



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

Ιατρική Σχολή Αθηνών

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

«Αναπαραγωγική Αναγεννητική Ιατρική»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Σίγαση γονιδίων (RNA silencing) και υπογονιμότητα

Φραγάκη Μαρία

Αθήνα 2024

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
---------------	---

ABSTRACT.....	5
---------------	---

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ- Ανατομία και φυσιολογία της αναπαραγωγικής οδού

1.1 Ανατομία γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος.....	7
1.2 Ωογένεση.....	9
1.3 Ωοθυλακική ανάπτυξη.....	10
1.4 Ωορρηξία.....	13
1.5 Ωχρινική φάση.....	13
1.6 Ανατομία ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος.....	14
1.7 Σπερματογένεση.....	16

2. ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

2.1 Ορισμός.....	18
2.2 Αίτια υπογονιμότητας.....	19
2.3 Υπογονιμότητα και υποβοηθούμενη αναπαραγωγή.....	23
2.4 Πρωτόκολλα διέγερσης ωοθηκών.....	25
2.4.1 Κιτρική κλομιφαίνη.....	26
2.4.2 GnRH ανάλογα.....	26
2.4.3 Μακρύ πρωτόκολλο (Long Protocol).....	27
2.4.4 Βραχύ πρωτόκολλο (Short Protocol).....	28
2.4.5 Υπερβραχύ πρωτόκολλο (Ultra Short Protocol).....	28
2.4.6 Πρωτόκολλα με GnRH ανταγωνιστή.....	29
2.4.7 Σύγκριση GnRH αγωνιστών και ανταγωνιστών.....	30

3. ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA

3.1 Ορισμός.....	31
3.2 Βιογένεση των ncRNAs.....	32

3.3 ncRNAs και λειτουργίες στη σπερματογένεση.....	36
3.4 ncRNAs και λειτουργίες στην ωογένεση.....	39
3.5 Ρόλος στην εμφύτευση.....	41
4.ΣΚΟΠΟΣ.....	43
5.ΜΕΘΟΔΟΙ.....	44
6. ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA ΚΑΙ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ	
6.1 Ανδρική υπογονιμότητα.....	45
6.2 Γυναικεία υπογονιμότητα.....	56
6.3 Τα miRNAs ως διαγνωστικοί δείκτες.....	69
7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	72
8.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	75

Περίληψη

Τα μικρά μη κωδικοποιητικά RNA είναι μια νέα κατηγορία ρυθμιστών γονιδιακής έκφρασης που ασκούν την επίδρασή τους σε μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό, μετα-μεταφραστικό και επιγενετικό επίπεδο παίζοντας καθοριστικό ρόλο σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών στους ευκαρυώτες. Μέσω της σίγασης γονιδίων ή αλλιώς RNA silencing, τα μη κωδικά μόρια RNA συμβάλλουν σε πολλά στάδια της αναπαραγωγικής διαδικασίας των θηλαστικών, από την ανάπτυξη των γαμετικών κυττάρων μέχρι τη διαδικασία της εμφύτευσης και της επίτευξης κύησης. Ωστόσο, ένας από τους παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν σε υπογονιμότητα είναι η μεταβολή της έκφρασης τους. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, επιχειρείται μια βιβλιογραφική ανασκόπηση των ρόλων που διαδραματίζουν τα μη κωδικοποιητικά RNAs στη γαμετογένεση και την αναπαραγωγή. Παράλληλα, μελετάται και η επίδραση της διαφοροποιημένης έκφρασης τους στη λειτουργία του γυναικείου και ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος, καθώς και η πιθανή τους χρήση ως διαγνωστικούς βιοδείκτες.

Abstract

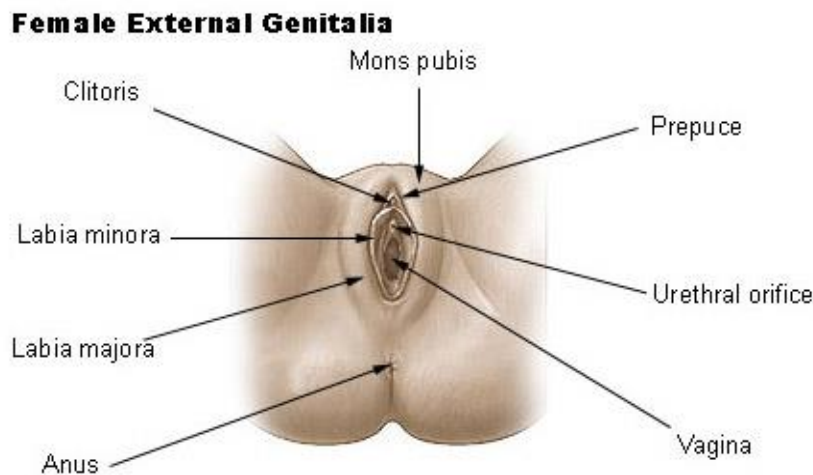
Small noncoding RNAs (ncRNAs) are a novel class of gene regulators that modulate gene expression at transcriptional, post-transcriptional, and epigenetic levels, and they play crucial roles in almost all cellular processes in eukaryotes. Through the process of RNA silencing, non coding RNAs participate in several stages of mammalian reproduction, some of which are mammalian germ cell development, embryo implantation and successful gestation. However, modifications in their expression can often lead to infertility. In the present thesis, there is an attempt of a literature review of the roles that ncRNAs play in gametogenesis and reproduction. Moreover, the object of study is also the effect of differential expression of ncRNAs in the male and female reproductive system as well as their potential use as diagnostic biomarkers.

Εισαγωγή

1. Ανατομία και φυσιολογία της αναπαραγωγικής οδού

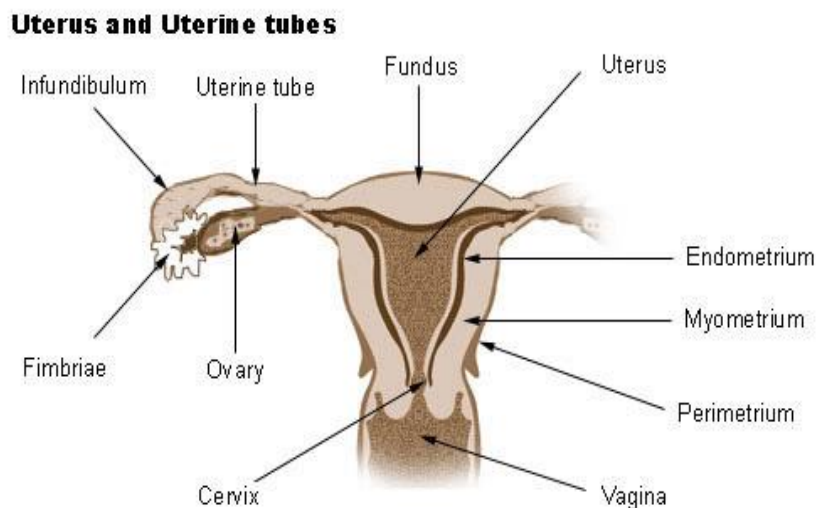
1.1. Ανατομία γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος

Το αναπαραγωγικό σύστημα της γυναίκας περιλαμβάνει τα εξωτερικά και τα εσωτερικά γεννητικά όργανα. Οι δομές του εξωτερικού αναπαραγωγικού συστήματος αποτελούν το αιδοίο, το οποίο απαρτίζεται από τα μικρά και τα μεγάλα χείλη, το εφήβαιο, την κλειτορίδα, την κολπική και την ουρηθρική σπή. Τα μεγάλα χείλη περικλείουν και προστατεύουν όλες τις υπόλοιπες δομές ενώ διαθέτουν ιδρωτοποιούς και σμηγματογόνους αδένες. Το εφήβαιο είναι μία περιοχή λιπώδους ιστού στην οποία συμφύονται τα ηβικά οστά και χαρακτηρίζεται από την παρουσία τριχοθυλακίων. Η κλειτορίδα αποτελεί το αντίστοιχο όργανο του πέους στις γυναίκες και είναι υπεύθυνη για τη σεξουαλική διέγερση, λόγω της πληθώρας νευρικών απολήξεων που φέρει στην επιφάνειά της.^{1,2}



Εικόνα 1. Γυναικείο εξωτερικό αναπαραγωγικό σύστημα (διαθέσιμο στο National Cancer Institute)

Τα εσωτερικά γεννητικά όργανα της γυναίκας περιλαμβάνουν δύο ωοθήκες, δύο ωαγωγούς ή σάλπιγγες, τη μήτρα, τον τράχηλο και τον κόλπο. Οι ωοθήκες είναι μικροί, ελλειψοειδείς αδένες αμφοτέρωθεν της μήτρας που φέρουν τα ωοθυλάκια και εκκρίνουν τις ορμόνες του φύλου. Οι σάλπιγγες εκφύονται από το ανώτερο τμήμα της μήτρας, έχουν σχήμα επιμήκους σωληνίσκου και αποτελούν το «μονοπάτι» για να ταξιδέψει το ωάριο από τις ωοθήκες στη μήτρα. Συνεχίζοντας, η μήτρα είναι ένα όργανο-μυς κοιλώδους σχήματος που υποδέχεται το γονιμοποιημένο ωάριο και παρέχει, σε περίπτωση εγκυμοσύνης, ένα περιβάλλον κατάλληλο για την ανάπτυξη του εμβρύου. Το πλέον εξωτερικό στρώμα της μήτρας ονομάζεται μυομήτριο και το εσωτερικό ενδομήτριο. Τέλος, ο τράχηλος είναι το κατώτερο τμήμα της μήτρας και την συνδέει με τον κόλπο, ο οποίος με τη σειρά του αποτελεί μία δίοδο επικοινωνίας του τραχήλου με το εξωτερικό περιβάλλον.¹



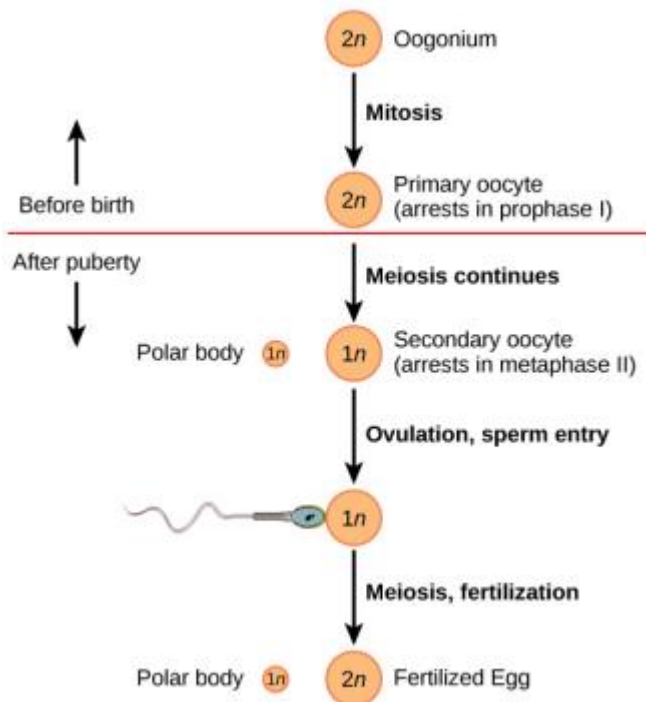
Εικόνα 2. Γυναικείο εσωτερικό αναπαραγωγικό σύστημα (διαθέσιμο στο National Cancer Institute)

1.2. Ωογένεση

Η ωογένεση- η διαφοροποίηση του ωαρίου- περιλαμβάνει το σχηματισμό του θηλυκού γαμέτη και παράλληλα των υλικών που είναι απαραίτητα για το μεταβολισμό και την περαιτέρω ανάπτυξή του. Έτσι, εκτός από το σχηματισμό ενός απλοειδούς πυρήνα, η ωογένεση ενέχει επίσης και την κατασκευή μιας «αποθήκης» με κυτταροπλασματικά ένζυμα, mRNAs, οργανίδια και μεταβολικά υποστρώματα.

Στη διάρκεια ζωής μιας γυναίκας, τα ωογόνια διαιρούνται σχηματίζοντας έναν περιορισμένο αριθμό ωαρίων. Πιο συγκεκριμένα, στο ανθρώπινο έμβρυο, από τον 2^ο μέχρι τον 7^ο μήνα της κύησης, σχηματίζονται περίπου 7 εκατομμύρια πρόδρομα γεννητικά κύτταρα. Ωστόσο, μετά τον έβδομο μήνα της εμβρυϊκής ανάπτυξης, ο αριθμός αυτός μειώνεται δραματικά καθώς τα περισσότερα ωογόνια πεθαίνουν, ενώ αυτά που επιβιώνουν εισέρχονται στην πρώτη μειωτική διαίρεση. Τα πρωτογενή ωοκύτταρα, όπως ονομάζονται, συνεχίζουν τη διαίρεση τους μέχρι το στάδιο της διπλοταινίας, όπου και παραμένουν μέχρι την έναρξη της εφηβείας. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τη γέννηση, ο αριθμός των ωοκυττάρων φτάνει κατά προσέγγιση τις 700.000, ενώ στην εφηβεία μειώνεται περαιτέρω στις 400.000. ³

Με την έναρξη της εφηβείας και την επίδραση της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης FSH, ενεργοποιείται ξανά η ανάπτυξη κάποιων πρόδρομων ωοκυττάρων. Ένα από αυτά επικρατεί και εισέρχεται στη μειωτική διαίρεση I κατά την οποία σχεδόν όλο το κυτταρόπλασμα, τα οργανίδια και τα μισά χρωμοσώματα μοιράζονται στο ένα θυγατρικό κύτταρο (δευτερογενές ωοκύτταρο) και τα υπόλοιπα χρωμοσώματα μεταφέρονται σε ένα δεύτερο μικρότερο κύτταρο, το πολικό σωματίο. Το δευτερογενές ωοκύτταρο ξεκινά τη δεύτερη μειωτική διαίρεση και φτάνει έως την μετάφαση όπου και σταματάει αν δεν προκύψει γονιμοποίηση.



