA και εμφύτευση

Εμφύτευση είναι η διαδικασία κατά την οποία τα ταχέως διαιρούμενα κύτταρα της βλαστοκύστης εισχωρούν στο ενδομήτριο της μητέρας, μια διαδικασία που περιλαμβάνει σύνθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της βλαστοκύστης και του ενδομητρίου. Στη

σηματοδότηση αυτών των αλληλεπιδράσεων εμπλέκεται πλήθος γονιδίων και παραγόντων που διαφοροποιούν την έκφρασή τους, όπως τα miRNA. Τα miRNA φαίνεται να εκφράζονται διαφορετικά μεταξύ βλαστοκύστεων που εμφυτεύτηκαν και βλαστοκύστεων που παρουσίασαν αδυναμία εμφύτευσης, αλλά και μεταξύ ευπλοειδικών και ανευπλοειδικών βλαστοκύστεων [96]. Επιπλέον, διαφορετική έκφραση παρουσιάζουν τα miRNA μεταξύ ενδομητρίων που διαφέρουν στο βαθμό δεκτικότητας τους κατά την εμφύτευση [96].

Στο άνθρωπο έχουν εντοπιστεί περίπου 140 γονίδια που εκφράζονται στα κύτταρα του ενδομητρίου και εμπλέκονται στη διαδικασία της εμφύτευσης. Γνωστό παράδειγμα αποτελεί το miR-21, που φαίνεται να υπερεκφράζεται στο σημείο της εμφύτευσης κατά την πέμπτη ημέρα κύησης και έχει ως στόχο το γονίδιο Reck [97]. Επιπλέον, παρατηρείται αυξημένη έκφραση των miR-30b και miR30d και μειωμένη έκφραση των miR-494 και miR-923 στα κύτταρα του ενδομητρίου στη μέση της ωχρινικής φάσης [98], όπου συμβαίνει η εμφύτευση, γεγονός που μαρτυρά τον ουσιαστικό ρόλο των miRNA στη διαδικασία της εμφύτευσης.

Σε περιπτώσεις γυναικών που παρουσιάζουν επαναλαμβανόμενη αποτυχία εμφύτευσης (Repeated Implantation Failure, RIF), εντοπίστηκε αυξημένη έκφραση του miR-22 κατά τη διάρκεια του παραθύρου εμφύτευσης, σε σύγκριση με τα επίπεδά του σε γυναίκες με ιστορικό φυσιολογικών κυήσεων. Όταν εκφράζεται σε αυξημένα επίπεδα, το miR-22 αναστέλλει την έκφραση των παραγόντων Tiam1 (T-lymphoma invasion and metastasis inducing factor 1) και Rac1 (RasrelatedC3 botulinum toxin substrate 1), που είναι σημαντικοί στην προετοιμασία του ενδομητρίου για την εμφύτευση της βλαστοκύστης [99]. Παρομοίως, η έκφραση του miR-145 φαίνεται αυξημένη σε περιπτώσεις RIF. Το miR-145 στοχεύει γονίδια, όπως το IGF1R (Insulin-like growth factor 1 receptor), το OCT4, το SOX11, το HOXA10 και το HOXA11. Στην περίπτωση του υποδοχέα IGF1R των κυττάρων του ενδομητρίου, αναστέλλει τη σύνδεση του με τον εμβρυϊκό παράγοντα IGF-I, εμποδίζοντας την εμφύτευση της βλαστοκύστης [100]. Τέλος, έρευνες έχουν αναφερθεί και στο ρόλο του miR-31 στη διαδικασία της εμφύτευσης. Το miR-31 στοχεύει τα γονίδια *FOXP3* και *CXCL12*. Η αυξημένη έκφραση του miR-31 οδηγεί σε μειωμένη έκφραση του *FOXP3* (ανοσοκατασταλτικό γονίδιο), που μπορεί να αποτελέσει αιτία για την αποτυχία εμφύτευσης και επαναλαμβανόμενες αποβολές σε ασθενείς με RIF [101].

1.4.2 MicroRNA και κυτταρική διαφοροποίηση της βλαστοκύστης

Η έκφραση των miRNA είναι σημαντική για την γαμετογένεση και τη φυσιολογική ανάπτυξη της βλαστοκύστης. Η ρύθμιση της ομαλής μετάβασης από το στάδιο του ζυγώτη στο στάδιο της βλαστοκύστης αξιολογείται από το προφίλ γονιδίων, όπως τα *Drosha*, *Dgcr8*, *Exportin 5*, *Dicer*, *Ago1*, *Ago2*, *Ago3*, *Ago4* και *Ago5* [102], που κωδικοποιούν σημαντικές πρωτεΐνες για την ωρίμανση των miRNA. Φυσιολογικά, τα γονίδια αυτά εμφανίζουν μειωμένη έκφραση μετά το στάδιο του ζυγώτη, με εξαίρεση τα *Ago1*, *Ago3*, *Ago4* που έχουν αυξημένη έκφραση μετά το στάδιο των 2 κυττάρων και του *Ago2* που έχει αυξημένη έκφραση

μετά το στάδιο των 8 κυττάρων [102]. Επιπλέον, τα έμβρυα από το στάδιο του ζυγωτού στο στάδιο της βλαστοκύστης παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα επεξεργασίας miRNA. Ωστόσο, τα ώριμα miRNA συνδέονται με mRNA στο στάδιο της βλαστοκύστης, ώστε να παραμένουν διαθέσιμα για χρήση από το έμβρυο χωρίς την ανάγκη επεξεργασίας [102]. Επομένως, γίνεται αντιληπτός ο λειτουργικός ρόλος των miRNA για την ομαλή ανάπτυξη και κυτταρική διαφοροποίηση του εμβρύου.

Αρκετές μελέτες σίγασης γονιδίων έχουν αποδείξει αυτόν τον λειτουργικό ρόλο. Σε μελέτη σίγασης του γονιδίου Dicer1, φάνηκε ότι τα έμβρυα που προέκυψαν ήταν μη βιώσιμα και είχαν μειωμένο αριθμό βλαστοκυττάρων [103]. Παρομοίως, σε μελέτη σίγασης του γονιδίου Dgcr8, τα έμβρυα των ποντικών παρουσίασαν μειωμένη δυναμική, σταματώντας την ανάπτυξη του πριν φτάσουν στο στάδιο της βλαστοκύστης [104]. Σε άλλη σχετική μελέτη, ερευνήθηκε η επίδραση της υπερέκφρασης και της μειωμένης έκφρασης του miR-21 στην ανάπτυξη των ωαρίων και των βλαστοκύστεων ποντικών. Βρέθηκε ότι η υπερέκφραση του miR-21 οδήγησε σε αύξηση των γονιμοποιημένων ωαρίων και των εμβρύων, που έφτασαν στο στάδιο της βλαστοκύστης, ενώ η μειωμένη έκφραση του miR-21, οδήγησε στα ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα [105]. Τέλος, συγκριτικές μελέτες, δείχνουν ότι υπάρχει διαφοροποιημένη έκφραση των miRNA μεταξύ αδρανών και ενεργοποιημένων βλαστοκύστεων. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται πέντε μέλη της οικογένειας let-7, με σημαντικότερο το let-7a, που τροποποιεί τη δυνατότητα εμφύτευσης της ενεργοποιημένης βλαστοκύστης. Σε μοντέλα ποντικών η εισαγωγή οιστραδιόλης μειώνει της έκφραση του let-7a, οδηγώντας την αδρανή βλαστοκύστη σε ενεργοποίηση [106].

1.4.3 MicroRNA και τροφοβλάστη

Η ομαλή ανάπτυξη του εμβρύου εξαρτάται εκτός των άλλων και από τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση της τροφοβλάστης [107], διαδικασίες, που ρυθμίζονται σε ένα βαθμό από τα miRNA [108]. Οι μιτωτικές διαιρέσεις και αποπτώσεις, που λαμβάνουν χώρα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη χρειάζεται να διατηρούν μία λεπτή ισορροπία για την ομαλή ανάπτυξη της τροφοβλάστης. Οι μιτωτικές διαιρέσεις ελέγχονται από το ογκογονίδιο MDM2, ενώ οι απόπτωση ρυθμίζεται από το γονίδιο p53 [109,110]. Τα γονίδια αυτά αποτελούν στόχο για το miRNA-365, το οποίο ενισχύει την έκφραση του p53 και ελαττώνει την έκφραση του MDM2, διαταράσσοντας την ομαλή ανάπτυξη της τροφοβλάστης [111]. Σε γυναίκες με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών έχει επίσης, βρεθεί υπερέκφραση του miR-184. Το miR-184 στοχεύει σε συγκεκριμένα γονίδια στα κύτταρα της τροφοβλάστης και η δράση του οδηγεί σε αύξηση, μίας πρωτεΐνης, της Fas, που είναι υπεύθυνη για την απόπτωση των τροφοβλαστικών κυττάρων, οδηγώντας σε αποβολές [112]. Τέλος, και το miR-520 έχει εντοπιστεί να υπερεκφράζεται σε περιστατικά γυναικών με καθ' έξιν αποβολές. Το miR-520 έχει ως γονίδιο στόχο το PARP1, που είναι υπεύθυνο για την ανίχνευση και επιδιόρθωση βλαβών στο γενετικό υλικό των κυττάρων. Η υπερέκφραση του

miR-520, όπως αποδείχθηκε προκαλεί πολλαπλές βλάβες στο DNA των τροφοβλαστικών κυττάρων, οδηγώντας στην απόπτωση τους και στην αποβολή του εμβρύου [113].

Όσον αφορά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική διαφοροποίηση τα γονίδια FAS, E2F1, HOXB8 και SOX6 φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση αυτής της διαδικασίας. Τα γονίδια αυτά αποτελούν στόχο για τα miR-146a, 149, 196a2 και miR-499 αντίστοιχα [115-117]. Έχουν εντοπιστεί πολυμορφισμοί αυτών των miRNA και συγκεκριμένα των pre-miRNA που εμποδίζουν τη φυσιολογική διαδικασία ωρίμανσης του miRNA [114]. Ως εκ τούτου, ο πολλαπλασιασμός και οι διαφοροποίηση των κυττάρων της τροφοβλάστης απορρυθμίζονται κάτι που συσχετίζει αυτά τα miRNA με τις καθ' έξιν αποβολές.

Άλλες μελέτες έδειξαν ότι η υπερέκφραση του miR-125b-1-3p μειώνει την ικανότητα διείσδυσης της τροφοβλάστης κατά την εμφύτευση μέσω της διατάραξης της αγγειακής σταθερότητας [118]. Παράλληλα, βρέθηκε υπερέκφραση του miR-29b σε δείγματα πλακούντα από ασθενείς με σοβαρή προεκλαμψία [119]. Η υπερέκφραση του miR-29b αναστέλει την ικανότητα διείσδυσης των τροφοβλαστικών κυττάρων, καθώς και το σχηματισμό δικτύου και τον αριθμό των τριχοειδών σωλήνων [119]. Τέλος, το miR-424 έχει εντοπιστεί σε τροφοβλαστικά κύτταρα περιστατικών καθ' έξιν αποβολών [120], ενώ ανιχνεύθηκε και σε αυξημένα επίπεδα στο πλάσμα [121] και τον πλακούντα γυναικών με προεκλαμψία, συγκριτικά με υγιή περιστατικά [122].

1.5 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση του ακόλουθου ερευνητικού ερωτήματος: «Υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των καθ' έξιν αποβολών και της έκφραση των μικρών μη κωδικοποιητικών μορίων miRNA;». Πιο αναλυτικά, πραγματοποιήθηκε ανασκόπηση της έως τώρα υπάρχουσας βιβλιογραφίας και εξετάστηκε η ύπαρξη ή μη διαφοράς στην έκφραση των υπό μελέτη miRNA μεταξύ γυναικών με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών και γυναικών που δεν έχουν ιστορικό αποβολών.

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Αναζήτηση βιβλιογραφίας

Για τη διεξαγωγή της μελέτης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της συστηματικής ανασκόπησης (Systematic Literature Review, SLR). Έτσι, τέθηκαν τα ακόλουθα όρια:

1. Αναζητήθηκαν επιστημονικά άρθρα σχετικά με την έκφραση των miRNA σε ασθενείς με καθ' έξιν αποβολές στις ελεύθερα προσβάσιμες μηχανές αναζήτησης PubMed

(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), Scopus (<https://www.scopus.com/sources>) και Google Scholar (<https://scholar.google.com/>), τον Ιανουάριο του 2024.

2. Οι λέξεις κλειδιά (στην αγγλική γλώσσα), που χρησιμοποιήθηκαν για την αναζήτηση ήταν «miRNA» ή «miRNA expression» ΚΑΙ «recurrent pregnancy loss».

Σε καμία από τις δύο βάσεις δεδομένων δε χρησιμοποιήθηκε χρονικό όριο ή οποιοδήποτε άλλο φίλτρο κατά την αναζήτηση.

2.2 Κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού

Βάσει του ερευνητικού ερωτήματος τέθηκαν τα κριτήρια ένταξης των επιστημονικών άρθρων στην μελέτη. Αρχικά, συλλέχθηκαν 55 επιστημονικά άρθρα, τα οποία μελετούσαν τη συσχέτιση των miRNA με τις καθ' έξιν αποβολές, σε πληθυσμούς γυναικών. Από αυτά, δεκτά έγιναν 26 επιστημονικά άρθρα, τα οποία μελετούσαν την διαφοροποίηση της έκφρασης των miRNA στους πληθυσμούς των γυναικών, που συμμετείχαν στις μελέτες. Όλα τα άρθρα αφορούσαν μελέτες ασθενών-μαρτύρων (case-control studies) και είχαν πρωτογενή δεδομένα, δηλαδή ανέφεραν αριθμό ατόμων ανά πληθυσμιακή ομάδα και άλλα στατιστικά στοιχεία για τη σύγκριση της έκφρασης των miRNA μεταξύ των ομάδων (p-value ή q-value ή/και fold change). Σε όλες τις μελέτες οι γυναίκες-ασθενείς (cases) είχαν ιστορικό καθ' έξιν αποβολών, δηλαδή είχαν παρουσιάσει τουλάχιστον δύο συνεχόμενες αποβολές (σε κάποιες μελέτες δύο και σε κάποιες μελέτες τρεις συνεχόμενες αποβολές). Οι γυναίκες-μάρτυρες (controls) αφορούσαν γυναίκες με τουλάχιστον μία επιτυχημένη εγκυμοσύνη ή/και γυναίκες που είχαν πραγματοποιήσει νόμιμο τερματισμό της κύησης, χωρίς ιστορικό αποβολών.

Όπως προαναφέρθηκε, από τα 55 άρθρα που βρέθηκαν έγιναν δεκτά τα 26, ενώ τα υπόλοιπα 29 αποκλείστηκαν από την παρούσα μελέτη. Στα 29 άρθρα που αποκλείστηκαν, περιλαμβάνονται 27 άρθρα, που δε σχετιζόνταν με την έκφραση των miRNA ή τις καθ' έξιν αποβολές. Συγκεκριμένα, 26 άρθρα αφορούσαν τη μελέτη των πολυμορφισμών στα μόρια miRNA και όχι την διαφοροποίηση της έκφρασής τους, ενώ 1 άρθρο μελετούσε περιστατικά επαναλαμβανόμενων αποτυχιών εμφύτευσης (Recurrent Implantation Failure, RIF) και όχι καθ' έξιν αποβολές. Να σημειωθεί ότι στα 26 άρθρα της μελέτης των πολυμορφισμών περιλαμβάνονται 3 συστηματικές ανασκοπήσεις και μετα-αναλύσεις. Τέλος, απορρίφθηκε και 1 άρθρο, στο οποίο οι γυναίκες-ασθενείς είχαν διαγνωστεί με λοίμωξη στο αναπαραγωγικό σύστημα (λοίμωξη από το βακτήριο *Chlamydia trachomatis*) και 1 άρθρο το οποίο δεν παρείχε επαρκή δεδομένα (δεν ανέφερε τον αριθμό των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη). Σημειώνεται, επίσης, ότι σε ορισμένα άρθρα, κατά την αρχική αναζήτηση, δεν ήταν δυνατή η ελεύθερη πρόσβαση, διότι ανήκαν σε βιβλιοθήκες ή επιστημονικά περιοδικά που δεν χρησιμοποιούσαν την πολιτική του δανεισμού και απορρίφθηκαν από την παρούσα μελέτη.

Συνοπτικά τα κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού παρουσιάζονται παρακάτω.

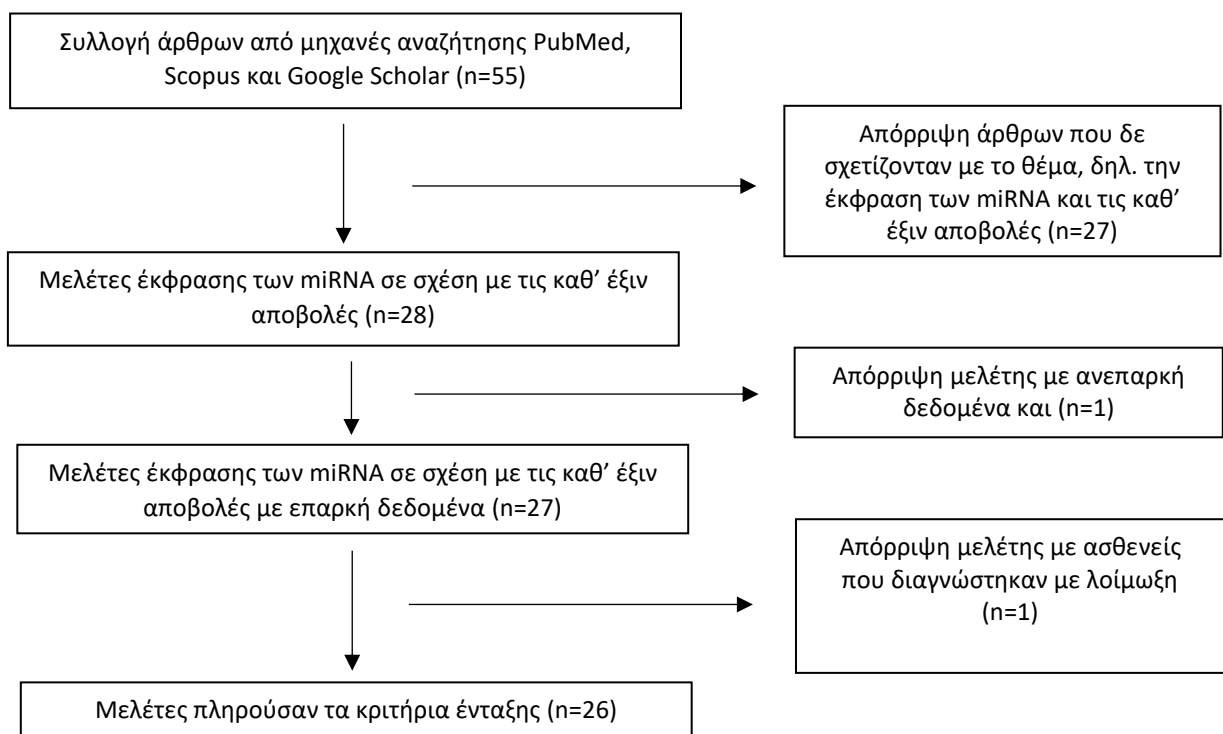
Κριτήρια ένταξης:

- Μελέτες, που ερευνούσαν τη συσχέτιση της έκφρασης των miRNA με τις καθ' έξιν αποβολές
- Μελέτες ασθενών-μαρτύρων με επαρκή πρωτογενή δεδομένα (αριθμό ατόμων ανά πληθυσμό και στατιστικά στοιχεία για τη σύγκρισης (p-value ή q-value ή/και fold change)
- Μελέτες, όπου οι ασθενείς είχαν τουλάχιστον δύο συνεχόμενες αποβολές και οι μάρτυρες τουλάχιστον μία επιτυχή εγκυμοσύνη ή ιστορικό νόμιμου τερματισμού κύησης χωρίς ιστορικό αποβολών.

Κριτήρια αποκλεισμού:

- Μελέτες, που δεν σχετίζονταν με την έκφραση των miRNA ή με τις καθ' έξιν αποβολές
- Μελέτες χωρίς επαρκή δεδομένα
- Μελέτες, όπου οι ασθενείς είχαν διαγνωστεί με λοίμωξη του αναπαραγωγικού συστήματος

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται σχηματικά η μεθοδολογία αναζήτησης της βιβλιογραφίας.



Διάγραμμα 1. Διάγραμμα ροής της μεθοδολογίας αναζήτησης και επιλογής της βιβλιογραφίας

2.3 Εξαγωγή δεδομένων

Η εξαγωγή των δεδομένων των μελετών έγινε με τη χρήση του λογισμικού υπολογιστικού φύλλου Microsoft Excel του προγράμματος Microsoft 365. Από κάθε μελέτη

έγινε εξαγωγή των ακόλουθων δεδομένων: το όνομα του πρώτου συγγραφέα και το έτος δημοσίευσης, η χώρα διεξαγωγής, η εθνικότητα των ατόμων που συμμετείχαν, τα διαγνωστικά κριτήρια για τις καθ' έξιν αποβολές (δύο ή τρεις συνεχόμενες αποβολές), ο αριθμός των ασθενών και των μαρτύρων, ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών και των μαρτύρων, τα miRNA που ερευνήθηκαν σε κάθε μελέτη, η τεχνολογία ανίχνευσης των miRNA και ο ιστός από τον οποίο απομονώθηκαν τα miRNA. Επίσης, σημειώθηκε και η μεταβλητή p-value ή η μεταβλητή q-value για τη διαφορά της έκφρασης του κάθε miRNA μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων, η μεταβλητή fold change, που εκφράζει την αλλαγή της έκφρασης του κάθε miRNA μεταξύ των ασθενών και των μαρτύρων (η αναλογία αυτής της έκφρασης μεταξύ των δύο ομάδων) ή/και η μεταβλητή miRNA relative expression για την εκτίμηση της στατιστικής σημαντικότητας της διαφοράς έκφρασης του miRNA μεταξύ ασθενών και μαρτύρων.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Χαρακτηριστικά των επιλεγμένων μελετών

Όλες οι μελέτες που επιλέχθηκαν για τη συστηματική ανασκόπηση (στο τελικό σύνολο 26) έχουν δημοσιευθεί από το έτος 2013 και έπειτα και είναι γραμμένες στην αγγλική γλώσσα. Από αυτές, οι 19 (73%) χρησιμοποιούν ως διαγνωστικό κριτήριο των καθ' έξιν αποβολών την εκδήλωση τουλάχιστον 2 συνεχόμενων αποβολών, ενώ οι 7 (26,9%) την εκδήλωση τουλάχιστον 3 συνεχόμενων αποβολών. Ως προς τη μεθοδολογία συγκρότησης των ομάδων ασθενών και μαρτύρων, κυριαρχεί η στρατηγική των αντιστοιχισμένων ομάδων έναντι της τυχαίας δειγματοληψίας, στο σύνολο των μελετών, με τα άτομα που συμμετέχουν σε κάθε ομάδα να μην έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε ηλικία, έμμηνο κύκλο, Δείκτη Μάζας Σώματος και άλλα βιομετρικά χαρακτηριστικά.

Στην πλειοψηφία των μελετών, δηλαδή στις 19 (73%) χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της RT-qPCR (Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction) για την ανίχνευση των miRNA, ενώ σε 2 (7,6%) μελέτες εφαρμόστηκε η μέθοδος των μικροσυστοιχιών (microarrays) και στις υπόλοιπες 5 (19,2%) χρησιμοποιήθηκε τόσο η μέθοδος των μικροσυστοιχιών όσο και μέθοδος της RT-qPCR για επαλήθευση κάποιων αποτελεσμάτων. Επιπλέον, σε 17 (65,3%) μελέτες απομονώθηκε δείγμα αίματος από τους ασθενείς και τους μάρτυρες για την ανίχνευση των miRNA, σε 8 (30,7%) μελέτες απομονώθηκε δείγμα χοριακών λαχνών (villius tissue) και σε 7 (26,9%) μελέτες δείγμα από τη στιβάδα του ενδομητρίου (decidual tissue). Σημειώνεται ότι, σε ορισμένες μελέτες απομονώθηκε δείγμα από παραπάνω από έναν από τους παραπάνω ιστούς.

Παρακάτω παρουσιάζεται ο πίνακας με τα κυριότερα χαρακτηριστικά των μελετών που χρησιμοποιήθηκαν στη συστηματική ανασκόπηση.

Πρώτος συγγραφέας, έτος διεξαγωγής	Χώρα διεξαγωγής	Διαγνωστικά κριτήρια καθ' έξιν αποβολών	Αριθμός ασθενών (cases)	Αριθμός μαρτύρων (controls)	Ηλικία ασθενών (έτη)	Ηλικία υγιών (έτη)	Τεχνολογία ανίχνευσης miRNA	Ιστός	miRNA	Έκφραση miRNA ασθενών σε σχέση με μαρτύρων	Fold change	p-value	q-value	miRNA Relative expression (cases)	miRNA Relative expression (controls)	
Li, 2016 [125]	Κίνα	≥3	20	20	31.0 ± 2.87	29.9 ± 2.0	RT-qPCR	Ενδομήτριο	miR-34a	Αύξηση		<0.001				
									miR-155	Αύξηση		<0.001				
									miR-141	Αύξηση		<0.01				
									miR-125a	Αύξηση		<0.001				
									miR-125b	Αύξηση		<0.001				
									miR-24	Μείωση		<0.01				
Wang J., 2016 [127]	Κίνα	≥2	18	15	29.61 ± 4.41	29.33 ± 6.94	RT-qPCR	Ενδομήτριο	miR-516a-5p	Αύξηση	11.01941342		0			
									miR-517a-3p	Αύξηση	10.9882684		0			
									miR-519a-3p	Αύξηση	27.41347031		0			
									miR-519d	Αύξηση	8.10401668		0			
									miR-520a-3p	Αύξηση	10.75501821		0			
									miR-520h	Αύξηση	15.48282744		0.01447			
									miR-455-5p	Αύξηση	2.19237434		0.04210			
									miR-1323	Αύξηση	6.73950523		0			
									miR-516b-5p	Αύξηση	8.66095224		0			
									miR-205-5p	Αύξηση	9.09559597		0.01232			
									miR-522-3p	Αύξηση	21.79447724		0			
									Χοριακές λάχνες	miR-1	Μείωση	0.2173372		0.00088		
										miR-372	Μείωση	0.22803727		0.00205		
									miR-100-5p	Αύξηση	3.70431902		0			
	miR-24-3p	Αύξηση	2.89758058		0.00004											
	miR-146a-5p	Αύξηση	4.45436783		0.00088											
	miR-371a-5p	Μείωση	0.2574233		0.00304											

									miR-486-5p	Μείωση	0.30897628		0.03455		
									miR-376c-3p	Μείωση	0.28742144		0.02509		
									miR-191-5p	Αύξηση	2.11589617		0.00726		
Tutunfroush M., 2022 [129]	Ιράν	≥2	60	60	34.60 ± 3.96	29.97 ± 5.54	RT-qPCR	Αίμα	miR-23a-3p	Μείωση	4.66	0.053			
									miR-101-3p	Μείωση	12.48	0.03			
									miR-let-7c	Μείωση	11.21	0.007			
Geng X., 2022 [130]	Κίνα	≥3	36	40	29.1 ± 3.4	28.8 ± 5.7	RT-qPCR	Χοριακές λάχνες	miR-33a	Μείωση		0.0021			
									miR-33b	Μείωση		0.0043			
									miR-181a	Μείωση		<0.05			
									miR-92a	όχι σημαντική διαφορά					
									miR-155	όχι σημαντική διαφορά					
									miR-148a	όχι σημαντική διαφορά					
Abbaskhani H., 2022 [132]	Ιράν	≥2	50	50	<35	<35	RT-qPCR	Αίμα	miR-361-3p	Μείωση	1.61	<0.0001			
Manzoor U., 2022 [134]	Ινδία	≥2	40				RT-qPCR	Αίμα/ Πλάσμα	miR-125a	Μείωση		0.0001			
Xu N., 2022 [135]	Κίνα	≥2	20	21	26.41	22.4	RT-qPCR	Αίμα/ Πλάσμα	miR-520a-3p		1.48E-07	6.57E-09	1.48E-07		
									miR-100-5p		12.4101481	0.02878817	0.10251		
									miR-101-3p		0.70623511	0.67274972	0.78912		
									miR-127-3p		76.3589117	0.01062173	0.04938		
									miR-146a-5p		2.00312606	0.46514969	0.67059		

									miR-146b-5p		1.18149929	0.83534061	0.91480		
									miR-155-5p		223.627022	0.00259653	0.01639		
									miR-486-5p		0.87202132	0.8601277	0.92961		
									miR-24-3p		1.60826449	0.52987702	0.71081		
									miR-23a-3p		95.4484556	0.00121073	0.00908		
									miR-361-3p		29.8150594	0.0037326	0.02199		
									miR-320b		0.4011038	0.35605988	0.56490		
									miR-455-5p		25.0130113	0.06849887	0.17954		
									miR-1323		1.27054587	0.92631658	0.96329		
									miR-516b-5p		1.97726375	0.603201	0.75400		
									miR-205-5p		370.610834	0.00940756	0.04605		
									miR-376c-3p		10.0797585	0.34838009	0.55808		
									miR-191-5p		1.44263401	0.65767043	0.78256		
									miR-92a		0.74237725	0.69359217	0.80593		
									miR-148b-3p		0.46850567	0.31694608	0.52471		
									miR-221-3p		1177.70014	3.83E-05	0.00037		
									miR-30d-5p		0.74843555	0.70561117	0.81438		
									miR-99b-5p		3.35759034	0.17988086	0.34918		
									miR-23b-3p		656.543689	3.17E-05	0.00033		
									miR-204-3p		14.2344373	0.26530357	0.46485		
									miR-22-5p		0.76525776	0.88520907	0.94676		
									miR-206		512.4195417	0.000782531	0.0063		
									miR-214-3p		8566539.006	6.75E-10	1.12E-07		
									miR-184		0.872065875	0.945970165	0.96947		
Zhang Q., 2021 [138]	Κίνα	≥3	30	40			RT-qPCR	Ενδομήτριο	miR-155-5p	Μείωση		<0.01			
								Αίμα/Ορός		Μείωση		<0.01			
Zhang Y., 2019 [112]	Κίνα	≥2	9	9	28.37 ± 1.46	29.24 ± 3.17	RT-qPCR	Ενδομητρίο/ Στρωματικά κύτταρα	miR-184	Αύξηση		<0.05			

			9	9	28.78 ± 2.39	29.24 ± 3.17		Ενδομήτριο/ Φονικά κύτταρα		Αύξηση		<0.0001			
			54	14	32.31 ± 1.04	30.62 ± 1.14		Αίμα		Αύξηση		<0.05			
Dong X., 2017 [113]	Κίνα	≥2	11	13	25.30 ± 2.39	26.56 ± 1.63	microarray/ RT-qPCR	Χοριακές λάχνες	miR-520	Αύξηση		<0.05			
Zhao W.,2017 [141]	Κίνα	≥2	40	40	28.8	27.8	RT-qPCR	Ενδομήτριο	miR-365	Αύξηση	6.17	<0.001			
			14	13			microarray		miR-150	Αύξηση		<0.01			
							microarray		miR-10a	Αύξηση		<0.01			
							microarray		miR-27c	Αύξηση		<0.001			
							microarray		miR-30c	Μείωση		<0.001			
							microarray		miR-20	Μείωση		<0.01			
							microarray		miR-24	Μείωση		<0.01			
							microarray		miR-181	Μείωση		<0.01			
Qin W.,2016 [143]	Κίνα	≥3	27	28	29.10 ± 4.22	28.72 ± 4.80	microarray/ RT-qPCR	Αίμα/ Πλάσμα	miR-101-3p	Αύξηση	3.614	0.01932			
									miR-320b	Αύξηση	2.637	0.00218			
									miR-146b-5p	Αύξηση	5.108	0.00869			
									miR-92a	Αύξηση	2.662	0.03084			
									miR-148b-3p	Αύξηση	4.595	0.04343			
									miR-221-3p	Αύξηση	7.409	0.00704			
									miR-30d-5p	Αύξηση	4.361	0.02854			
									miR-99b-5p	Αύξηση	9.743	0.00842			
									miR-23b-3p	Αύξηση	3.43	0.021			
									miR-204-3p	Μείωση	0.394	0.03839			
									miR-22-5p	Μείωση	0.337	0.01717			
									miR-559	Μείωση	0.39	0.01504			