Εικόνα 3. Η διαδικασία της ωογένεσης (Animal Reproduction and Development, Human Reproductive anatomy and Gametogenesis, Gametogenesis, διαθέσιμο στο LibreTexts Biology)

1.3. Ωοθυλακική ανάπτυξη

Τα ωοθυλάκια είναι ανατομικές δομές που περιέχουν τα ωάρια και πρόδρομός τους είναι τα αρχέγονα ωοθυλάκια. Ένα αρχέγονο ωοθυλάκιο εμπεριέχει ένα ωοκύτταρο και ένα μονό στρώμα κοκκωδών κυττάρων. Η ωοθυλακική ανάπτυξη λαμβάνει χώρα στη φλοιώδη μοίρα της ωοθήκης και διακρίνεται σε δύο φάσεις: την εξαρτώμενη από γοναδοτροπίνες (gonadotropin-dependent) και την μη εξαρτώμενη από γοναδοτροπίνες (gonadotropin-independent).⁴

Χρειάζεται περίπου ένας χρόνος για την ωρίμανση ενός αρχέγονου ωοθυλακίου πριν την ωορρηξία και όλο αυτό το χρονικό διάστημα αποτελεί την gonadotropin-independent φάση. Με την διόγκωση των ωοκυττάρων, τον πολλαπλασιασμό του στρώματος κοκκωδών κυττάρων και την έκφραση υποδοχέων FSH, τα αρχέγονα ωοθυλάκια μετατρέπονται σε πρωτογενή. Ακολούθως, η μετατροπή

σε δευτερογενή ωοθυλάκια περιλαμβάνει τη μετατροπή του μονού κυβοειδούς επιθηλίου των πρωτογενών ωοθυλακίων σε μια στρωματοποιημένη στήλη επιθηλίου. Επιπλέον, ο αυξημένος αριθμός κοκκωδών κυττάρων οδηγεί σε σχηματισμό πολλαπλών στρωμάτων γύρω από το ωοκύτταρο που διαφοροποιούνται σε κύτταρα θήκης δύο στιβάδων (έσω θήκης-theca interna & έξω θήκης-theca externa). Στα κύτταρα έσω θήκης αναπτύσσονται υποδοχείς LH. ⁴

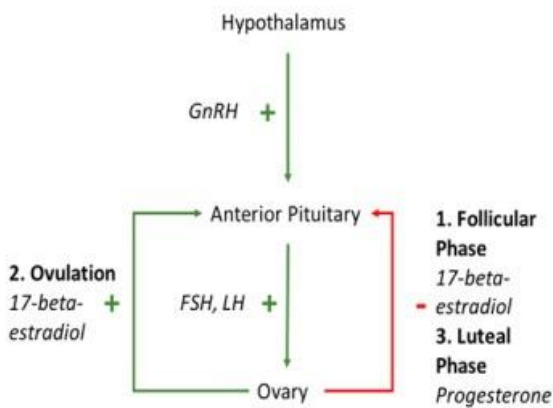


Figure 1. Hormone secretion feedback system.

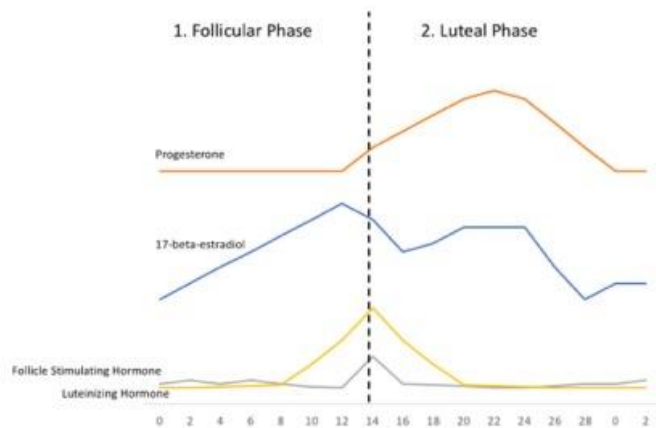


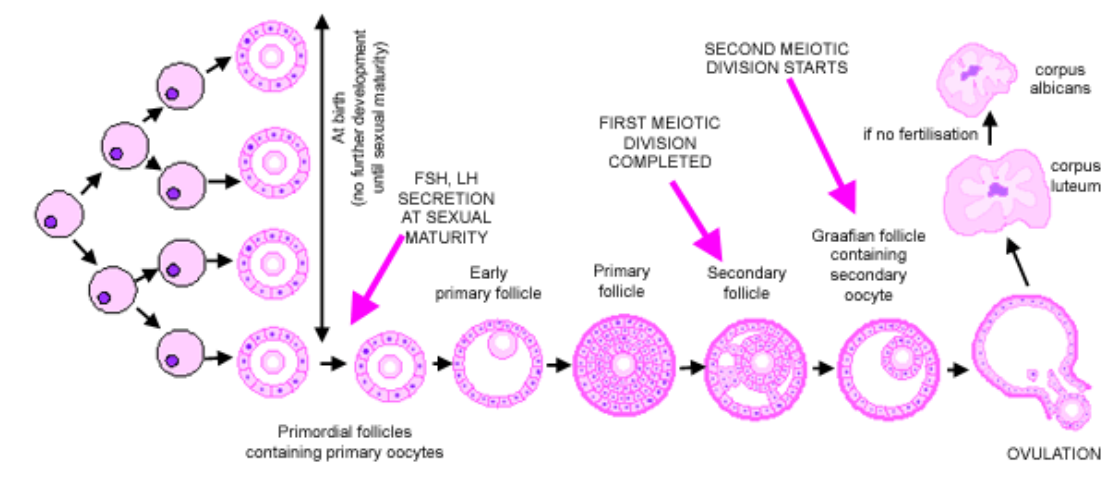
Figure 2. Hormone variation throughout the menstrual cycle.

Εικόνα 4. 1. Σύστημα έκκρισης ορμονών Υποθάλαμος-Υπόφυση-Ωοθήκης και 2. Διακύμανση συγκέντρωσης ορμονών κατά τη διάρκεια του κύκλου (Thiyagarajan DK, Basit H, Jeanmonod R. Physiology, Menstrual Cycle, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan)

Η περαιτέρω ωρίμανση των δευτερογενών ωοθυλακίων και η επιλογή του επικρατούντος ωοθυλακίου είναι εξαρτώμενη από τις γοναδοτροπίνες. Ως απόκριση στη διέγερση από την FSH, τα ωοθυλάκια συνεχίζουν την ανάπτυξή τους με την εμφάνιση ενός χώρου που καταλαμβάνεται από υγρό, γνωστός και ως άντρο. Με την πρόσδεση της LH στους υποδοχείς της έσω θήκης, ξεκινάει η παραγωγή των ανδρογόνων που αργότερα τα ωοθυλάκια θα χρησιμοποιήσουν ως υπόστρωμα για την παραγωγή οιστρογόνων μέσω του ενζύμου αρωματάση. ⁴

Ένα μεγάλο σε μέγεθος ωοθυλάκιο επιλέγεται ως το επικρατές και συνεχίζει την ωρίμανσή του μέσω του ταχέως πολλαπλασιασμού των κοκκωδών κυττάρων και των κυττάρων θήκης αλλά και την επέκταση του άντρου. Τα μικρότερα σε μέγεθος ωοθυλάκια δεν επιλέγονται για επικράτηση και ως αποτέλεσμα εκφυλίζονται λόγω της μειωμένης τους ευαισθησίας στην FSH. Το επικρατές ωοθυλάκιο εμφανίζει αυξημένη ευαισθησία στην LH λόγω της πληθώρας υποδοχέων που εκφράζονται στην επιφάνειά του. Η αιχμή της LH που προκύπτει από την αύξηση των κυκλοφορούντων οιστρογόνων οδηγεί τελικά στην ωορρηξία, δηλαδή στην απελευθέρωση του ώριμου ωαρίου.⁴

Μετά την ωορρηξία, το άδειο πλέον ωοθυλάκιο μετατρέπεται σε ωχρό σωματίο το οποίο εκκρίνει προγεστερόνη και οιστρογόνα για να υποστηρίξει την πιθανή εμφύτευση και τα πρώιμα στάδια μιας κύησης. Σε περίπτωση που δεν προκύψει κύηση, το ωχρό σωματίο εκφυλίζεται σε μια δομή συνδετικού ιστού γνωστή ως λευκό σωματίο. Τα χαμηλά επίπεδα προγεστερόνης πυροδοτούν την έναρξη της εμμηνου ρύσης.⁴