Yan Y., 2023 [146]	Κίνα	≥2	50	50	27.28 ± 3.10	28.35 ± 3.56	RT-qPCR	Αίμα	miR-106b	Αύξηση		<0.05		1.51 ± 0.129	
									miR-93	Αύξηση		<0.05		1.43 ± 0.132	
									miR-25	Αύξηση		<0.05		1.73 ± 0.156	
									miR-146a	Μείωση		<0.05			
									miR-155	Μείωση		<0.05			
									miR-326	όχι σημαντική διαφορά					
Du E., 2019 [148]	Κίνα	≥2	30	30	27.07 ± 3.17	27.43 ± 3.04	RT-qPCR	Χοριακές λάχνες	miR-371a-5p	Μείωση		<0.01		1.14 (M.O.)	0.41
Karami N., 2018 [124]	Ιράν	≥2	25	25	27.52	27.48	RT-qPCR	Αίμα/ Πλάσμα	miR-21	Μείωση		0.04			
								Αίμα/ Μονοκύτταρα		Μείωση		0.02			
								Αίμα/ Πλάσμα	miR-16	όχι σημαντική διαφορά					
								Αίμα/ Μονοκύτταρα		όχι σημαντική διαφορά					
El-Shorafa H.M., 2013 [131]	Παλαιστίνη	≥2	60	40	18-35	18-35	RT-qPCR	Αίμα - Έγκυες μάρτυρες	miR-21	Μείωση	1.5	0.049			
									miR-126	Μείωση	1.6	0.012			
									miR-155	Μείωση	2.3	0.488			
									miR-182	Μείωση	5.6	0.046			
									miR-222	Μείωση	2.4	0.114			
									miR-517	Αύξηση	0.52	0.347			
								Αίμα - Μη έγκυες μάρτυρες	miR-21	Μείωση	2.4	0.011			

									miR-126	Μείωση	2.9	0.006			
									miR-155	Μείωση	12.5	0.054			
									miR-182	Μείωση	1.06	0.953			
									miR-222	Μείωση	2.7	0.001			
									miR-517	Μείωση	11.8	0.037			
Yari H., 2020 [145]	Ιράν	≥2	20	10	18-35	18-35	RT-qPCR	Αίμα/ Πλάσμα	miR-126	Μείωση	0.54	0.002			
HOSSEINI M.K., 2018 [137]	Τουρκία	≥3	16	8	30.23 ± 5.81	28.62 ± 5.24	microarray/ RT-qPCR	Αίμα/ Πλάσμα	miR-let-7c	Μείωση	-2.68	0.0323			
									miR-122	Αύξηση	1.57	0.0241			
									miR-135a	Αύξηση	3.8	0.0249			
								Χοριακές λάχνες	miR-125a-3p	Αύξηση	1.72	0.0258			
									miR-3663-3p	Αύξηση	2.02	0.0075			
									miR-423-5p	κανένα αποτέλεσμα	κανένα αποτέλεσμα	κανένα αποτέλεσμα			
									miR-575	Αύξηση	2.5	0.00029			
Dong F., 2014 [133]	Κίνα	≥2	20	15	28.37 ± 1.46	27.30 ± 1.31	microarray/ RT-qPCR	Χοριακές λάχνες	miR-184	Αύξηση	5.5926		1.59335		
									miR-187	Αύξηση	5.3167		0		
									miR-125b-2- star	Αύξηση	5.0732		1.59335		
									miR-520f	Μείωση	0.1568		2.18348		
									miR-3175	Μείωση	0.1514		0		
									miR-4672	Μείωση	0.1212		0		
								Ενδομήτριο	miR-517c	Αύξηση	9.20394		0		
									miR-519a	Αύξηση	42.3243		0		
									miR-522	Αύξηση	38.3829		0		
									miR-520h	Αύξηση	33.095		0		

									miR-184	Αύξηση	15.8567		0		
Yang Q., 2018 [126]	Κίνα	≥2	16	29	29.9 ± 0.84	28.0 ± 0.92	RT-qPCR	Χοριακές λάχνες	miR-23a-3p	όχι σημαντική διαφορά					
									miR-27a-3p	Αύξηση		<0.05			
									miR-29a-3p	Αύξηση		<0.05			
									miR-100-5p	Αύξηση		<0.01			
									miR-127-3p	όχι σημαντική διαφορά					
									miR-486-5p	όχι σημαντική διαφορά					
								Αίμα/ Πλάσμα	miR-23a-3p	όχι σημαντική διαφορά					
									miR-27a-3p	Αύξηση		<0.05			
									miR-29a-3p	Αύξηση		<0.01			
									miR-100-5p	Αύξηση		<0.01			
									miR-127-3p	Αύξηση		<0.05			
									miR-486-5p	Μείωση		<0.05			
								Αίμα/Ορός	miR-23a-3p	Μείωση		<0.05			
									miR-27a-3p	όχι σημαντική διαφορά					
									miR-29a-3p	όχι σημαντική διαφορά					
									miR-100-5p	όχι σημαντική διαφορά					
									miR-127-3p	Μείωση		<0.05			
									miR-486-5p	Αύξηση		<0.05			
Jairajpuri D.S., 2021 [91]	Μπαχρέιν	≥3	20	20	30.4 ± 3.6	29.4 ± 3.9	microarray	Αίμα/ Πλάσμα	miR-let-7e	Αύξηση	12.144	0.0019			

									miR-221-3p	Αύξηση	9.846	0.0041		
									miR-16	Αύξηση	9.122	0.0024		
									miR-519d	Αύξηση	7.223	0.0044		
									miR-184	Αύξηση	6.816	0.0013		
									miR-410	Αύξηση	5.514	0.0027		
									miR-21	Μείωση	0.347	0.0061		
									miR-125	Μείωση	0.301	0.0051		
									miR-let-7a	Μείωση	0.144	0.0007		
									miR-let-7d	Μείωση	0.121	0.0084		
Tian S., 2020 [142]	Κίνα	≥3	19	16	32.26 ± 0.97	33.20 ± 1.49	RT-qPCR	Χοριακές λάχνες	miR-19b	Μείωση	2.19	0.016		
									miR-494	Αύξηση	2.85	0.021		
									miR-146a	Αύξηση	2.33	0.0199		
									miR-133a	Αύξηση	1.08	0.8526		
									miR-21	Αύξηση	2.07	0.0352		
									miR-125b	Αύξηση	1.76	0.1138		
									miR-196a	Αύξηση	2.17	0.056		
									miR-149	Αύξηση	2.06	0.059		
									miR-17	Αύξηση	1.53	0.23		
Bruno V., 2022 [136]		≥2	20 ασθενείς χωρίς θεραπεία	18	32.7 ± 4.9	35.8 ± 5.2	microarray	Αίμα	miR-184	Αύξηση	79.57	0.000003		
									miR-205-5p	Αύξηση	5.74	0.015287		
									miR-100-5p	Αύξηση	1.87	0.002505		
									miR-34a	Αύξηση	1.7	0.036288		
									miR-376c-3p	Μείωση	-2.07	0.000007		
									miR-29a-3p	Μείωση	-2.34	0.004481		
									miR-155-5p	Μείωση	-3.67	0.008714		

									miR-23a-3p	Μείωση	-4.47	0.000003		
									miR-30d-5p	Μείωση	-6.13	0.000692		
									miR-27a-3p	Μείωση	-8.32	0.000001		
									miR-146a-5p	Μείωση	-11.31	0.000015		
									miR-191-5p	Μείωση	-14.46	0.000125		
									miR-24-3p	Μείωση	-35.57	0.000001		
									miR-206	Μείωση	158.67	0.000002		
									miR-92a-3p	Αύξηση	1.8	0.000317		
									miR-221-3p	Μείωση	-201.16	0.000001		
			18 ασθενείς υπό θεραπεία	18	34.8 ± 4.4				miR-29a-3p	Μείωση	3,61	0.000004		
									miR-23a-3p	Μείωση	-3,29	0.000001		
									miR-24-3p	Αύξηση	1,82	0.000013		
									miR-214-3p	Αύξηση	3,93	0.000049		
Zhao L., 2018 [152]	Κίνα	≥2	29	35	33.3 ± 5.2	33.5 ± 5.3	RT-qPCR	Ενδομήτριο	miR-146a-5p	Μείωση		0.027	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.3
Parhizkar F., 2023 [147]	Ιράν	≥2	40	40	31.2 ± 4.48	29.83 ± 3.91	RT-qPCR	Αίμα	miR-206	Αύξηση		0.0038	1.5 ± 1.068	1.0 ± 0.0645
									miR-30a	Αύξηση		0.0123	1.49 ± 1.209	1.0 ± 0.0833
									miR-18a	Μείωση		0.0101	0.77 ± 0.542	1.0 ± 0.0852
Al-Rubaye S., 2021 [123]	Ιράν	≥2	50	50	<35	<35	RT-qPCR	Αίμα	miR-214-3p	Αύξηση		<0.01		

Πίνακας 1. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα όλων των μελετών. Για κάθε μελέτη παρουσιάζεται ο πρώτος συγγραφέας και το έτος δημοσίευσης, η χώρα διεξαγωγής, τα κριτήρια διάγνωσης των καθ' έξιν αποβολών (δύο ή τρεις και περισσότερες συνεχόμενες αποβολές), ο αριθμός των ασθενών (cases) και των μαρτύρων (controls), που συμμετείχαν, ο μέσος όρος με ή χωρίς τυπική απόκλιση ή το εύρος ή το όριο της ηλικίας των ασθενών και των μαρτύρων σε έτη, η τεχνική ανίχνευσης των miRNA, ο ιστός, στο οποίο ανιχνεύθηκαν, τα διαφορετικά miRNA που μελετήθηκαν, η διαφοροποίηση της έκφρασης των MiRNA στις ασθενείς σε σύγκριση με τις μάρτυρες και οι μεταβλητές fold change, p value, q value και miRNA relative expression για τους ασθενείς και τους μάρτυρες. Ορισμένες μελέτες δεν παρείχαν όλα τα παραπάνω δεδομένα.

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας εντοπίστηκαν συνολικά 84 miRNA, που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά της έκφρασης μεταξύ γυναικών με ιστορικό καθ' ἑξίν αποβολών και μαρτύρων, χωρίς ιστορικό αποβολών. Συγκεκριμένα, αύξηση της έκφρασής τους εμφάνισαν 57 (67,85%) miRNA και μείωση της έκφρασής τους εμφάνισαν 42 (50%) miRNA. Σημειώνεται ότι ορισμένα από τα παραπάνω miRNA εμφάνισαν τόσο αύξηση της έκφρασης σε κάποιες μελέτες, όσο και μείωση της έκφρασης σε κάποιες άλλες.

Πιο αναλυτικά, όσον αφορά τους ιστούς, στους οποίους εντοπίστηκαν, από τα 84 συνολικά miRNA, βρέθηκαν 49 (58,33%) miRNA με στατιστικά σημαντική διαφορά έκφρασης μεταξύ ασθενών και μαρτύρων στο περιφερικό αίμα, μεταξύ των οποίων 30 (35,71%) έδειξαν αύξηση και 29 (34,52%) έδειξαν μείωση της έκφρασης. Επιπλέον, εντοπίστηκαν 28 (33,33%) miRNA με στατιστικά σημαντική διαφορά έκφρασης στους ιστούς χοριακών λαχνών, από τα οποία 16 (19,04%) εμφάνισαν αύξηση της έκφρασης και 12 (14,28%) εμφάνισαν μείωση της έκφρασής τους. Τέλος, εντοπίστηκαν συνολικά 26 (30,95%) miRNA με στατιστικά σημαντική διαφορά έκφρασης στους ιστούς του ενδομητρίου, από τα οποία 22 (26,19%) εμφάνισαν αύξηση της έκφρασης και 5 (5,95%) εμφάνισαν μείωση της έκφρασής τους.

3.2 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα μελετών

Οι *Karami et al., 2018* μελέτησαν την έκφραση των miR-16 και miR-21 σε περιστατικά καθ' ἑξίν αποβολών, τα οποία σχετίζονται με την αγγειογένεση κατά την κύηση. Σε αυτήν την έρευνα ασθενών-μαρτύρων συλλέχθηκαν δείγματα αίματος από γυναίκες ασθενείς με ιστορικό καθ' ἑξίν αποβολών και γυναίκες μάρτυρες με τουλάχιστον μία επιτυχημένη κύηση, χωρίς προηγούμενο ιστορικό αποβολών. Καμία από τις ασθενείς δεν είχε αυτοάνοση/μεταβολική νόσο, ανατομικές ή χρωμοσωμικές ανωμαλίες και λοιμώξεις. Από τα δείγματα απομονώθηκε RNA με τη χρήση RT-qPCR και βρέθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης του miR-21, τόσο στο πλάσμα όσο και στα μονοκύτταρα του αίματος των ασθενών σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα στους μάρτυρες. Ωστόσο, καμία στατιστική διαφορά δε βρέθηκε στα επίπεδα έκφρασης του miR-16 μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Προτάθηκε, λοιπόν, ότι η μείωση της έκφρασης του miR-21 μπορεί να σχετίζεται με την αιτιολογία και εξέλιξη των καθ' ἑξίν αποβολών.

Οι *Li et al., 2016* ερεύνησαν την έκφραση 6 miRNA στα Φυσικά Φονικά Κύτταρα ή NK κύτταρα (Natural Killer Cells) της στιβάδας του ενδομητρίου γυναικών με ιστορικό καθ' ἑξίν αποβολών και γυναικών μαρτύρων με μία επιτυχημένη κύηση και καμία προηγούμενη αποβολή. Καμία από τις ασθενείς δεν έπασχε από αυτοάνοσα νοσήματα, ανατομικές, ορμονικές, χρωμοσωμικές ανωμαλίες ή λοιμώξεις. Τα NK κύτταρα απομονώθηκαν με κυτταρομετρία ροής και η έκφραση των miRNA υπολογίστηκε με τη χρήση RT-qPCR. Συνολικά, 5 miRNA, τα miR-34a, miR-155, miR-141, miR-125a και miR-125b, παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση στα δείγματα των ασθενών συγκριτικά με αυτά των μαρτύρων, ενώ η έκφραση του miR-24 μειώθηκε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό στις ασθενείς συγκριτικά με τους μάρτυρες. Επιπλέον, τρία από τα παραπάνω miRNA, τα miR-34a, miR-141

και miR-24, μελετήθηκαν για την δυνατότητα πρόγνωσης των γονιδίων στόχων τους και αναγνωρίστηκαν πάνω από 140 σηματοδοτικά μονοπάτια, στα οποία συμμετέχουν τα εν λόγω γονίδια. Μεταξύ αυτών, τα σημαντικότερα ήταν το μονοπάτι PI3K-Akt και το MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), που παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική επιβίωση, διαφοροποίηση, απόπτωση και μετανάστευση. Τα ευρήματα της έρευνας προτείνουν πιθανούς μελλοντικούς διαγνωστικούς και προγνωστικούς βιοδείκτες για τις καθ' έξιν αποβολές, καθώς και νέες στρατηγικές θεραπείας τους.

Οι *Al-Rubaye et al., 2021* μελέτησαν τα γονίδια BAX και MEG3 και το miR-214-3p, που εμπλέκονται στα σηματοδοτικά μονοπάτια απόπτωσης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Για τον σκοπό αυτό, απομόνωσαν RNA με τη χρήση RT-PCR από δείγματα αίματος ασθενών με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών, ένα με δύο μήνες μετά την τελευταία αποβολή τους και από δείγματα μαρτύρων (controls) με τουλάχιστον μία επιτυχημένη κύηση και καμία αποβολή στο ιατρικό ιστορικό τους. Τα αποτελέσματα έδειξαν την στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου BAX και του miR-214-3p, αλλά και τη μείωση της έκφρασης του γονιδίου MEG3. Συμπερασματικά, προτάθηκε ότι η έκφραση των παραπάνω έχει προοπτικές να χρησιμοποιηθεί για την καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών των καθ' έξιν αποβολών αλλά και ως διαγνωστικός βιοδείκτης για αυτές.

Οι *Yang et al., 2018* ερεύνησαν την έκφραση των miR-23a-3p, miR-27a-3p, miR-29a-3p, miR-100-5p, miR-127-3p και miR-486-5p και τη χρήση τους ως πιθανούς βιοδείκτες για τις καθ' έξιν αποβολές και τις επαναλαμβανόμενες αποτυχίες εμφύτευσης μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση. Συγκεκριμένα, απομόνωσαν RNA με τη χρήση qPCR από δείγματα χοριακών λαχνών, ενδομητρίου και αίματος (ορό και πλάσμα) γυναικών με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών και γυναικών μαρτύρων, που δεν είχαν ιστορικό αποβολών και είχαν προβεί σε νόμιμο τερματισμό της κύησης. Παράγοντες κινδύνου, όπως μη φυσιολογικός καρυότυπος, λοιμώξεις, διαβήτη, υπερπρολακτιναιμία, θυρεοειδικές δυσλειτουργίες και ανατομικές ανωμαλίες αποκλείστηκαν για όλες τις περιπτώσεις των ασθενών. Στα δείγματα χοριακών λαχνών φάνηκε στατιστικά σημαντικά αυξημένη έκφραση των miR-27a-3p, miR-29a-3p και miR-100-5p, ενώ η έκφραση των miR-127-3p και miR-486-5p μειώθηκε σημαντικά στις γυναίκες ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες. Επιπλέον, στα δείγματα πλάσματος περιφερικού αίματος η έκφραση των miR-27a-3p, miR-29a-3p, miR-100-5p και miR-127-3p αυξήθηκε, ενώ του miR-486-5p μειώθηκε στατιστικά σημαντικά στις γυναίκες ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες. Αντίθετα, στον ορό αίματος η έκφραση των miR-23a-3p και miR-127-3p μειώθηκε και αυτή του miR-486-5p αυξήθηκε σημαντικά. Από τα παραπάνω προτάθηκε η πιθανή χρήση των κυκλοφορόντων στο περιφερικό αίμα miR-23a-3p, miR-27a-3p, miR-29a-3p, miR-100-5p, miR-127-3p και miR-486-5p ως διαγνωστικούς και προγνωστικούς βιοδείκτες για τις καθ' έξιν αποβολές και την πρόβλεψη της έκβασης των προσπαθειών εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Οι *Wang et al., 2016* μελέτησαν τη διαφορά έκφρασης σε 41 miRNA σε κύτταρα χοριακών λαχνών και ενδομητρίου γυναικών με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών σε σύγκριση με γυναίκες μάρτυρες χωρίς ιστορικό αποβολών. Κλασσικοί παράγοντες κινδύνου αποκλείστηκαν για όλα τα περιστατικά αποβολών. Το RNA στα δείγματα μελετήθηκε με τη

μέθοδο της RT-qPCR και βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση 8 miRNA μεταξύ των δύο υπό μελέτη ομάδων. Συνολικά, 32 miRNA βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αυξημένα στα κύτταρα του ενδομητρίου των ασθενών. Αντίθετα, μόλις 9 miRNA βρέθηκαν να έχουν διαφορά στην έκφραση στα κύτταρα χοριακών λαχνών των ασθενών συγκριτικά με αυτά των μαρτύρων, συμπεριλαμβανομένων των miR-191-5p, miR-24-3p, miR-100-5p και miR-146a-5p, που έδειξαν αύξηση και των miR-1, miR-372, miR-371a-5p, miR-376c-3p και miR-486-5p, που έδειξαν μείωση. Οι συγγραφείς υποδεικνύουν την πιθανή συμμετοχή των παραπάνω miRNA σε σηματοδοτικά μονοπάτια στις καθ' έξιν αποβολές και προτείνουν την περαιτέρω μελέτη αυτών για την κατανόηση του μηχανισμού παθογένεσης των αποβολών.

Οι *Jairajpuri et al.* το 2021 συσχέτισαν το μοτίβο έκφρασης των miRNA στο πλάσμα των γυναικών με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών. Για τις γυναίκες με καθ' έξιν αποβολές αποκλείστηκαν πιθανοί παράγοντες κινδύνου, ενώ οι μάρτυρες ήταν γυναίκες με τουλάχιστον δύο επιτυχημένες κυήσεις, χωρίς ιστορικό αποβολών. Το RNA απομονώθηκε από τα δείγματα και αναλύθηκε με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών. Από την ανάλυση εντοπίστηκαν 10 miRNA με σημαντική διαφορά της έκφρασης μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Από αυτά, τα let-7e, miR-221-3p, miR-16, miR-519d, miR-184 και miR-410 παρουσίασαν αύξηση της έκφρασής τους, ενώ τα miR-21, miR-125, let-7a και let-7d παρουσίασαν μείωση της έκφρασης στις ασθενείς σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Η συγκεκριμένη μελέτη, λοιπόν, προτείνει τα παραπάνω miRNA ως πιθανούς μη επεμβατικούς διαγνωστικούς και προγνωστικούς βιοδείκτες για τις καθ' έξιν αποβολές.

Οι *Tutunfroush et al.* το 2022 ποσοτικοποίησαν τα miR-23a-3p, miR-101-3p και miR-let-7c, σε δείγματα πλάσματος ασθενών με ιδιοπαθείς καθ' έξιν αποβολές και υγιείς γυναίκες χωρίς ιστορικό αποβολών με σκοπό τη διερεύνηση της πιθανής διαγνωστικής τους αξίας. Οι γυναίκες που διαγνώστηκαν με παθολογίες που αποτελούν κλασσικούς παράγοντες κινδύνου εξαιρέθηκαν από τη μελέτη, ενώ οι μάρτυρες είχαν τουλάχιστον μία επιτυχημένη κύηση. Η ποσοτικοποίηση των miRNA έγινε με τη χρήση της RT-qPCR και τα αποτελέσματα υπέδειξαν την στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης των miR-101-3p και miR-let-7c στα δείγματα των ασθενών, συγκριτικά με τα δείγματα των μαρτύρων. Επιπλέον, αποδείχτηκε η αρνητική συσχέτιση των miR-23a-3p και miR-let-7c για ένα σημαντικό αριθμό αποβολών. Η παρούσα μελέτη συσχετίζει, έτσι, τη μείωση της έκφρασης των παραπάνω miRNA με τις ιδιοπαθείς καθ' έξιν αποβολές.

Οι *El-Shorafa et al.*, 2013 μελέτησαν την έκφραση των miR-21, miR-126, miR-155, miR-182, miR-222 και miR-517 σε γυναίκες με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών και γυναίκες μάρτυρες, χωρίς ιστορικό αποβολών και με δύο τουλάχιστον επιτυχημένες κυήσεις. Σε κάθε ομάδα οι μισές γυναίκες ήταν έγκυες στο πρώτο τρίμηνο εγκυμοσύνης και άλλες μισές γυναίκες δεν ήταν έγκυες κατά τη λήψη των δειγμάτων. Δείγματα αίματος λήφθηκαν από όλες τις γυναίκες και τα miRNA από πλάσμα του αίματος αναλύθηκαν με τη χρήση της RT-qPCR. Μεταξύ εγκύων ασθενών και μαρτύρων, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης των miR-21, miR-126 και miR-182. Αντίστοιχα, για τις μη έγκυες γυναίκες, στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης φάνηκε στα miR-21, miR-126, miR-222 και miR-517 στις ασθενών σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Συμπερασματικά, τουλάχιστον τα miR-21

και miR-126 μπορούν να αποτελέσουν διαγνωστικό βιοδείκτη για τις αποβολές τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης.

Οι *Abbaskhania et al.* το 2022, πραγματοποίησαν μελέτη της έκφρασης των γονιδίων BCL-2 και SRA (Steroid Receptor RNA Activator) lncRNA, καθώς και του miR-361-3p, που παίζουν ρόλο στην απόπτωση κατά την κύηση. Δείγματα αίματος λήφθηκαν από γυναίκες με ιστορικό καθ' ἑξιν αποβολών και γυναίκες μάρτυρες χωρίς προηγούμενο ιστορικό αποβολών και τα μόρια στόχοι μελετήθηκαν με τη χρήση της RT-qPCR. Γυναίκες που έπασχαν από κλασσικούς παράγοντες κινδύνου αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης των γονιδίων BCL-2 και lncRNA SRA και στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης του miR-361-3p στα δείγματα των ασθενών σε σύγκριση με τα δείγματα των μαρτύρων. Οι συγγραφείς πρότειναν την πιθανή συμμετοχή των lncRNA στα σηματοδοτικά μονοπάτια απόπτωσης στις καθ' ἑξιν αποβολές και την πιθανή χρήση του miR-361-3p ως διαγνωστικό βιοδείκτη για αυτές.

Οι *Dong et al.*, 2014 ερεύνησαν την έκφραση πλήθους miRNA από δείγματα χοριακών λαχνών και ενδομητρίου γυναικών με καθ' ἑξιν αποβολές και γυναικών μαρτύρων που πραγματοποίησαν νόμιμο τερματισμό κύησης για μη ιατρικούς λόγους. Η ανάλυση των miRNA που μελετήθηκαν έγινε με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών και κάποια δείγματα επιβεβαιώθηκαν με τη χρήση RT-qPCR. Όσον αφορά τα δείγματα του ενδομητρίου τα miR-184, miR-187 και miR-125b-2 έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης, ενώ η έκφραση των miR-520f, miR-3175 και miR-4672 μειώθηκε στατιστικά σημαντικά στις ασθενείς σε σύγκριση με τις μάρτυρες. Στα κύτταρα των χοριακών λαχνών τα miR-517c, miR-519a-1, miR-522, miR-520h και miR-184 εμφάνισαν σημαντική αύξηση στις ασθενείς συγκριτικά με τις μάρτυρες. Τα παραπάνω miRNA φάνηκε να έχουν γονίδια στόχους που εμπλέκονται στην εμφύτευση, την απόπτωση και την αγγειογένεση και μπορούν πιθανότατα να μελετηθούν περαιτέρω για τη διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών των αποβολών.

Οι *Manzoor et al.*, 2022 τους πολυμορφισμούς και την έκφραση του miR-125a μεταξύ γυναικών με καθ' ἑξιν αποβολές και γυναικών μαρτύρων με τουλάχιστον δύο φυσιολογικές εγκυμοσύνες χωρίς ιστορικό αποβολών. Οι γυναίκες ελέγχθηκαν ώστε να αποκλειστεί οποιοσδήποτε από τους κλασσικούς παράγοντες αποβολής. Ο προσδιορισμός της έκφρασης του miR-125a έγινε σε δείγματα πλάσματος με τη χρήση της RT-qPCR. Στα αποτελέσματα φάνηκε μεταξύ άλλων η στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης του miR-125a στις γυναίκες με ιστορικό καθ' ἑξιν αποβολών συγκριτικά με τις μάρτυρες, γεγονός που δείχνει το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει το συγκεκριμένο miRNA στην αιτιοπαθογένεση των καθ' ἑξιν αποβολών.

Οι *Xu et al.*, 2022 ανέλυσαν τα miRNA στο πλάσμα και τα mRNA στον πλακούντα γυναικών με καθ' ἑξιν αποβολές και γυναικών μαρτύρων που πραγματοποίησαν νόμιμο τερματισμό της κύησης για μη ιατρικούς λόγους. Όλες οι ασθενείς ελέγχθηκαν για να αποκλειστούν κλασσικοί παράγοντες κινδύνου αποβολών. Η ανάλυση με τη χρήση RT-qPCR έδειξε ότι 108 miRNA και 1199 mRNAs είχαν διαφορά στην έκφραση στις ασθενείς σε σχέση με τις μάρτυρες. Επιπλέον, τα mRNA-στόχοι των miR-766-5p, miR-1285-3p, and miR-520a-3p, που έδειξαν διαφορετική έκφραση στο πλάσμα, μεταβλήθηκαν αντίστοιχα σε έκφραση

στον πλακούντα. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν την εμπλοκή των κυκλοφορόντων στο αίμα miRNA και την πιθανή δυνατότητα χρήσης τους ως βιοδείκτες στις καθ' έξιν αποβολές.

Οι *Bruno et al., 2022* μελέτησαν τα πιθανά αποτελέσματα της θεραπείας με χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνη (low molecular weight heparin, LMWH) σε περιστατικά καθ' έξιν αποβολών, ερευνώντας τη διαφορά στην έκφραση των miRNA στο πλάσμα του αίματος. Για το σκοπό αυτό έλαβαν δείγματα από τρεις ομάδες γυναικών: γυναίκες με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών που είχαν λάβει θεραπεία με LMWH, γυναίκες με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών που δεν είχαν λάβει τη θεραπεία και γυναίκες μάρτυρες που δεν είχαν ιστορικό αποβολών και δεν είχαν λάβει κάποια θεραπεία. Από την έρευνα εξαιρέθηκαν γυναίκες που διαγνώστηκαν με παράγοντες προδιάθεσης των αποβολών. Η ανάλυση των miRNA έγινε με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών. Μεταξύ άλλων βρέθηκε ότι η έκφραση των miR 374a-5p, 19a-3p, 30e-5p, 128-3p, 155-5p and 200c-3p εμφάνισε διαφορά μεταξύ των γυναικών με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών που δεν είχαν λάβει θεραπεία και των μαρτύρων, αλλά και ότι η θεραπεία με LMWH βοήθησε στην επαναφορά των επιπέδων έκφρασης τους στα επίπεδα αναφοράς των μαρτύρων. Έτσι, η θεραπεία με LMWH μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διατηρήσει στα φυσιολογικά επίπεδα την έκφραση ορισμένων miRNA, που φαίνονται να απορρυθμίζονται σε περιστατικά καθ' έξιν αποβολών.

Οι *Hosseini et al.* το 2018 σύγκριναν την έκφραση των miRNA σε δείγματα αίματος και πλακούντα γυναικών με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών και γυναικών που πραγματοποίησαν νόμιμο τερματισμό τις κύησης για μη ιατρικούς λόγους. Η διαφορά της έκφρασης των miRNA εντοπίστηκε με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών και τα miRNA με διαφορετική έκφραση αξιολογήθηκαν στη συνέχεια με RT-qPCR. Τα αποτελέσματα έδειξαν την αύξηση της έκφρασης σε 4 miRNA, τα miR-125a-3p, miR-3663-3p, miR-423-5p και miR-575, στον πλακούντα των ασθενών σε σύγκριση με τα δείγματα των μαρτύρων. Στα δείγματα πλάσματος του αίματος 2 miRNA, τα let-7c και miR-122 έδειξαν αύξηση έκφρασης και το miR-135a έδειξε μείωση. Τα γονίδια-στόχοι των παραπάνω miRNA συμμετέχουν σε διαδικασίες, όπως η κυτταρική διαφοροποίηση και μετανάστευση, η αγγειογένεση και η απόπτωση και μπορεί να σχετίζονται με την παθογένεση στα περιστατικά αποβολών.