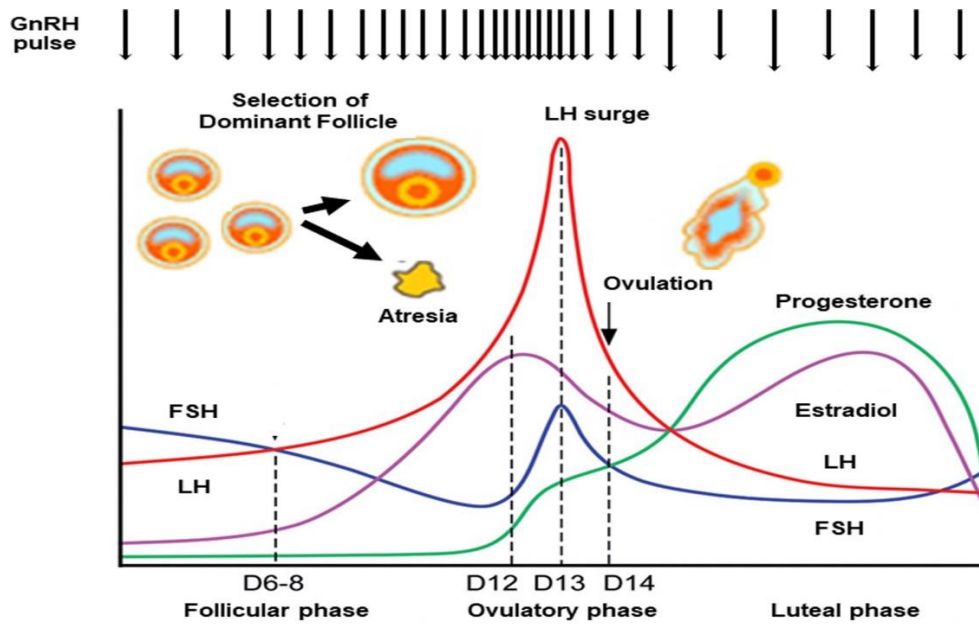
Εικόνα 5. Ωοθυλακιογένεση- στάδια ανάπτυξης ωοθυλακίων (Formation of Ova, The Histology Guide, Faculty of Biological Sciences, University of Leeds)

1.4. Ωορρηξία

Η ωορρηξία συμβαίνει κατά προσέγγιση την 14η ημέρα ενός τυπικού κύκλου 28 ημερών. Τα ορμονικά ενεργά κοκκώδη κύτταρα εντός του ωοθυλακίου παράγουν αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων τα οποία δρουν ως θετικοί ρυθμιστές της συχνότητας σύνθεσης GnRH στον υποθάλαμο. Ως αποτέλεσμα, προκύπτει η αιχμή της LH η οποία προκαλεί την αύξηση των πρωτεολυτικών ενζύμων στο ωοθυλάκιο, που με τη σειρά τους αποδυναμώνουν το τοίχωμα της ωοθήκης και επιτρέπουν στο ώριμο ωάριο να εξέλθει. Η αιχμή της LH επίσης προάγει την ωχρινοποίηση των κοκκωδών κυττάρων και των κυττάρων θήκης σχηματίζοντας το ωχρό σωματίο (Corpus Luteum), υπεύθυνο για τη σύνθεση προγεστερόνης.⁸

1.5. Ωχρινική φάση

Η ωχρινική φάση διαρκεί από την 14^η έως την 28^η ημέρα του κύκλου. Ξεκινά με το σχηματισμό του ωχρού σωματίου και τελειώνει με την ωχρινόλυση (δηλαδή την καταστροφή του) ή την εγκυμοσύνη. Η προγεστερόνη που παράγει το ωχρό σωματίο εξυπηρετεί την αύξηση της υποδεκτικότητας του ενδομητρίου κατά την εμφύτευση. Σε περίπτωση που δεν προκύψει κύηση, το ωχρό σωματίο εκφυλίζεται σε μια δομή συνδετικού ιστού γνωστή ως λευκό σωματίο (Corpus Albicans) και τα χαμηλά επίπεδα προγεστερόνης πυροδοτούν την έναρξη της εμμήνου ρύσης. Αντιθέτως, αν προκύψει γονιμοποίηση η χοριακή γοναδοτροπίνη που παράγεται από τον πλακούντα, διατηρεί το ωχρό σωματίο μέχρι ο ίδιος ο πλακούντας να μπορεί να παράγει αρκετή προγεστερόνη για να υποστηρίξει την κύηση.^{9,10}



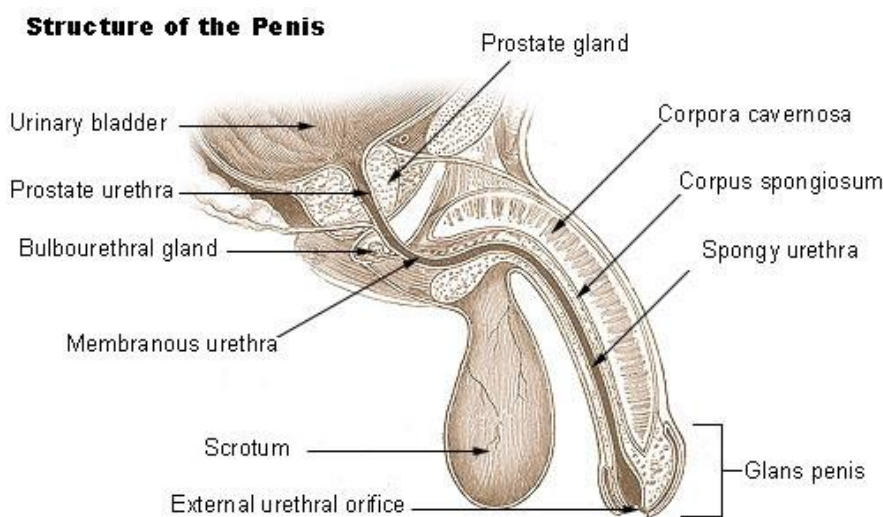
Εικόνα 6. Διακύμανση των ορμονών του άξονα Υποθάλαμος-Υπόφυση-Ωοθήκες κατά τον μηνιαίο κύκλο. (The role of pituitary gonadotropins and intraovarian regulators in follicle development: A mini-review, February 2021, Reproductive Medicine and Biology)

1.6. Ανατομία ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος

Το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα απαρτίζεται από ένα ζευγάρι όρχεων, ένα δίκτυο απεκκριτικών πόρων (επιδιδυμίδα, σπερματικός πόρος), την σπερματοδόχο κύστη, τον προστάτη, τους βολβουρηθραίους αδένες και το πέος. Οι όρχεις είναι ωοειδείς δομές που βρίσκονται στην δεξιά και την αριστερή πλευρά του σσχέου, κάτω από τη βάση του πέους. Ο κάθε όρχις αποτελείται από 250 περίπου λοβίδια, καθένα από τα οποία περιέχει συσπειρωμένα σπερματικά σωληνάκια. Ανάμεσα στα σπερματικά σωληνάκια ευρίσκονται τα κύτταρα Leydig, όπου είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της τεστοστερόνης.¹

Η επιδιδυμίδα βρίσκεται άνωθεν και όπισθεν του κάθε όρχι και είναι ένας μακρύς σωλήνας 6 μέτρων, πυκνά συσπειρωμένος. Η διέλευση του σπέρματος από την επιδιδυμίδα εξασφαλίζει την ωρίμανση του. Συνέχεια της επιδιδυμίδας αποτελεί

ο σπερματικός πόρος, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη μεταφορά σπέρματος από την ουρά της επιδιδυμίδας προς τον προστάτη αδένα.¹



Εικόνα 7. Το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα (διαθέσιμο στο National Cancer Institute)

Οι δύο σπερματοδόχες κύστεις, μήκους περίπου 5 cm η καθεμία, βρίσκονται πίσω και κάτω από την ουροδόχο κύστη, αριστερά και δεξιά. Κάθε σπερματοδόχος κύστη συνδέεται με τον σπερματικό πόρο και είναι υπεύθυνη για την παραγωγή περίπου του 60% του σπερματικού υγρού που απελευθερώνεται στους εκσπερματιστικούς πόρους.