Οι *Zhang et al., 2021* μελέτησαν τα επίπεδα έκφρασης του miR-155-5p και το ρόλο του στην επιβίωση των κυττάρων του ενδομητρίου μέσω της σηματοδότησης του μονοπατιού NF-κB. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκαν δείγματα αίματος και ιστού ενδομητρίου από γυναίκες με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών (τουλάχιστον 3 συνεχόμενες αποβολές) και γυναίκες με φυσιολογική κύηση και τα επίπεδα έκφρασης του miR-155-5p ανιχνεύθηκαν με RT-qPCR. Τα αποτελέσματα έδειξαν τη μείωση της έκφρασης του miR-155-5p τόσο στον ορό του περιφερικού αίματος όσο και στον ιστό του ενδομητρίου για τις ασθενείς σε σύγκριση με τις μάρτυρες. Επιπλέον, αποδείχτηκε ότι η υπερέκφραση του miR-155-5p μειώνει την έκκριση των φλεγμονωδών κυτοκινών, συμπεριλαμβανομένου των IL-6, IFN-g, TNF-α και IL-10, στα κύτταρα του ενδομητρίου. Τα παραπάνω προτείνουν ότι το miR-155-5p προάγει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ενδομητρίου, αλλά και την απόπτωσή τους μέσω της σηματοδότησης του NF-κB στα περιστατικά καθ' έξιν αποβολών.

Οι *Zhang et al., 2019* απέδειξαν την προαγωγή της απόπτωσης και την καταστολή του πολλαπλασιασμού των τροφοβλαστικών κυττάρων από το miR-184, σε περιστατικά καθ' έξιν αποβολών. Δείγματα περιφερικού αίματος και ιστού του ενδομητρίου λήφθηκαν από γυναίκες με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών, που είχαν παρουσιάσει τουλάχιστον 2 συνεχόμενες αποβολές και γυναίκες που πραγματοποίησαν νόμιμο τερματισμό της κύησης για μη ιατρικούς λόγους. Η ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης του miR-184 πραγματοποιήθηκε με τη χρήση RT-qPCR. Από τα αποτελέσματα φαίνεται η στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του miR-184 σε όλα τα δείγματα για τις γυναίκες με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών σε σχέση με τις μάρτυρες, γεγονός που υπογραμμίζει τον κομβικό ρόλο του στη διατήρηση της εγκυμοσύνης και την πιθανή δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικός και θεραπευτικός δείκτης στις καθ' έξιν αποβολές.

Οι *Tian et al., 2020* ερεύνησαν την υπερέκφραση του γονιδίου PTEN σε περιστατικά καθ' έξιν αποβολών, που καθορίζεται από την έκφραση των miR-19b και miR-494. Οι ερευνητές απομόνωσαν ιστό χοριακών λαχνών από ασθενείς με ιστορικό δύο τουλάχιστον συνεχόμενων αποβολών χωρίς σαφή αιτία και από γυναίκες, με τουλάχιστον μια επιτυχημένη κύηση, χωρίς ιστορικό αποβολών, που πραγματοποίησαν νόμιμο τερματισμό της κύησης. Η έκφραση των miRNA ανιχνεύθηκε με τη χρήση RT-qPCR και του γονιδίου PTEN με την τεχνική Western blotting. Αποδείχτηκε, μεταξύ άλλων, στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης των miR-494, miR-146a και miR-21 και στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης του miR-19b στα περιστατικά καθ' έξιν αποβολών συγκριτικά με τις μάρτυρες. Επιπλέον, φάνηκε ότι η αύξηση της έκφρασης του miR-19b συνδυαστικά με τη μείωση της έκφρασης του miR-494 μπορούν να καθορίσουν την έκφραση του PTEN. Συμπερασματικά, οι ερευνητές προτείνουν τον κρίσιμο ρόλο που παίζει το PTEN, η έκφραση του οποίου καθορίζεται από τα miR-19b και miR-494, στη μη φυσιολογική λειτουργία των τροφοβλαστικών κυττάρων στα περιστατικά καθ' έξιν αποβολών.

Οι *Qin et al. 2016* σύγκριναν την έκφραση των κυκλοφορούντων miRNA στο αίμα γυναικών με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών (τουλάχιστον 3 συνεχόμενες αποβολές) και γυναικών χωρίς προηγούμενο ιστορικό αποβολών, στο αρχικό στάδιο της εγκυμοσύνης. Η ανίχνευση της έκφρασης των miRNA ελέγχθηκε με τη χρήση μικροσυστοιχειών και 6 miRNA, με διαφορετική έκφραση μεταξύ των δύο ομάδων γυναικών, επιλέχθηκαν για ανάλυση με RT-qPCR για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Βάσει των αποτελεσμάτων της RT-qPCR υπήρξε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης των miR-320b, miR-146b-5p, miR-221-3p και miR-559 και στατιστικά σημαντική μείωση του miR-101-3p στα δείγματα των περιστατικών καθ' έξιν αποβολών σε σύγκριση με τα δείγματα των μαρτύρων. Τα παραπάνω προτείνουν ότι τα κυκλοφορόντα miRNA στο αίμα των γυναικών μπορεί να εμπλέκονται στην παθογένεση των καθ' έξιν αποβολών και να αποτελούν αξιόλογο διαγνωστικό βιοδείκτη για αυτές.

Οι *Yari et al. 2020*, μελέτησαν την έκφραση του miR-126 σε δείγματα αίματος γυναικών με τουλάχιστον δύο συνεχόμενες αποβολές και γυναικών με τουλάχιστον δύο επιτυχημένες κύσεις χωρίς προηγούμενο ιστορικό αποβολών. Η ανίχνευση της έκφρασης του miR-126 στο πλάσμα του αίματος έγινε με τη χρήση RT-qPCR. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν την

στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης του miR-126, γεγονός που προτείνει την πιθανή χρήση του ως διαγνωστικό και προγνωστικό βιοδείκτη στις καθ' έξιν αποβολές.

Οι *Yan et al., 2023*, μελέτησαν τη συσχέτιση των T-κυττάρων και της έκφρασης ορισμένων miRNA με τις καθ' έξιν αποβολές. Στη μελέτη συμμετείχαν γυναίκες με δύο τουλάχιστον συνεχόμενες αποβολές, για τις οποίες δεν είχε διαγνωστεί κάποιος από τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου και δεν είχε παρατηρηθεί καμία ανωμαλία στο σπέρμα του συζύγου, καθώς και γυναίκες χωρίς ιστορικό καθ' έξιν αποβολών με φυσιολογικές κυήσεις. Όλες οι γυναίκες επιλέχθηκαν τυχαία και για τις δύο ομάδες και λήφθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος. Η ανάλυση της έκφρασης των miRNA έγινε με τη χρήση RT-qPCR. Μεταξύ άλλων, βρέθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης των miR-106b, miR-93 και miR-25 και μειωμένη έκφραση των miR-146a και miR-155 στα δείγματα των ασθενών συγκριτικά με τα δείγματα των μαρτύρων, κάτι που υποδεικνύει τη δυνατότητα χρήσης των miRNA ως διαγνωστικούς βιοδείκτες για την αντιμετώπιση των καθ' έξιν αποβολών.

Οι *Parhizkar et al., 2023* ερεύνησαν τα μόρια που σχετίζονται με τον καταβολισμό του ATP και την υποξία, πέραν της έκφρασης των σχετιζόμενων με αυτά miRNA, σε ασθενείς με καθ' έξιν αποβολές. Στα πλαίσια της μελέτης, διερευνήθηκε και η έκφραση των σχετιζόμενων miRNA. Για το σκοπό αυτό λήφθηκαν δείγματα αίματος από γυναίκες με ιστορικό δύο τουλάχιστον συνεχόμενων αποβολών και από γυναίκες μάρτυρες, που δεν είχαν ιστορικό αποβολών. Από την ομάδα των ασθενών με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών εξαιρέθηκαν οι ασθενείς που είχαν διαγνωστεί με ενδοκρινικές, γενετικές ανωμαλίες και λοιμώξεις. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε RT-qPCR για την μελέτη της έκφρασης των γονιδίων HIF-1α, CD39, CD73, miR-18a, miR-206 και miR-30a. Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης των miR-206 και miR-30a, αλλά και στατιστικά σημαντική μείωση του miR-18a στα δείγματα των ασθενών σε σχέση με των μαρτύρων. Παράλληλα, παρατηρήθηκε απορρύθμιση της έκφρασης των HIF-1α, CD39 και CD73, που σχετίζονται με τον καταβολισμό του ATP και την υποξία. Το γεγονός αυτό σχετίζεται με την απορρύθμιση της έκφρασης των παραπάνω miRNA και καταδεικνύει την πιθανή δυνατότητα χρήσης τους ως προγνωστικούς δείκτες των καθ' έξιν αποβολών.

Οι *Du et al., 2019* μελέτησαν την έκφραση του miR-371a-5p και τον τρόπο με τον οποίο επηρεάζει τον αναστολέα κασπάσης XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), που εμπλέκεται στο μηχανισμό απόπτωσης, σε περιστατικά καθ' έξιν αποβολών. Οι ερευνητές έλαβαν δείγματα χοριακών λαχνών από ασθενείς με ιστορικό 2 τουλάχιστον συνεχόμενων αποβολών και γυναικών που είχαν τουλάχιστον μία επιτυχημένη κύηση και καμία αποβολή στο ιατρικό ιστορικό τους. Τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της έκφρασης του miR-371a-5p με τη χρήση RT-qPCR. Από τα αποτελέσματα φαίνεται η στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης, τόσο του miR-371a-5p, όσο και του γονιδίου XIAP και προτείνεται ο κύριος ρόλος του miR-371a-5p στο μονοπάτι απόπτωσης XIAP-caspase-3, που εμπλέκεται στο μηχανισμό παθογένεσης των καθ' έξιν αποβολών.

Οι *Geng et al., 2022* ερεύνησαν την έκφραση των miR-33a, miR-33b και miR-181a, καθώς και τα κύτταρα Treg του ανοσοποιητικού συστήματος και τη σχέση τους με τις καθ' έξιν αποβολές. Συλλέξαν, λοιπόν, δείγματα ιστού χοριακών λαχνών από γυναίκες με τρεις

τουλάχιστον συνεχόμενες αποβολές, χωρίς κάποιον κλασικό παράγοντα προδιάθεσης και από γυναίκες που πραγματοποίησαν τερματισμό κύησης για μη ιατρικούς σκοπούς και δεν είχαν ιστορικό αποβολών. Τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση των κυττάρων Treg και στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης των miR-33a, miR-33b και miR-181a στα T κύτταρα των ασθενών σε σύγκριση με τις μάρτυρες. Συμπερασματικά, η έρευνα προτείνει την απορρύθμιση της έκφρασης των παραπάνω miRNA ως πιθανή αιτιολογία των καθ' έξιν αποβολών και τη χρήση των στοιχείων αυτών σε επόμενες μελέτες για θεραπευτικούς σκοπούς.

Οι *Dong et al.* το 2017 πρότειναν ότι το miR-520 προάγει την απόπτωση των τροφοβλαστικών κυττάρων, στοχεύοντας στο γονίδιο PARP1, σε περιστατικά καθ' έξιν αποβολών. Κατά τη διεξαγωγή της μελέτης λήφθηκαν δείγματα χοριακών λαχνών από γυναίκες με ιστορικό τουλάχιστον δυο συνεχόμενων αποβολών και από γυναίκες που τερμάτισαν τη κύηση για μη ιατρικούς λόγους. Η εξαγωγή του ολικού RNA έγινε με τη μέθοδο των μικροσυστοιχειών και στη συνέχεια η ανίχνευση της έκφρασης του miR-520 έγινε με τη χρήση RT-qPCR. Βρέθηκε, μεταξύ άλλων, η στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του miR-520 στα δείγματα των γυναικών με καθ' έξιν αποβολές συγκριτικά με τα δείγματα των μαρτύρων. Ακόμη, μέσω κυτταρομετρία ροής συσχετίστηκε η έκφραση του miR-520 με την απόπτωση των τροφοβλαστικών κυττάρων *in vitro* και τη μείωση της έκφρασης του PARP1, κάτι που αποδεικνύει την συσχέτιση της έκφρασης του miR-520 με τις καθ' έξιν αποβολές μέσω της προαγωγής της απόπτωσης, στοχεύοντας το PARP1.

Στο μηχανισμό απόπτωσης των τροφοβλαστικών κυττάρων αναφέρθηκαν και οι *Zhao et al., 2017*, που πρότειναν τη συσχέτισή του με την έκφραση του miR-365 στα περιστατικά καθ' έξιν αποβολών. Οι ερευνητές έλαβαν δείγματα χοριακών λαχνών από γυναίκες με ιστορικό 2 τουλάχιστον συνεχόμενων αποβολών και από γυναίκες που τερμάτισαν την κύηση για μη ιατρικούς λόγους. Όλα τα περιστατικά αποβολών ελέγχθηκαν για να αποκλειστούν οι συχνότεροι παράγοντες κινδύνου, όπως χρωμοσωμικές και ανατομικές ανωμαλίες, ενδοκρινικοί και άλλοι παράγοντες. Η ανίχνευση της έκφρασης, που έγινε με τη χρήση μικροσυστοιχιών, αποκάλυψε τη στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του miR-365 στα δείγματα των ασθενών σε σύγκριση με τα δείγματα των μαρτύρων. Η αύξηση αυτή μπορεί να συνεισφέρει στο μοριακό μηχανισμό των καθ' έξιν αποβολών, αποτελώντας πιθανό προγνωστικό και θεραπευτικό βιοδείκτη για αυτές.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας αναδεικνύει τον σημαντικό ρόλο των miRNA στις καθ' έξιν αποβολές. Οι καθ' έξιν αποβολές απασχολούν ένα μεγάλο αριθμό ζευγαριών, αλλά δυστυχώς, σε ποσοστό 50% των γυναικών, που τις βιώνουν τα αίτια παραμένουν αδιάγνωστα [44]. Οι παραπάνω μελέτες αναδεικνύουν τη συμμετοχή των miRNA σε σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια, που αφορούν την ανάπτυξη και διαφοροποίηση της τροφοβλάστης, την ενεργοποίηση και εμφύτευση του εμβρύου, την ανοσοανοχή και την

δεκτικότητα του ενδομητρίου. Η απορρύθμιση της έκφρασής τους φαίνεται να επιφέρει σοβαρές συνέπειες στις διαδικασίες αυτές, αποτελώντας αιτία αποβολών. Για τον λόγο αυτό η χρήση της έκφρασης ορισμένων καλά μελετημένων miRNA σε γυναίκες με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών έχει προοπτικές για την εύρεση νέων μη επεμβατικών προγνωστικών και διαγνωστικών βιοδεικτών στις καθ' έξιν αποβολές [95].

Οι *Zhang et al., 2021* απέδειξαν ότι η υπερέκφραση του miR-155-5p μειώνει την έκκριση των φλεγμονωδών κυτοκινών στα κύτταρα του ενδομητρίου, προάγοντας την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους, ενώ αντίθετα η μείωση της έκφρασής του σε γυναίκες με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών οδηγεί στην απόπτωσή τους, μέσω της σηματοδότησης του NF-κΒ μονοπατιού [138]. Την έκφραση του miR-155 μελέτησαν, επίσης, οι *Yan et al. 2023* σε T-κύτταρα, καθώς και οι *Li et al., 2016* σε NK κύτταρα του ενδομητρίου γυναικών με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών. Τα αποτελέσματα των δύο μελετών συμφωνούν ως προς την αύξηση της έκφρασης του miR-155 στις γυναίκες, που εμφάνισαν αποβολές, με τους ερευνητές να προτείνουν τη δυνατότητα χρήσης του συγκεκριμένου miRNA ως πιθανό μελλοντικό βιοδείκτης για τις καθ' έξιν αποβολές και τη χρήση του για νέες στρατηγικές θεραπείας τους [146,125].

Στην περίπτωση του miR-21, τα αποτελέσματα των μελετών φαίνεται να συγκρούονται. Οι *Karami et al., 2018* συσχέτισαν τη στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης του miR-21, τόσο στο πλάσμα όσο και στα μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος με την αιτιολογία και εξέλιξη των καθ' έξιν αποβολών [124]. Τα αποτελέσματα αυτά συμβαδίζουν με τα αποτελέσματα των *El-Shorafa et al., 2013*, οι οποίοι υπέδειξαν τη μείωση της έκφρασης του miR-21 σε γυναίκες με ιστορικό αποβολών ως διαγνωστικό βιοδείκτη τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης [131]. Αντίθετα, οι *Tian et al., 2020*, αλλά και οι *Jairajpuri et al., 2021* παρατήρησαν την αύξηση της έκφρασης του συγκεκριμένου miRNA σε γυναίκες με ιστορικό καθ' έξιν αποβολών και έτσι πρότειναν την αύξηση αυτή ως πιθανό μη επεμβατικό βιοδείκτη των καθ' έξιν αποβολών [142,91].

Τα αποτελέσματα των μελετών δείχνουν να μη συμφωνούν και για το αρκετά μελετημένο miR-146a. Οι *Wang et al., 2016* μελετώντας τη διαφοροποίηση της έκφρασής του σε ιστούς χοριακών λαχνών και ενδομητρίου γυναικών με καθ' έξιν αποβολές, σημείωσαν την αύξηση της έκφρασης και υποστήριξαν τη συμμετοχή του σε σηματοδοτικά μονοπάτια των καθ' έξιν αποβολών [127]. Οι *Tian et al., 2020* παρουσίασαν ανάλογα αποτελέσματα προτείνοντας τη συμμετοχή του miR-146a στη μη φυσιολογική λειτουργία των τροφοβλαστικών κυττάρων στα περιστατικά καθ' έξιν αποβολών [142]. Ωστόσο, οι *Yan et al. 2023* εντόπισαν μείωση της έκφρασης του miR-146a σε περιστατικά καθ' έξιν αποβολών. Οι συγγραφείς υπέδειξαν τη χρήση αυτής της μειωμένης έκφρασης ως διαγνωστικούς βιοδείκτη των αποβολών, γεγονός που αναδεικνύει την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη του συγκεκριμένου miRNA για την κατανόηση της συμμετοχής του στο μηχανισμό παθογένεσης των αποβολών [146].

Οι *Zhang et al., 2019* αναφέρθηκαν στην καταστολή του πολλαπλασιασμού των τροφοβλαστικών κυττάρων και την προαγωγή της απόπτωσής τους, λόγω της υπερέκφρασης του miR-184, σε γυναίκες με καθ' έξιν αποβολές. Υπέδειξαν, έτσι, τον κομβικό ρόλο του στη

διατήρηση της εγκυμοσύνης και τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικός και θεραπευτικός δείκτης στις καθ' έξιν αποβολές [112]. Με την αύξηση της έκφρασης του miR-184 σε γυναίκες με καθ' έξιν αποβολές συμφωνούν και οι *Dong et al., 2014*. Μεταξύ άλλων, υποστηρίζουν ότι τα γονίδια στόχοι του miR-184 εμπλέκονται στην απόπτωση και την αγγειογένεση και προτείνουν την περαιτέρω μελέτη του για τη διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών των αποβολών [133]. Τέλος, και οι *Jairajpuri et al., 2021* εντόπισαν αυξημένη έκφραση του miR-184 σε γυναίκες με καθ' έξιν αποβολές, υποστηρίζοντας τις προοπτικές για τη χρήση του ως μη επεμβατικό διαγνωστικό και προγνωστικό βιοδείκτης [91].

Τη χρήση ορισμένων κυκλοφορούντων miRNA στο αίμα ως βιοδείκτες των καθ' έξιν αποβολών υποστήριξαν και οι *Yang et al., 2018*. Μεταξύ των miRNA, οι ερευνητές ανίχνευσαν την αύξηση της έκφρασης του miR-100-5p, τόσο στο αίμα, όσο και στον ιστό χοριακών λαχνών των γυναικών με καθ' έξιν αποβολές [126], γεγονός που συμφωνεί με τα ευρήματα και άλλων ερευνητών, όπως των *Wang et al., 2016*, των *Xu N., 2022* και των *Bruno V., 2022*. Έτσι, σύμφωνα με τους συγγραφείς, το miR-100-5p δείχνει να έχει καλές προοπτικές για χρήση ως διαγνωστικούς και προγνωστικούς βιοδείκτες για τις καθ' έξιν αποβολές, αλλά και την πρόβλεψη της έκβασης των προσπαθειών εξωσωματικής γονιμοποίησης [127,135,136].

Τη διαφοροποίηση της έκφρασης των κυκλοφορούντων miRNA στο αίμα και τη συσχέτισή τους με τις καθ' έξιν αποβολές υποστηρίζουν πολλές μελέτες ακόμα. Οι *Tutunfroush et al.* το 2022 απέδειξαν την αρνητική συσχέτιση της έκφρασης του miR-23a-3p στο πλάσμα του αίματος με ένα σημαντικό αριθμό ιδιοπαθών καθ' έξιν αποβολές [129], ενώ, παρομοίως, οι *Yang et al., 2018* ανίχνευσαν τη μείωση της έκφραση του ίδιου miRNA και την πιθανή χρήση του για την πρόγνωση και διάγνωση των αποβολών [126]. Τέλος, τη χρήση του miR-126 στο περιφερικό αίμα ως βιοδείκτη των αποβολών πρότειναν οι *El-Shorafa et al., 2013*, αλλά και οι *Yari et al. 2020*. Οι δύο μελέτες συμφωνούν με τη στατιστικά σημαντική μείωση της έκφραση miR-126 σε δείγματα αίματος γυναικών με καθ' έξιν αποβολές και αναδεικνύουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικό και διαγνωστικό εργαλείο [131,145].

Συμπερασματικά, η απορρύθμιση της έκφρασης των miRNA σχετίζεται ισχυρά με ένα μεγάλο ποσοστό των περιστατικών καθ' έξιν αποβολών. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει αναδείξει τη διαφοροποίηση της έκφρασής τους ως πιθανό μελλοντικό βιοδείκτη των αποβολών, ωστόσο τα δεδομένα σε ορισμένες περιπτώσεις συγκρούονται. Μεγαλύτερες προοπτικές δείχνουν, έως τώρα, να έχουν τα κυκλοφορούντα miRNA στον ιστό του αίματος, εφόσον η έκφρασή τους σε αυτόν τον ιστό έχει μελετηθεί εκτενώς. Το γεγονός αυτό γεμίζει ελπίδες για την καθιέρωση ενός πολύτιμου μη επεμβατικού προγνωστικού και διαγνωστικού εργαλείου. Όλα τα παραπάνω αναδεικνύουν την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη της έκφρασης των miRNA και την προοπτική της χρήσης τους για τη διάγνωση πολλών περιστατικών καθ' έξιν αποβολών, που παραμένουν μέχρι σήμερα αδιάγνωστα.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- A. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>
- B. Pederson T. (2015). *Molecular Biology of the Gene*: by James D. Watson: W. A. Benjamin (1965): New York, New York. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 29(11), 4399–4401. <https://doi.org/10.1096/fj.15-1101ufm>
1. Mercer, T., Dinger, M. & Mattick, J. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet* 10, 155–159 (2009). <https://doi.org/10.1038/nrg2521>
 2. HOLLEY, R. W., APGAR, J., EVERETT, G. A., MADISON, J. T., MARQUISEE, M., MERRILL, S. H., PENSWICK, J. R., & ZAMIR, A. (1965). STRUCTURE OF A RIBONUCLEIC ACID. *Science (New York, N.Y.)*, 147(3664), 1462–1465. <https://doi.org/10.1126/science.147.3664.1462>
 3. Kapranov, P., Cheng, J., Dike, S., Nix, D. A., Dutttagupta, R., Willingham, A. T., Stadler, P. F., Hertel, J., Hackermüller, J., Hofacker, I. L., Bell, I., Cheung, E., Drenkow, J., Dumais, E., Patel, S., Helt, G., Ganesh, M., Ghosh, S., Piccolboni, A., Sementchenko, V., ... Gingeras, T. R. (2007). RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5830), 1484–1488. <https://doi.org/10.1126/science.1138341>
 4. Navarro, P., Page, D. R., Avner, P., & Rougeulle, C. (2006). Tsix-mediated epigenetic switch of a CTCF-flanked region of the Xist promoter determines the Xist transcription program. *Genes & development*, 20(20), 2787–2792. <https://doi.org/10.1101/gad.389006>
 5. Gupta, R. A., Shah, N., Wang, K. C., Kim, J., Horlings, H. M., Wong, D. J., Tsai, M. C., Hung, T., Argani, P., Rinn, J. L., Wang, Y., Brzoska, P., Kong, B., Li, R., West, R. B., van de Vijver, M. J., Sukumar, S., & Chang, H. Y. (2010). Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*, 464(7291), 1071–1076. <https://doi.org/10.1038/nature08975>
 6. Huarte, M., Guttman, M., Feldser, D., Garber, M., Koziol, M. J., Kenzelmann-Broz, D., Khalil, A. M., Zuk, O., Amit, I., Rabani, M., Attardi, L. D., Regev, A., Lander, E. S., Jacks, T., & Rinn, J. L. (2010). A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell*, 142(3), 409–419. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.040>
 7. Guttman, M., Donaghey, J., Carey, B. W., Garber, M., Grenier, J. K., Munson, G., Young, G., Lucas, A. B., Ach, R., Bruhn, L., Yang, X., Amit, I., Meissner, A., Regev, A., Rinn, J. L., Root, D. E., & Lander, E. S. (2011). lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature*, 477(7364), 295–300. <https://doi.org/10.1038/nature10398>
 8. Ørom, U. A., Derrien, T., Guigo, R., & Shiekhattar, R. (2010). Long noncoding RNAs as enhancers of gene expression. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 75, 325–331. <https://doi.org/10.1101/sqb.2010.75.058>
 9. Esteller, M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 12, 861–874 (2011). <https://doi.org/10.1038/nrg3074>
 10. He, L., & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews. Genetics*, 5(7), 522–531. <https://doi.org/10.1038/nrg1379>
 11. Mendell J. T. (2005). MicroRNAs: critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 4(9), 1179–1184. <https://doi.org/10.4161/cc.4.9.2032>
 12. John S. Mattick, Igor V. Makunin, Non-coding RNA, *Human Molecular Genetics*, Volume 15, Issue suppl_1, 15 April 2006, Pages R17–R29, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl046>
 13. Min-Sun Song, John J. Rossi; Molecular mechanisms of Dicer: endonuclease and enzymatic activity. *Biochem J* 15 May 2017; 474 (10): 1603–1618. doi: <https://doi.org/10.1042/BCJ20160759>

14. Zeng, Y., Yi, R., & Cullen, B. R. (2005). Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *The EMBO journal*, 24(1), 138-148.
15. Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297.
16. Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105. <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.082701.108>.
17. Meister, G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat Rev Genet* 14, 447–459 (2013). <https://doi.org/10.1038/nrg3462>
18. Iwakawa, H. O., & Tomari, Y. (2022). Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex. *Molecular cell*, 82(1), 30-43. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.11.026>
19. Tang, G. (2005). siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends in biochemical sciences*, 30(2), 106-114. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.12.007>
20. Parker, R., & Sheth, U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Molecular cell*, 25(5), 635-646. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.02.011>
21. Wang, J., Chen, J., & Sen, S. (2016). MicroRNA as biomarkers and diagnostics. *Journal of cellular physiology*, 231(1), 25-30. <https://doi.org/10.1002/jcp.25056>
22. Lawrie, C. H., Soneji, S., Marafioti, T., Cooper, C. D., Palazzo, S., Paterson, J. C., Cattan, H., Enver, T., Mager, R., Boultonwood, J., Wainscoat, J. S., & Hatton, C. S. (2007). MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *International journal of cancer*, 121(5), 1156–1161. <https://doi.org/10.1002/ijc.22800>
23. Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., & Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15524–15529. <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>
24. Hoshida, Y., Villanueva, A., Kobayashi, M., Peix, J., Chiang, D. Y., Camargo, A., Gupta, S., Moore, J., Wrobel, M. J., Lerner, J., Reich, M., Chan, J. A., Glickman, J. N., Ikeda, K., Hashimoto, M., Watanabe, G., Daidone, M. G., Roayaie, S., Schwartz, M., Thung, S., ... Golub, T. R. (2008). Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. *The New England journal of medicine*, 359(19), 1995–2004. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804525>
25. Benjamin, H., Lebanony, D., Rosenwald, S., Cohen, L., Gibori, H., Barabash, N., Ashkenazi, K., Goren, E., Meiri, E., Morgenstern, S., Perelman, M., Barshack, I., Goren, Y., Edmonston, T. B., Chajut, A., Aharonov, R., Bentwich, Z., Rosenfeld, N., & Cohen, D. (2010). A diagnostic assay based on microRNA expression accurately identifies malignant pleural mesothelioma. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 12(6), 771–779. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2010.090169>
26. Szafranska, A. E., Davison, T. S., Shingara, J., Doleshal, M., Rigganbach, J. A., Morrison, C. D., Jewell, S., & Labourier, E. (2008). Accurate molecular characterization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by microRNA expression profiling. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 10(5), 415–423. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2008.080018>
27. Lecellier, C. H., Dunoyer, P., Arar, K., Lehmann-Che, J., Eyquem, S., Himber, C., ... & Voinnet, O. (2005). A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science*, 308(5721), 557-560. DOI:10.1126/science.1108784

28. Mehler, M. F., & Mattick, J. S. (2007). Noncoding RNAs and RNA editing in brain development, functional diversification, and neurological disease. *Physiological reviews*, 87(3), 799-823.
29. Hébert, S. S., & De Strooper, B. (2009). Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. *Trends in neurosciences*, 32(4), 199-206. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.12.003>
30. Cao, X., Yeo, G., Muotri, A. R., Kuwabara, T., & Gage, F. H. (2006). Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.*, 29, 77-103. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112839>
31. Glinsky, G. V. (2008). An SNP-guided microRNA map of fifteen common human disorders identifies a consensus disease phenocode aiming at principal components of the nuclear import pathway. *Cell Cycle*, 7(16), 2570-2583. <https://doi.org/10.4161/cc.7.16.6524>
32. Wang, G., van der Walt, J. M., Mayhew, G., Li, Y. J., Züchner, S., Scott, W. K., ... & Vance, J. M. (2008). Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of α -synuclein. *The American Journal of Human Genetics*, 82(2), 283-289. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.09.021>
33. Edbauer, D., Neilson, J. R., Foster, K. A., Wang, C. F., Seeburg, D. P., Batterton, M. N., ... & Sheng, M. (2010). Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron*, 65(3), 373-384. DOI 10.1016/j.neuron.2010.01.005
34. Chen, W.-L., et al., SCA8 mRNA expression suggests an antisense regulation of KLHL1 and correlates to SCA8 pathology, *Brain Res.* (2008), doi:10.1016/j.brainres.2008.07.096
35. Albinsson, S., Suarez, Y., Skoura, A., Offermanns, S., Miano, J. M., & Sessa, W. C. (2010). MicroRNAs are necessary for vascular smooth muscle growth, differentiation, and function. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(6), 1118-1126. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.200873>
36. Zhao, Y., Ransom, J. F., Li, A., Vedantham, V., von Drehle, M., Muth, A. N., ... & Srivastava, D. (2007). Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*, 129(2), 303-317. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.030>
37. Yang, B., Lin, H., Xiao, J. et al. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med* 13, 486–491 (2007). <https://doi.org/10.1038/nm1569>
38. Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M., & Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *science*, 309(5740), 1577-1581. DOI: 10.1126/science.1113329
39. Kutok, J. L., & Wang, F. (2006). Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 1, 375-404. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100209>
40. Chen, A. K., Sengupta, P., Waki, K., Van Engelenburg, S. B., Ochiya, T., Ablan, S. D., ... & Lippincott-Schwartz, J. (2014). MicroRNA binding to the HIV-1 Gag protein inhibits Gag assembly and virus production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(26), E2676-E2683. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408037111>
41. Zhang, G. L., Li, Y. X., Zheng, S. Q., Liu, M., Li, X., & Tang, H. (2010). Suppression of hepatitis B virus replication by microRNA-199a-3p and microRNA-210. *Antiviral research*, 88(2), 169-175. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2010.08.008>
42. Quenby, S., Gallos, I. D., Dhillon-Smith, R. K., Podesek, M., Stephenson, M. D., Fisher, J., ... & Coomarasamy, A. (2021). Miscarriage matters: the epidemiological, physical, psychological, and economic costs of early pregnancy loss. *The Lancet*, 397(10285), 1658-1667. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00682-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00682-6)