Ένας εξαιρετικά σημαντικός αδένας του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος είναι ο προστάτης που έχει το μέγεθος ενός καρδιού και βρίσκεται κάτω από την ουροδόχο κύστη. Ο ρόλος του είναι η παραγωγή υγρού που συνεισφέρει περίπου στο ένα τρίτο του όγκου του σπέρματος.¹

Οι βολβουρηθραίοι αδένες έχουν το μέγεθος ενός μπιζελιού και βρίσκονται στην αριστερή και δεξιά πλευρά της ουρήθρας, κάτω από τον προστάτη. Παράγουν προ-εκσπερματιστικό υγρό, το οποίο απελευθερώνουν στην ουρήθρα. Εν συνεχεία, η ουρήθρα αποτελεί έναν σωλήνα που εκτείνεται από τη βάση της ουροδόχου κύστης

μέχρι την άκρη του πέους και είναι υπεύθυνη για την έξοδο σπέρματος και ούρων από το σώμα.

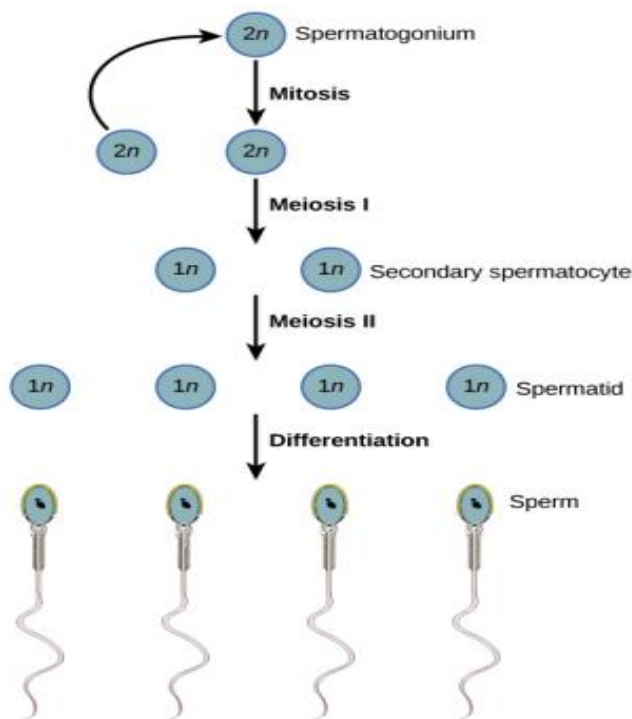
Τέλος, μέρος του εξωτερικού αναπαραγωγικού συστήματος των ανδρών αποτελεί το πέος, το οποίο περιέχει 2 σωλήνες στυτικού ιστού, τα σηραγγώδη σώματα και έναν σπογγώδη σωλήνα που περιβάλλει την ουρήθρα. Ρόλος του είναι η εναπόθεση του σπέρματος στο γυναικείο κόλπο κατά τη σεξουαλική επαφή.^{1,5}

1.7. Σπερματογένεση

Η σπερματογένεση πραγματοποιείται στα σπερματικά σωληνάκια του όρχι και περιλαμβάνει τρεις φάσεις. Στην πρώτη φάση που λαμβάνει χώρα στην έναρξη της εφηβείας, τα σπερματογόνια (διπλοειδή κύτταρα) αρχίζουν να διαιρούνται μέσω μίτωσης ως απόκριση στις ορμόνες που αρχίζουν να εκκρίνονται. Κάποια από τα θυγατρικά κύτταρα υπόκεινται σε αλλαγές και σχηματίζουν τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα, τα οποία είναι επίσης διπλοειδή κύτταρα με 46 χρωμοσώματα. Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτής της μιτωτικής φάσης είναι το γεγονός ότι οι διαιρέσεις των πυρήνων είναι πλήρεις ενώ οι κυτταροπλασματικές δεν ολοκληρώνονται. Έτσι, όλα τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα που προκύπτουν παραμένουν συνδεδεμένα με κυτταροπλασματικές γέφυρες σχηματίζοντας ένα μεγάλο συγκύτιο. Το συγκύτιο αυτό διατηρείται και στις φάσεις της μείωσης.^{1,7}

Στη δεύτερη φάση, λαμβάνει χώρα η πρώτη μειωτική διαίρεση από την οποία προκύπτουν τα δευτερογενή σπερματοκύτταρα, που είναι απλοειδή κύτταρα με 23 χρωμοσώματα το καθένα. Κατά τη διάρκεια της πρώτης μειωτικής διαίρεσης και ανάλογα με το στάδιο της πρόφασης στο οποίο βρίσκονται, τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα μπορούν να διακριθούν σε ξεχωριστές κατηγορίες. Έτσι, έχουμε κατά σειρά το στάδιο της λεπτοταινίας, της ζυγοταινίας, της παχυταινίας και της διπλοταινίας. Από τη δεύτερη μειωτική διαίρεση που ακολουθεί προκύπτουν οι σπερματίδες. Κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης λαμβάνουν χώρα δύο

κυτταρικές διαιρέσεις, αλλά μόνο μία αντιγραφή του DNA έτσι ώστε κάθε σπερματίδα να έχει 23 χρωμοσώματα, ένα από κάθε ζευγάρι του αρχικού πρωτογενούς σπερματοκυττάρου. ^{1,7}



Εικόνα 8. Η διαδικασία της σπερματογένεσης (Animal Reproduction and Development, Human Reproductive anatomy and Gametogenesis, Gametogenesis, διαθέσιμο στο LibreTexts Biology)

Το τελευταίο στάδιο της ανάπτυξης του σπέρματος ονομάζεται σπερμιογένεση. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τον σχηματισμό ώριμων σπερματοζωαρίων μετά από ωρίμανση των σπερματίδων που έχουν προκύψει από τη σπερματογένεση. Ένα ώριμο σπερματοζωάριο έχει μήκος 50 μm και διαθέτει τρεις διακριτές περιοχές: την κεφαλή, τον αυχένα ή μέσο τμήμα και την ουρά ή μαστίγιο. Η κεφαλή περιέχει τον πυρήνα που φέρει το γενετικό υλικό του άνδρα και η άκρη της καλύπτεται από το ακρόσωμα, το οποίο περιέχει ένζυμα που βοηθούν στη διείσδυση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο. Το μέσο τμήμα εμπεριέχει μιτοχόνδρια και προσδίδει την απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωση του σπερματοζωαρίου ενώ η ουρά είναι υπεύθυνη για την κινητικότητά του. Η τελική ωρίμανση του σπέρματος

ολοκληρώνεται στην επιδιδυμίδα έτσι ώστε να είναι ικανό να γονιμοποιήσει το θηλυκό γαμέτη. Η παραγωγή σπέρματος είναι μια συνεχής διαδικασία που ξεκινάει κατά την εφηβεία και συνεχίζεται σε όλη τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής του αρσενικού. Στον άνθρωπο η διαδικασία της σπερματογένεσης διαρκεί περίπου 74 ημέρες. ^{1,7}

2. Υπογονιμότητα

2.1. Ορισμός

Υπάρχουν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις της ιατρικής βιβλιογραφίας όσον αφορά τον ορισμό της υπογονιμότητας, εκ των οποίων η μία είναι η κλινική/επιδημιολογική και η άλλη είναι η δημογραφική προσέγγιση. ¹¹

Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας, η υπογονιμότητα είναι μια ασθένεια του αναπαραγωγικού συστήματος που χαρακτηρίζεται από την αδυναμία επίτευξης κλινικής εγκυμοσύνης μετά από ένα έτος ελεύθερων σεξουαλικών επαφών. Η δημογραφική προσέγγιση, ωστόσο, ορίζει την υπογονιμότητα ως την απουσία γέννησης ζώντος νεογνού από μία σεξουαλικά ενεργή γυναίκα που δεν χρησιμοποιεί αντισύλληψη. Η παραπάνω προσέγγιση συμφωνεί περισσότερο με την κοινή αντίληψη του τι είναι η υπογονιμότητα, καθώς τα ζευγάρια στην πλειοψηφία τους αναζητούν τη γέννηση ενός ζώντος νεογνού και όχι απλά τη σύλληψη. ¹¹

Η υπογονιμότητα επηρεάζει περίπου 1 στα 6 άτομα αναπαραγωγικής ηλικίας παγκοσμίως. Στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα, χαρακτηρίζεται κυρίως από

διαταραχές εκσπερμάτισης, χαμηλά επίπεδα ή απουσία σπέρματος ή μη φυσιολογική μορφολογία και κινητικότητα σπέρματος. Όσον αφορά στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα, η υπογονιμότητα μπορεί να προκληθεί, μεταξύ άλλων, από ανωμαλίες στις ωοθήκες, τη μήτρα, τις σάλπιγγες και το ενδοκρινικό σύστημα.¹¹

Σε γενική βάση, η μελέτη των υπογόνιμων ζευγαριών συνήθως επικεντρώνεται στους εξής παράγοντες: τον παράγοντα της ωορρηξίας (παρόν στο 20% των ζευγαριών), τον παράγοντα της φυσιολογικής μήτρας και των σαλπίγγων (~30% των περιπτώσεων), την κινητικότητα και μετανάστευση του σπέρματος (10% των περιπτώσεων) και τον ανδρικό παράγοντα (30% των περιπτώσεων). Ένα 40% των υπογόνιμων ζευγαριών εκδηλώνει ένα συνδυασμό όλων αυτών των παραγόντων.¹⁵

Αξίζει να σημειωθεί πως η υπογονιμότητα διακρίνεται σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή. Στην πρωτοπαθή, δεν έχει επιτευχθεί καμία εγκυμοσύνη από το εξεταζόμενο άτομο ενώ στην δευτεροπαθή, έχει επιτευχθεί τουλάχιστον μία εγκυμοσύνη στο παρελθόν.¹¹

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχουν υπάρξει τρεις σημαντικές αλλαγές στον τομέα της υπογονιμότητας. Πρώτον, η εμφάνιση της τεχνολογίας της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής έδωσε την ευκαιρία για τη μελέτη βασικών αναπαραγωγικών διαδικασιών. Δεύτερον, αλλαγές που αφορούν την καριέρα και τη θέση της γυναίκας στην κοινωνία, οδήγησαν στην αύξηση των γυναικών άνω των 35 ετών που επιδιώκουν εγκυμοσύνη. Τρίτον, η ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας και γενετικής συνέβαλε στην διάγνωση και αξιολόγηση της υπογονιμότητας ζευγαριών που μέχρι πρότινος προσδιορίζονταν ως ζευγάρια με ανεξήγητη υπογονιμότητα.¹⁵

2.2.Αίτια υπογονιμότητας

Μία πληθώρα παραγόντων μπορεί να προκαλέσει υπογονιμότητα, είτε σε έναν άνδρα είτε σε μία γυναίκα. Ωστόσο, κάποιες φορές είναι αδύνατον να

προσδιοριστούν οι λόγοι που την προκαλούν (ανεξήγητη υπογονιμότητα). Στη γυναίκα, η υπογονιμότητα μπορεί να οφείλεται σε:

- ❖ **Απόφραξη των ωαγωγών** που προκαλείται από σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα ή από επιπλοκές μιας έκτρωσης

- ❖ **Διαταραχές εντός της μήτρας** που μπορεί να είναι φλεγμονώδεις (όπως η ενδομητρίωση), συγγενείς (όπως το διάφραγμα μήτρας) ή καλοήθειες (όπως τα ινομυώματα). Στις διαταραχές αυτές συγκατατάσσονται επίσης και δομές εντός της μήτρας γνωστές ως πολύποδες, ανωμαλίες σχήματος της μήτρας και προβλήματα με το κατώτερο μέρος της, τον τράχηλο. Όσον αφορά στα ινομυώματα, είναι συχνά αιτία απόφραξης των ωαγωγών ενώ παρεμποδίζουν επίσης την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου στη μήτρα

- ❖ **Ωοθηκικές διαταραχές** που μπορεί να επηρεάσουν με ποικίλους τρόπους την απελευθέρωση των ωαρίων από τις ωοθήκες, δηλαδή την ωορρηξία. Σε αυτές τις διαταραχές συμπεριλαμβάνονται ορμονικά προβλήματα, όπως το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών. Τα υψηλά επίπεδα προλακτίνης, μιας ορμόνης υπεύθυνης για την παραγωγή του μητρικού γάλακτος, είναι χαρακτηριστικά της υπερπρολακτιναιμίας και μπορούν επίσης να επηρεάσουν την ωορρηξία. Επιπλέον, στις ορμονικές διαταραχές που ενδέχεται να προκαλέσουν υπογονιμότητα συγκατατάσσεται ο υπερθυρεοειδισμός και ο υποθυρεοειδισμός. Ο ρόλος της υπερβολικής άσκησης, των διατροφικών διαταραχών και των όγκων δεν είναι καθόλου αμελητέος στις περιπτώσεις υπογονιμότητας.

- ❖ **Διαταραχές του ενδοκρινικού συστήματος** στο οποίο εμπλέκονται ο υποθάλαμος και η υπόφυση, με αποτέλεσμα την ανισορροπία στις αναπαραγωγικές ορμόνες. (π.χ. υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός)

- ❖ **Ενδομητρίωση.** Στη συγκεκριμένη πάθηση, ιστός παρόμοιος με το εσωτερικό στρώμα της μήτρας (ενδομήτριο) αναπτύσσεται και έξω από τη μήτρα,

γεγονός που επηρεάζει αρνητικά τη λειτουργία των ωοθηκών, της μήτρας και των σαλπίγγων.

❖ **Πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια.** Η λειτουργία των ωοθηκών και η έμμηνος ρύση διακόπτονται πριν την ηλικία των 40 ετών. Η πάθηση αυτή είναι συνήθως ιδιοπαθούς αιτιολογίας αλλά κάποιοι παράγοντες που μπορεί να συνδέονται με την εμφάνιση της είναι νόσοι του ανοσοποιητικού, γενετικές παθήσεις όπως το σύνδρομο Turner και έκθεση σε ακτινοθεραπείες ή χημειοθεραπείες.

❖ **Καρκίνος.** Τα είδη καρκίνου που προσβάλλουν τα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος καθώς και οι θεραπείες αντιμετώπισής τους, συχνά μειώνουν τη γυναικεία γονιμότητα. ¹⁶

Στον άνδρα, η υπογονιμότητα μπορεί να οφείλεται σε:

❖ **Επιπλοκές της εκσπερμάτισης** που επηρεάζουν τη διέλευση του σπέρματος από την γυναικεία αναπαραγωγική οδό. Μπορεί να προκύψουν λόγω απόφραξης της αναπαραγωγικής οδού, τραυματισμών και μολύνσεων ή λόγω γενετικών ασθενειών όπως η κυστική ίνωση.