43. Alberman, E. (1988). The epidemiology of repeated abortion. In: Sharp, F., Beard, R.W. (eds) Early Pregnancy Loss. Springer, London. https://doi.org/10.1007/978-1-4471-1658-5_2
44. S.A. Brigham, C. Conlon, R.G. Farquharson, A longitudinal study of pregnancy outcome following idiopathic recurrent miscarriage, *Human Reproduction*, Volume 14, Issue 11, November 1999, Pages 2868–2871, <https://doi.org/10.1093/humrep/14.11.2868>
45. Page, J. M., & Silver, R. M. (2016). Genetic causes of recurrent pregnancy loss. *Clinical obstetrics and gynecology*, 59(3), 498-508. <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000217>
46. Tur-Torres, M. H., Garrido-Gimenez, C., & Alijotas-Reig, J. (2017). Genetics of recurrent miscarriage and fetal loss. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 42, 11-25. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.03.007>
47. Blue, N. R., Page, J. M., & Silver, R. M. (2019, March). Genetic abnormalities and pregnancy loss. In *Seminars in perinatology* (Vol. 43, No. 2, pp. 66-73). WB Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2018.12.002>
48. Yang X, Tian Y, Zheng L, Luu T, Kwak-Kim J. The Update Immune-Regulatory Role of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Recurrent Pregnancy Losses. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(1):132. <https://doi.org/10.3390/ijms24010132>
49. Sugiura-Ogasawara, M., Aoki, K., Fujii, T. *et al.* Subsequent pregnancy outcomes in recurrent miscarriage patients with a paternal or maternal carrier of a structural chromosome rearrangement. *J Hum Genet* 53, 622–628 (2008). <https://doi.org/10.1007/s10038-008-0290-2>
50. Serapinas D, Valantinavičienė E, Machtejevienė E, Bartkevičiūtė A, Bartkevičienė D. Evaluation of Chromosomal Structural Anomalies in Fertility Disorders. *Medicina*. 2021; 57(1):37. <https://doi.org/10.3390/medicina57010037>
51. Maya, I., Davidov, B., Gershovitz, L., Zalstein, Y., Taub, E., Coppinger, J., ... & Shohat, M. (2010). Diagnostic utility of array-based comparative genomic hybridization (aCGH) in a prenatal setting. *Prenatal diagnosis*, 30(12-13), 1131-1137. <https://doi.org/10.1002/pd.2626>
52. Sotirios H. Saravelos, Karen A. Cocksedge, Tin-Chiu Li, Prevalence and diagnosis of congenital uterine anomalies in women with reproductive failure: a critical appraisal, *Human Reproduction Update*, Volume 14, Issue 5, September-October 2008, Pages 415–429, <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn018>
53. Vaz, Sharon A. MD, MPH*; Dotters-Katz, Sarah K. MD†; Kuller, Jeffrey A. MD‡. Diagnosis and Management of Congenital Uterine Anomalies in Pregnancy. *Obstetrical & Gynecological Survey* 72(3):p 194-201, March 2017. | DOI: 10.1097/OGX.0000000000000408
54. Jacquinet, A., Millar, D., & Lehman, A. (2016). Etiologies of uterine malformations. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 170(8), 2141-2172. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37775>
55. Jaslow, C. R. (2014). Uterine factors. *Obstetrics and Gynecology Clinics*, 41(1), 57-86. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2013.10.002>
56. Grigoris F. Grimbizis, Stephan Gordts, Attilio Di Spiezio Sardo, Sara Brucker, Carlo De Angelis, Marco Gergolet, Tin-Chiu Li, Vasilios Tanos, Hans Brölmann, Luca Gianaroli, Rudi Campo, The ESHRE/ESGE consensus on the classification of female genital tract congenital anomalies,, *Human Reproduction*, Volume 28, Issue 8, August 2013, Pages 2032–2044, <https://doi.org/10.1093/humrep/det098>
- 57.e Passos, I. D. M. P., & Britto, R. L. (2020). Diagnosis and treatment of müllerian malformations. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 59(2), 183-188. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2020.01.003>

58. Kaur P, Panneerselvam D. Bicornuate Uterus. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2022. PMID: 32809694. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32809694/>
59. Luo, X., & Chegini, N. (2008, November). The expression and potential regulatory function of microRNAs in the pathogenesis of leiomyoma. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 26, No. 06, pp. 500-514). © Thieme Medical Publishers. DOI: 10.1055/s-0028-1096130
60. Makker A, Goel MM. Uterine Leiomyomas: Effects on Architectural, Cellular, and Molecular Determinants of Endometrial Receptivity. *Reproductive Sciences*. 2013;20(6):631-638. doi:10.1177/1933719112459221
61. Ikhen DE, Bulun SE. Literature Review on the Role of Uterine Fibroids in Endometrial Function. *Reproductive Sciences*. 2018;25(5):635-643. doi:10.1177/1933719117725827
62. Wang, T., Zhang, X., Obijuru, L., Laser, J., Aris, V., Lee, P., ... & Wei, J. J. (2007). A micro-RNA signature associated with race, tumor size, and target gene activity in human uterine leiomyomas. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 46(4), 336-347. <https://doi.org/10.1002/gcc.20415>
63. Drakeley, A. J., Roberts, D., Alfirevic, Z., & Cochrane Pregnancy and Childbirth Group. (1996). Cervical stitch (cerclage) for preventing pregnancy loss in women. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2010(2). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003253>
64. Carbonnel, M., Pirtea, P., de Ziegler, D., & Ayoubi, J. M. (2021). Uterine factors in recurrent pregnancy losses. *Fertility and Sterility*, 115(3), 538-545. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.12.003>
65. Feng, M., Zhang, T., & Ma, H. (2019). Progesterone ameliorates the endometrial polyp by modulating the signaling pathway of Wnt and β -catenin via regulating the expression of H19 and miR-152. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(6), 10164-10174. <https://doi.org/10.1002/jcb.28301>
66. Turocy, J. M., & Rackow, B. W. (2019, March). Uterine factor in recurrent pregnancy loss. In *Seminars in Perinatology* (Vol. 43, No. 2, pp. 74-79). WB Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2018.12.003>
67. Liu, X., Xu, Q., Chen, C., & Duan, H. (2021). miR-543 inhibits the occurrence and development of intrauterine adhesion by inhibiting the proliferation, migration, and invasion of endometrial cells. *BioMed Research International*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5559102>
68. Pluchino, N., Drakopoulos, P., Wenger, J.M. *et al.* Hormonal causes of recurrent pregnancy loss (RPL). *Hormones* 13, 314–322 (2014). <https://doi.org/10.14310/horm.2002.1505>
69. Kaur, R., & Gupta, K. (2016). Endocrine dysfunction and recurrent spontaneous abortion: An overview. *International journal of applied & basic medical research*, 6(2), 79–83. <https://doi.org/10.4103/2229-516X.179024>
70. Tasadduq, R., Ajmal, L., Batool, F., Zafar, T., Babar, A., Riasat, A., & Shakoori, A. R. (2021). Interplay of immune components and their association with recurrent pregnancy loss. *Human Immunology*, 82(3), 162-169. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.01.013>
71. Carmen Garrido-Gimenez, Jaime Alijotas-Reig, Recurrent miscarriage: causes, evaluation and management, *Postgraduate Medical Journal*, Volume 91, Issue 1073, March 2015, Pages 151–162, <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2014-132672>
72. Chakraborty, P., Goswami, S. K., Rajani, S., Sharma, S., Kabir, S. N., Chakravarty, B., & Jana, K. (2013). Recurrent pregnancy loss in polycystic ovary syndrome: role of hyperhomocysteinemia and insulin resistance. *PLoS One*, 8(5), e64446. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064446>

73. Li W, Ma N, Laird SM, Ledger WL, Li TC. The relationship between serum prolactin concentration and pregnancy outcome in women with unexplained recurrent miscarriage. *J Obstet Gynaecol* [Internet]. 2013 [cited 2022 May 15];33(3):285–8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23550860/>
74. Krog MC, Nielsen HS, Christiansen OB, Kolte AM. Reproductive endocrinology in recurrent pregnancy loss. *Clin Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 [cited 2022 May 15];59(3):474–86. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27403585/>
75. Ramzan F, D’Souza RF, Durainayagam BR, Milan AM, Markworth JF, MirandaSoberanis V, et al. Circulatory miRNA biomarkers of metabolic syndrome. *Acta Diabetol* [Internet]. 2020 [cited 2022 May 14];57(2):203–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31435783/>
76. Landrier J-F, Derghal A, Mounien L. MicroRNAs in obesity and related metabolic disorders. *Cells* [Internet]. 2019 [cited 2022 May 14];8(8):859. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31404962>
77. Fu, Y.Y.; Ren, C.E.; Qiao, P.Y.; Meng, Y.H. Uterine natural killer cells and recurrent spontaneous abortion. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2021, 86.
78. Gonçalves DR, Braga A, Braga J, Marinho A. Recurrent pregnancy loss and vitamin D: A review of the literature. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2018 [cited 2022 May 15];80(5):e13022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30051540>
79. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2012 [cited 2022 May 15];523(1):123–33. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22503810/>
80. Liu X, Qiu Y, Yu ED, Xiang S, Meng R, Niu KF, et al. Comparison of therapeutic interventions for recurrent pregnancy loss in association with antiphospholipid syndrome: A systematic review and network meta-analysis. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2020 [cited 2022 May 14];83(4):e13219. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31872490/>
81. Antiphospholipid syndrome [Internet]. *Rheumatology.org*. [cited 2022 May 14]. <https://www.rheumatology.org/I-Am-A/Patient-Caregiver/DiseasesConditions/Antiphospholipid-Syndrome>
82. Liu X, Qiu Y, Yu ED, Xiang S, Meng R, Niu KF, et al. Comparison of therapeutic interventions for recurrent pregnancy loss in association with antiphospholipid syndrome: A systematic review and network meta-analysis. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2020 [cited 2022 May 14];83(4):e13219. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31872490/>
83. Keeling D, Mackie I, Moore GW, Greer IA, Greaves M, British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* [Internet]. 2012 [cited 2022 May 14];157(1):47– 58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22313321/>
84. Teruel R, Pérez-Sánchez C, Corral J, Herranz MT, Pérez-Andreu V, Saiz E, et al. Identification of miRNAs as potential modulators of tissue factor expression in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome: Tissue factor regulation by miRNAs. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2011 [cited 2022 May 14];9(10):1985–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21794077/>
85. Lissalde-Lavigne G, Fabbro-Peray P, Cochery-Nouvellon E, et al. Factor V Leiden and prothrombin G20210A polymorphisms as risk factors for miscarriage during a first intended pregnancy: the matched case-control “NOHA first” study. *J Thromb Haemost.* 2005;3(10):2178–2184.
86. Simcox, L. E., Ormsher, L., Tower, C., & Greer, I. A. (2015). Thrombophilia and Pregnancy Complications. *International journal of molecular sciences*, 16(12), 28418–28428. <https://doi.org/10.3390/ijms161226104>

87. Pritchard, A. M., Hendrix, P. W., & Paidas, M. J. (2016). Hereditary Thrombophilia and Recurrent Pregnancy Loss. *Clinical obstetrics and gynecology*, 59(3), 487–497. <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000226>
88. Liu, X., Chen, Y., Ye, C., Xing, D., Wu, R., Li, F., Chen, L., & Wang, T. (2021). Hereditary thrombophilia and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction (Oxford, England)*, 36(5), 1213–1229. <https://doi.org/10.1093/humrep/deab010>
89. Bertina, R. M., Koeleman, B. P., Koster, T., Rosendaal, F. R., Dirven, R. J., de Ronde, H., van der Velden, P. A., & Reitsma, P. H. (1994). Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*, 369(6475), 64–67. <https://doi.org/10.1038/369064a0>
90. Imam, S. N., Shamsi, M. B., Kumar, K., Deka, D., & Dada, R. (2011). Idiopathic recurrent pregnancy loss: role of paternal factors; a pilot study. *Journal of reproduction & infertility*, 12(4), 267–276.
91. Jairajpuri, D. S., Malalla, Z. H., Mahmood, N., Khan, F., & Almawi, W. Y. (2021). Differentially expressed circulating microRNAs associated with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Gene*, 768, 145334. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145334>
92. Santamaria, X., & Taylor, H. (2014). MicroRNA and gynecological reproductive diseases. *Fertility and sterility*, 101(6), 1545–1551. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.04.044>
93. R.O. Burney, A.E. Hamilton, L. Aghajanova, K.C. Vo, C.N. Nezhat, B.A. Lessey, L.C. Giudice, MicroRNA expression profiling of eutopic secretory endometrium in women with versus without endometriosis, *Molecular Human Reproduction*, Volume 15, Issue 10, October 2009, Pages 625–631, <https://doi.org/10.1093/molehr/gap068>
94. Jeon, Y. J., Choi, Y. S., Rah, H., Kim, S. Y., Choi, D. H., Cha, S. H., Shin, J. E., Shim, S. H., Lee, W. S., & Kim, N. K. (2012). Association study of microRNA polymorphisms with risk of idiopathic recurrent spontaneous abortion in Korean women. *Gene*, 494(2), 168–173. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.12.026>
95. Jairajpuri, D. S., Malalla, Z. H., Mahmood, N., Khan, F., & Almawi, W. Y. (2021). Differentially expressed circulating microRNAs associated with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Gene*, 768, 145334. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145334>
96. Paul, A.B.M., Sadek, S.T. & Mahesan, A.M. The role of microRNAs in human embryo implantation: a review. *J Assist Reprod Genet* 36, 179–187 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1326-y>
97. Hu, S. J., Ren, G., Liu, J. L., Zhao, Z. A., Yu, Y. S., Su, R. W., Ma, X. H., Ni, H., Lei, W., & Yang, Z. M. (2008). MicroRNA expression and regulation in mouse uterus during embryo implantation. *The Journal of biological chemistry*, 283(34), 23473–23484. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800406200>
98. Sha, A. G., Liu, J. L., Jiang, X. M., Ren, J. Z., Ma, C. H., Lei, W., Su, R. W., & Yang, Z. M. (2011). Genome-wide identification of micro-ribonucleic acids associated with human endometrial receptivity in natural and stimulated cycles by deep sequencing. *Fertility and sterility*, 96(1), 150–155.e5. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.04.072>
99. Grewal, S., Carver, J. G., Ridley, A. J., & Mardon, H. J. (2008). Implantation of the human embryo requires Rac1-dependent endometrial stromal cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(42), 16189–16194. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806219105>
100. Kang, Y. J., Lees, M., Matthews, L. C., Kimber, S. J., Forbes, K., & Aplin, J. D. (2015). MiR-145 suppresses embryo-epithelial juxtacrine communication at implantation by modulating maternal IGF1R. *Journal of cell science*, 128(4), 804–814. <https://doi.org/10.1242/jcs.164004>