❖ **Καταστάσεις που επηρεάζουν την ποσότητα και την ποιότητα του σπέρματος.** Παραδείγματα αποτελούν οι γενετικές ασθένειες, ο διαβήτης, και οι μολύνσεις όπως τα χλαμύδια, η γονόρροια, η παρωτίτιδα και ο ιός HIV. Ορμονικές διαταραχές που επηρεάζουν την παραγωγή των ορμονών της υπόφυσης, του υποθαλάμου και των όρχεων (όπως ο υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός) μπορεί να προκαλέσουν ανωμαλίες στον αριθμό και το σχήμα των σπερματοζωαρίων.

❖ **Περιβαλλοντικοί παράγοντες.** Η έκθεση σε φυτοφάρμακα, παρασιτοκτόνα και άλλα χημικά ή ακτινοβολία επηρεάζει την γονιμότητα. Ακόμη, φαρμακευτικά σκευάσματα για την αντιμετώπιση των βακτηριακών λοιμώξεων, της υπέρτασης και της κατάθλιψης ενδέχεται να επηρεάσουν την ικανότητα παραγωγής

σπέρματος. Το ίδιο αντίκτυπο στην γονιμότητα έχει και η έκθεση των όρχεων σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες.¹⁶

❖ **Καρκίνος και θεραπείες αντιμετώπισής του.** Ο καρκίνος έχει συσχετιστεί με περιπτώσεις αζωοσπερμίας και ολιγοσπερμίας. Σύμφωνα με τους Joshi et al., οι ακτινοθεραπείες και οι χημειοθεραπείες έχουν κυτταροτοξική επίδραση στο επιθήλιο των όρχεων, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων Sertoli και Leydig, με αποτέλεσμα την πρόκληση βλάβης στη διαδικασία της σπερματογένεσης.¹⁷ Επιπλέον, η ποσότητα του σπέρματος έχει αποδειχθεί ότι μειώνεται δραματικά εντός δύο μηνών από τη θεραπεία κατά του καρκίνου.¹⁸

Male infertility disorders	Percentage References
Varicocele	37–40 %
Endocrine disorders	>20 %
Genital tract infections	8–35 %
Testicular failure	9 %
Genetic disorders	15–30 %
Antisperm antibody	8–19 %
Idiopathic	15–25 %

Εικόνα 9. Αίτια ανδρικής υπογονιμότητας. (Tahmasbpour e. et al.. A multifaceted approach to understanding male infertility :gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART). J Assist Reprod Genet (2014) 31:1115–1137)

Γενικότερα, ο τρόπος ζωής και οι συνήθειες όπως το κάπνισμα, η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ και η παχυσαρκία μπορούν να επηρεάσουν την γονιμότητα. Επιπλέον, η έκθεση σε περιβαλλοντικούς ρύπους και τοξίνες μπορεί να είναι άμεσα τοξική για τους γαμέτες (ωάρια και σπερματοζωάρια), οδηγώντας σε μειωμένους

αριθμούς και πτωχή ποιότητα.¹² Αξίζει, ωστόσο, να σημειωθεί ότι ένα 60–75% των περιπτώσεων υπογονιμότητας είναι ιδιοπαθείς.

Στη σημερινή εποχή, η υπογονιμότητα ενός ζευγαριού μπορεί να αντιμετωπιστεί μέσω των πολυάριθμων μεθόδων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, που έχουν φέρει καινοτομία στον τομέα της αναπαραγωγικής ιατρικής. Η επιλογή της μεθόδου αντιμετώπισης γίνεται λαμβάνοντας υπόψη συγκεκριμένους παράγοντες όπως το αίτιο της υπογονιμότητας, το χρονικό διάστημα για το οποίο το ζευγάρι δυσκολεύεται να τεκνοποιήσει και την ηλικία των δύο συντρόφων. Ωστόσο, η θεραπεία εκτός από το μεγάλο οικονομικό της κόστος, συχνά ενέχει σωματική και ψυχολογική φθορά για το ζευγάρι.¹⁶

2.3. Υπογονιμότητα και υποβοηθούμενη αναπαραγωγή

Οι τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, σύμφωνα με το CDC (Center for Disease Control), περιλαμβάνουν όλες τις θεραπείες γονιμότητας στις οποίες γίνεται χειρισμός γαμετών ή εμβρύων.²⁰ Ενδεικτικά, οι κύριες μέθοδοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής είναι οι παρακάτω:

- ✓ Εξωσωματική γονιμοποίηση (in vitro fertilization – IVF)
- ✓ Μικρογονιμοποίηση (ICSI)
- ✓ Δωρεά εμβρύων – ωαρίων
- ✓ Προεμφυτευτική Διάγνωση (PGD)
- ✓ Παρένθετη μητρότητα

Η εξωσωματική γονιμοποίηση ή in vitro fertilization (IVF) είναι η πιο κοινή μορφή υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Ο όρος in vitro χρησιμοποιείται γιατί παρόλο που τα ωάρια ωριμάζουν στις ωοθήκες και τα έμβρυα αναπτύσσονται στη μήτρα, η γονιμοποίηση των ωαρίων γίνεται εκτός του ανθρώπινου σώματος, σε ένα τρυβλίο petri. Η γέννηση του πρώτου ζώντος νεογνού μέσω IVF έλαβε χώρα στην

Αγγλία τον Ιούλιο του 1978 και δημιουργήθηκε από τους Robert Edwards, Ph.D. και Patrick Steptoe, MD. Το επίτευγμα αυτό οδήγησε τον πρώτο στην απόκτηση του βραβείου Nobel Ιατρικής το 2010.¹⁹



Εικόνα 10. Η Louise Brown, το πρώτο παιδί που γεννήθηκε με τη μέθοδο της εξωσωματικής γονιμοποίησης στην Αγγλία το 1978. Διαθέσιμο στο: <https://www.ingenesis.com/wp-content/uploads/2022/07/BLOG-destacada-960-x-720-3.jpg>

Έπειτα από αυτό το ορόσημο στην αντιμετώπιση της υπογονιμότητας, ο τομέας της αναπαραγωγικής ενδοκρινολογίας έχει σημειώσει ραγδαία πρόοδο με την εξωσωματική γονιμοποίηση να χρησιμοποιείται στο 1.6% και το 4.5% των γεννήσεων παιδιών στην Αμερική και την Ευρώπη, αντίστοιχα. Ενώ αρχικά χρησιμοποιήθηκε για την αντιμετώπιση των ανιάτων παθήσεων των ωαγωγών, σήμερα η IVF συστήνεται για την αντιμετώπιση της υπογονιμότητας που οφείλεται στην ενδομητρίωση, τον ανδρικό παράγοντα αλλά και την ανεξήγητη υπογονιμότητα. Ακόμα και οι γυναίκες που δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα δικά τους ωάρια, είτε λόγω πρόωρης ωοθηκικής ανεπάρκειας είτε λόγω μείωσης του ωοθηκικού αποθέματος σχετιζόμενης

με την ηλικία, μπορούν να επιτύχουν εγκυμοσύνη χρησιμοποιώντας ωάριο από γυναίκα-δότη. ¹⁹