101. Azarpoor A., Ardeshiryajimi A., Mohammadi Y. S., Dehghan Z., Salehi M. (2020). The expression of miR-31 and its target gene FOXP3 in recurrent implantation failure patients. *Int. J. Women's Health Reprod. Sci.* 8, 389–395. [10.15296/ijwhr.2020.62](https://doi.org/10.15296/ijwhr.2020.62)
102. García-López, J., & del Mazo, J. (2012). Expression dynamics of microRNA biogenesis during preimplantation mouse development. *Biochimica et biophysica acta*, 1819(8), 847–854. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.03.007>
103. Bernstein, E., Kim, S. Y., Carmell, M. A., Murchison, E. P., Alcorn, H., Li, M. Z., Mills, A. A., Elledge, S. J., Anderson, K. V., & Hannon, G. J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nature genetics*, 35(3), 215–217. <https://doi.org/10.1038/ng1253>
104. Wang, Y., Medvid, R., Melton, C., Jaenisch, R., & Blelloch, R. (2007). DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nature genetics*, 39(3), 380–385. <https://doi.org/10.1038/ng1969>
105. Zeinab Dehghan, Samira Mohammadi-Yeganeh, Delsuz Rezaee, Mohammad Salehi, MicroRNA-21 is involved in oocyte maturation, blastocyst formation, and pre-implantation embryo development, *Developmental Biology*, Volume 480, 2021, Pages 69-77, ISSN 0012-1606, <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2021.08.008>.
106. Ai-Guo Sha, Ji-Long Liu, Xiao-Ming Jiang, Jian-Zhi Ren, Cai-Hui Ma, Wei Lei, Ren-Wei Su, Zeng-Ming Yang, Genome-wide identification of micro-ribonucleic acids associated with human endometrial receptivity in natural and stimulated cycles by deep sequencing, *Fertility and Sterility*, Volume 96, Issue 1, 2011, Pages 150-155.e5, ISSN 0015-0282, <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.04.072>.
107. Ashary, N., Tiwari, A., & Modi, D. (2018). Embryo Implantation: War in Times of Love. *Endocrinology*, 159(2), 1188–1198. <https://doi.org/10.1210/en.2017-03082>
108. Liang, J., Wang, S., & Wang, Z. (2017). Role of microRNAs in embryo implantation. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 15(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s12958-017-0309-7>
109. Freedman, D. A., Wu, L., & Levine, A. J. (1999). Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 55(1), 96–107. <https://doi.org/10.1007/s000180050273>
110. Levine A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88(3), 323–331. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81871-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81871-1)
111. Kokawa, K., Shikone, T., & Nakano, R. (1998). Apoptosis in human chorionic villi and decidua during normal embryonic development and spontaneous abortion in the first trimester. *Placenta*, 19(1), 21–26. [https://doi.org/10.1016/s0143-4004\(98\)90094-7](https://doi.org/10.1016/s0143-4004(98)90094-7)
112. Zhang, Y., Zhou, J., Li, M. Q., Xu, J., Zhang, J. P., & Jin, L. P. (2019). MicroRNA-184 promotes apoptosis of trophoblast cells via targeting WIG1 and induces early spontaneous abortion. *Cell death & disease*, 10(3), 223. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1443-2>
113. Dong, X., Yang, L., & Wang, H. (2017). miR-520 promotes DNA-damage-induced trophoblast cell apoptosis by targeting PARP1 in recurrent spontaneous abortion (RSA). *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 33(4), 274–278. <https://doi.org/10.1080/09513590.2016.1266476>
114. Ramírez-Bello, J., & Jiménez-Morales, M. (2017). Implicaciones funcionales de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en genes codificantes de proteínas y no codificantes en enfermedades multifactoriales [Functional implications of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in protein-coding and non-coding RNA genes in multifactorial diseases]. *Gaceta medica de Mexico*, 153(2), 238–250.
115. Suzuki, Y., Kim, H. W., Ashraf, M., & Haider, H. K.h (2010). Diazoxide potentiates mesenchymal stem cell survival via NF-kappaB-dependent miR-146a expression by targeting Fas. *American journal*

- of physiology. *Heart and circulatory physiology*, 299(4), H1077–H1082. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00212.2010>
116. Lin, R. J., Lin, Y. C., & Yu, A. L. (2010). miR-149* induces apoptosis by inhibiting Akt1 and E2F1 in human cancer cells. *Molecular carcinogenesis*, 49(8), 719–727. <https://doi.org/10.1002/mc.20647>
117. Kawasaki, H., & Taira, K. (2004). MicroRNA-196 inhibits HOXB8 expression in myeloid differentiation of HL60 cells. *Nucleic acids symposium series (2004)*, (48), 211–212. <https://doi.org/10.1093/nass/48.1.211>
118. Qinghua Li, Zhifang Pan, Xuejian Wang, Zhiqin Gao, Chune Ren, Weiwei Yang, miR-125b-1-3p inhibits trophoblast cell invasion by targeting sphingosine-1-phosphate receptor 1 in preeclampsia, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 453, Issue 1, 2014, Pages 57-63, ISSN 0006-291X, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.09.059>.
119. Li, H., Ge, Q., Guo, L., & Lu, Z. (2013). Maternal plasma miRNAs expression in preeclamptic pregnancies. *BioMed research international*, 2013, 970265. <https://doi.org/10.1155/2013/970265>
120. Qin, X., Chen, Y., Chen, S., Liu, X., Zeng, W., Tian, F., Lin, Y., & Fan, C. (2019). Plasmacytoma variant translocation 1 (PVT1) regulates trophoblast viability, proliferation, and migration and is downregulated in spontaneous abortion. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*, 81(1), e13048. <https://doi.org/10.1111/aji.13048>
121. Ojeda-Casares, H., & Paradisi, I. (2021). The Regulatory Network Played by miRNAs During Normal Pregnancy and Preeclampsia: A Comparative Study. *MicroRNA (Shariqah, United Arab Emirates)*, 10(4), 263–275. <https://doi.org/10.2174/2211536611666211228100811>
122. Tang Q., Gui J., Wu X., Wu W. Downregulation of miR-424 in placenta is associated with severe T preeclampsia, *Pregnancy Hypertension*, 2019; 17 :109 – 112
123. Saja Al-Rubaye, Sayyed Mohammad Hossein Ghaderian, Saghar Salehpour, Tayyebali Salmani, Samaneh Vojdani, Rusul Yaseen & Reza Akbarzadeh (2021) Aberrant expression of BAX, MEG3, and miR-214-3P genes in recurrent pregnancy loss, *Gynecological Endocrinology*, 37:7, 660-664, DOI: 10.1080/09513590.2021.1897098
124. Karami, N., Mirabutalebi, S. H., Montazeri, F., Kalantar, S. M., Sheikhha, M. H., & Eftekhari, M. (2018). Aberrant expression of microRNAs 16 and 21 and gene targets in women with unexplained recurrent miscarriage: A case-control study. *International journal of reproductive biomedicine*, 16(10), 617–622.
125. Li, D., & Li, J. (2016). Association of miR-34a-3p/5p, miR-141-3p/5p, and miR-24 in Decidual Natural Killer Cells with Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 22, 922–929. <https://doi.org/10.12659/msm.895459>
126. Yang, Q., Gu, WW., Gu, Y. *et al.* Association of the peripheral blood levels of circulating microRNAs with both recurrent miscarriage and the outcomes of embryo transfer in an in vitro fertilization process. *J Transl Med* 16, 186 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1556-x>
127. Wang, J. M., Gu, Y., Zhang, Y., Yang, Q., Zhang, X., Yin, L., & Wang, J. (2016). Deep-sequencing identification of differentially expressed miRNAs in decidua and villus of recurrent miscarriage patients. *Archives of gynecology and obstetrics*, 293(5), 1125–1135. <https://doi.org/10.1007/s00404-016-4038-5>
128. Jairajpuri, D. S., Malalla, Z. H., Mahmood, N., Khan, F., & Almawi, W. Y. (2021). Differentially expressed circulating microRNAs associated with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Gene*, 768, 145334. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145334>

129. Tutunfroush, M., Ghorbian, S., Mohseni, J., Danaii, S., & Rad, M. G. (2022). Down-Regulation of circulating miR-23a-3p, miR-101-3p, and miR-let-7c in Women with Idiopathic Recurrent Pregnancy Loss. *Clinical laboratory*, 68(10), 10.7754/Clin.Lab.2022.211142. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2022.211142>
130. Geng, X., Mao, G., Zhao, D., Xiang, Y., Wang, M., Yu, G., & Tan, L. (2022). Downregulation of miR-33a/b and miR-181a contributes to recurrent pregnancy loss by upregulating S1PR1 and repressing regulatory T cell differentiation. *Placenta*, 121, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2022.03.011>
131. El-Shorafa, Heba M., and Fadel A. Sharif. "Dysregulation of micro-RNA contributes to the risk of unexplained recurrent pregnancy loss." *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology*, vol. 2, no. 3, Sept. 2013, pp. 350+. *Gale Academic OneFile*, link.gale.com/apps/doc/A350978829/AONE?u=anon~ac0921c9&sid=googleScholar&xid=5b18d2a5. Accessed 29 Feb. 2024.
132. Haleh Abbaskhani, Seyed Morteza Seifati, Tayyebali Salmani, Samaneh Vojdani, Saja Al-Rubaye, Rusul Yaseen, Yasaman Hajiesmaeili & Sayyed Mohammad Hossein Ghaderian (2022) Evaluating changes in the expression of BCL-2 gene, lncRNA SRA, and miR-361-3p in unexplained recurrent pregnancy loss, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 41:9, 891-899, DOI: 10.1080/15257770.2022.2085298
133. Dong, F., Zhang, Y., Xia, F., Yang, Y., Xiong, S., Jin, L., & Zhang, J. (2014). Genome-wide miRNA profiling of villus and decidua of recurrent spontaneous abortion patients. *Reproduction (Cambridge, England)*, 148(1), 33–41. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0095>
134. Manzoor U, Pandith AA, Amin I, Wani S, Sanadhya D, Lone TA, Mir H, Paray BA, Gulnaz A, Anwar I, et al. Implications of Decreased Expression of miR-125a with Respect to Its Variant Allele in the Pathogenesis of Recurrent Pregnancy Loss: A Study in a High Incidence Zone. *Journal of Clinical Medicine*. 2022; 11(13):3834. <https://doi.org/10.3390/jcm11133834>
135. Xu, N., Zhou, X., Shi, W., Ye, M., Cao, X., Chen, S., & Xu, C. (2022). Integrative analysis of circulating microRNAs and the placental transcriptome in recurrent pregnancy loss. *Frontiers in physiology*, 13, 893744. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.893744>
136. V. Bruno, F. Amati, C. Ticconi, S. Riccio, C. Vancheri, B. Rizzacasa, E. Splendiani, E. Ferretti, J. Ernerudh, E. Piccione, A. Pietropolli, Low molecular weight heparin -induced miRNA changes in peripheral blood mononuclear cells in pregnancies with unexplained recurrent pregnancy loss, *Journal of Reproductive Immunology*, Volume 151, 2022, 103502, ISSN 0165-0378, <https://doi.org/10.1016/j.jri.2022.103502>
137. Hosseini, M. K., Gunel, T., Gumusoglu, E., Benian, A., & Aydinli, K. (2018). MicroRNA expression profiling in placenta and maternal plasma in early pregnancy loss. *Molecular medicine reports*, 17(4), 4941–4952. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8530>
138. Zhang, Q., Tian, P., & Xu, H. (2021). MicroRNA-155-5p regulates survival of human decidua stromal cells through NF-κB in recurrent miscarriage. *Reproductive biology*, 21(3), 100510. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2021.100510>
139. Zhang, Y., Zhou, J., Li, Mq. et al. MicroRNA-184 promotes apoptosis of trophoblast cells via targeting WIG1 and induces early spontaneous abortion. *Cell Death Dis* 10, 223 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1443-2>

140. Xiujuan Dong, Long Yang & Hui Wang (2017) miR-520 promotes DNA-damage-induced trophoblast cell apoptosis by targeting PARP1 in recurrent spontaneous abortion (RSA), *Gynecological Endocrinology*, 33:4, 274-278, DOI: 10.1080/09513590.2016.1266476
141. Zhao, W., Shen, W. W., Cao, X. M., Ding, W. Y., Yan, L. P., Gao, L. J., Li, X. L., & Zhong, T. Y. (2017). Novel mechanism of miRNA-365-regulated trophoblast apoptosis in recurrent miscarriage. *Journal of cellular and molecular medicine*, 21(10), 2412–2425. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13163>
142. Shan Tian, Jin Yu, Yingchun Zhang, Yuehong Bian, Jinlong Ma, Junhao Yan, Overexpression of PTEN regulated by miR-19b and miR-494 in the villous of recurrent spontaneous abortion patients, *Journal of Reproductive Immunology*, Volume 140, 2020, 103133, ISSN 0165-0378, <https://doi.org/10.1016/j.jri.2020.103133>.
143. Qin, W., Tang, Y., Yang, N., Wei, X., & Wu, J. (2016). Potential role of circulating microRNAs as a biomarker for unexplained recurrent spontaneous abortion. *Fertility and sterility*, 105(5), 1247–1254.e3. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.01.028>
144. Ray, A., Bhati, T., Arora, R., & Rastogi, S. (2023). Progesterone-mediated immunoregulation of cytokine signaling by miRNA-133a and 101-3p in Chlamydia trachomatis-associated recurrent spontaneous abortion. *Molecular immunology*, 164, 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2023.10.012>
145. Yari, Hadi, Mohammadi, Kazhaleh, Keshavarz, Mohammad, Esfahani, Relationship between recurrent pregnancy loss and microRNA expression, *Personalized Medicine* 5(18):7-9 DOI:10.22034/PMJ.2020.46379
146. Ya-ni Yan, Jian Zhang, Na Yang, Chaochao Chen, Weiwei Li, "T Cell Subsets and the Expression of Related MicroRNAs in Patients with Recurrent Early Pregnancy Loss", *Mediators of Inflammation*, vol. 2023, Article ID 8215567, 8 pages, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/8215567>
147. Parhizkar, F., Kiani, A., Darzi, S., Motavalli, R., Noori Dolama, F., Yousefzadeh, Y., Aghebati-Maleki, L., Pia, H., Abdollahi-Fard, S., Mardi, A., Danaii, S., Ahmadian Heris, J., Yousefi, M., & Soltani-Zangbar, M. S. (2023). The evaluation of CD39, CD73, and HIF-1 α expression besides their related miRNAs in PBMCs of women with recurrent pregnancy loss. *Journal of reproductive immunology*, 156, 103820. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2023.103820>
148. Du, E., Cao, Y., Feng, C. *et al.* The Possible Involvement of miR-371a-5p Regulating XIAP in the Pathogenesis of Recurrent Pregnancy Loss. *Reprod. Sci.* 26, 1468–1475 (2019). <https://doi.org/10.1177/1933719119828051>
149. Dehghan, Z., & Salehi, M. (2020). The expression of miR-31 and its target gene FOXP3 in recurrent implantation failure patients. *Int. J. Women's Health Reproduction Sci*, 8, 389-395 DOI:10.15296/ijwhr.2020.62
150. Lin, R. C., Chao, Y. Y., Su, M. T., Tsai, H. L., Tsai, P. Y., & Wang, C. Y. (2024). Upregulation of miR-20b-5p inhibits trophoblast invasion by blocking autophagy in recurrent miscarriage. *Cellular signalling*, 113, 110934. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2023.110934>
151. Shahidi, M., Nazari, F., Ghanbarian, H. *et al.* miR-146b-5p and miR-520h Expressions Are Upregulated in Serum of Women with Recurrent Spontaneous Abortion. *Biochem Genet* 60, 1716–1732 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10528-021-10173-5>
152. Zhao L, Li J, Huang S. Patients with Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion Show Decreased Levels of Microrna-146a-5p in the Deciduae. *Ann Clin Lab Sci*. 2018;48(2):177-182.