Η ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίου **ICSI** (Intracytoplasmic sperm injection), είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται κατά την εξωσωματική γονιμοποίηση όπου ένα σπερματοζωάριο εισάγεται απευθείας εντός του ωαρίου, με τεχνητό τρόπο, προκειμένου να το γονιμοποιήσει. Σύμφωνα με την Αμερικάνικη εταιρεία αναπαραγωγικής ιατρικής, η τεχνική ICSI είναι μια ασφαλής και αποτελεσματική διαδικασία για ζευγάρια στα οποία η υπογονιμότητα οφείλεται στον ανδρικό παράγοντα. Ωστόσο, υπάρχουν ευρήματα που τη συνδέουν με αυξημένο κίνδυνο για χρωμοσωμικές ανωμαλίες, αυτισμό και νοητικές δυσκολίες σε σχέση με τη συμβατική IVF. Επίσης, αυξάνει το κόστος ενός κύκλου IVF οπότε αυτό την καθιστά σαν τεχνική, πιο ακριβή από την συμβατική IVF. ²¹

Η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση **PGD** (Pre-implantation genetic diagnosis) ορίζεται ως η εξέταση εμβρύων ή ωοκυττάρων για γενετικές ασθένειες στο προεμφυτευτικό στάδιο. Προορίζεται για ζευγάρια των οποίων οι απόγονοι φέρουν μεγάλο κίνδυνο για Μενδελιανά γενετικά νοσήματα, δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες ή μιτοχονδριακές ασθένειες. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη λήψη εμβρυϊκού ιστού και τη χρήση είτε in situ υβριδισμού με φθορισμό ή PCR στο στάδιο του ενός κυττάρου. Η προεμφυτευτική διάγνωση δίνει τη δυνατότητα ελέγχου και για περιπτώσεις ανευπλοειδίας.

2.4. Πρωτόκολλα διέγερσης ωοθηκών

Οι πρώτες θεραπείες εξωσωματικής γονιμοποίησης ακολουθούσαν τον φυσιολογικό μηνιαίο κύκλο της γυναίκας, με αποτέλεσμα τη λήψη ενός μόνο ωαρίου. Ωστόσο, σύμφωνα με μεταγενέστερες έρευνες, είναι δυνατή η πρόκληση ωορρηξίας με τη χορήγηση γοναδοτροπινών έτσι ώστε να ληφθούν περισσότερα ωάρια από αυτά που θα παράγονταν φυσιολογικά. Υπάρχει μια ποικιλία πρωτοκόλλων για τη

διέγερση ωοθηκών, ανάλογα με τις ανάγκες της εκάστοτε ασθενούς που υποβάλλεται σε θεραπεία εξωσωματικής γονιμοποίησης.²²

2.4.1. Κιτρική κλομιφαίνη

Η κιτρική κλομιφαίνη ήταν από τα πρώτα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διέγερση ωοθηκών είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με γοναδοτροπίνες. Η δοσολογία περιλαμβάνει 150 mg ημερησίως για 5-8 ημέρες, ξεκινώντας από την 2η με 5η ημέρα του κύκλου. Τα κύρια πλεονεκτήματά της είναι η χαμηλή τιμή και ο μικρός έως και αμελητέος κίνδυνος για την εμφάνιση συνδρόμου υπερδιέγερσης των ωοθηκών. Ωστόσο, ο συνδυασμός της με γοναδοτροπίνες αυξάνει αυτόν τον κίνδυνο. Η κιτρική κλομιφαίνη ως αντι-οιστρογόνο, συνδέεται στους υποδοχείς των οιστρογόνων στον υποθάλαμο και την υπόφυση, αυξάνοντας την έκλυση της GnRH και συνεπώς την έκλυση των γοναδοτροπινών της υπόφυσης, οι οποίες με την σειρά τους διεγείρουν την ανάπτυξη των ωοθυλακίων στις ωοθήκες. Η εμφάνιση των GnRH αγωνιστών το 1980, αλλά και των GnRH ανταγωνιστών αργότερα, απέδειξε ότι αυτές οι τεχνικές είναι πολύ πιο αποτελεσματικές όσον αφορά τον αριθμό των ληφθέντων ωοκυττάρων και το ποσοστό των κλινικών κυήσεων. Πιθανές επιπλοκές που μπορεί να προκύψουν από την χρήση της κιτρικής κλομιφαίνης ως θεραπεία είναι: καρκίνος των ωοθηκών, αντιοιστρογονικές επιδράσεις στο ενδομήτριο, και πρόωπη αιχμή της LH. Σύμφωνα με τους Rossing et al., η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών αυξάνεται εάν γίνει παρατεταμένη χρήση της ανωτέρω για περισσότερους από 12 κύκλους. Έτσι, το όριο των 6 κύκλων είναι αυτό που συστήνεται στη θεραπεία με κιτρική κλομιφαίνη.²³

2.4.2. GnRH ανάλογα

Τα GnRH ανάλογα είναι δεκαπεπτίδια σχεδιασμένα με βάση την ανθρώπινη GnRH με σκοπό να αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς της στην υπόφυση. Αυτά τα ανάλογα έχουν προκύψει από υποκαταστάσεις στην αμινοξική αλληλουχία της

ενδογενούς GnRH που συντελούν στην αύξηση της ημίσειας ζωής των αναλόγων σε σχέση με τις φυσικά παραγόμενες ορμόνες. Οι GnRH αγωνιστές προάγουν την έμμεση καταστολή της υπόφυσης μέσω παρατεταμένης διέγερσης της έκκρισης των γοναδοτροπινών, ενώ οι GnRH ανταγωνιστές προκαλούν άμεση αναστολή απελευθέρωσης γοναδοτροπινών μέσω ανταγωνιστικής κατοχής των υποδοχέων GnRH στην υπόφυση, δρώντας έτσι ως διαμεσολαβητές για την λεγόμενη χημική «υποφυσεκτομή». ^{24,25}

Και τα δύο είδη αναλόγων χρησιμοποιούνται ευρέως στην εξωσωματική γονιμοποίηση για την τεχνητή πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας μέσω της αναστολής της αιχμής της ενδογενούς LH και της προγραμματισμένης ωληψίας. Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι GnRH αγωνιστές είναι οι triptorelin, leuprorelin, deslorelin, goserelin και nafarelin, ενώ οι cetrorelix and ganirelix χρησιμοποιούνται ως GnRH ανταγωνιστές. Υπάρχει μια ποικιλία πρωτοκόλλων αγωνιστών όπως το υπερβραχύ, το βραχύ και το μακρύ πρωτόκολλο. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο είναι το μακρύ πρωτόκολλο που ανακαλύφθηκε τη δεκαετία του 1980 και χρησιμοποιείται στην εξωσωματική με μεγάλα ποσοστά επιτυχίας. ²⁴

2.4.3. Μακρύ πρωτόκολλο (Long Protocol)

Στο μακρύ πρωτόκολλο, χορηγείται την 21η ημέρα του κύκλου 0,1 mg GnRH αγωνιστή (παραδείγματος χάριν, triptorelin) που ακολουθείται από τη χορήγηση 150-225 IU γοναδοτροπινών καθημερινά ξεκινώντας από την 2^η ημέρα του κύκλου. Η δόση των γοναδοτροπινών προσαρμόζεται με βάση την ωοθυλακική ανάπτυξη. Η συνεχόμενη χορήγηση GnRH αγωνιστή και γοναδοτροπινών διαρκεί έως την ένεση της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG), η οποία πραγματοποιείται περίπου 14 ημέρες μετά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου ή όταν το μέγεθος τουλάχιστον τριών ωοθυλακίων φτάσει τα 16-18 χιλιοστά (mm). ²⁵

Η χρήση αυτού του πρωτοκόλλου προκαλεί μια αρχική αύξηση της έκκρισης FSH και LH από την υπόφυση. Σαν αποτέλεσμα, είναι πιθανό να σχηματιστεί κύστη στα ωοθυλάκια λόγω των υψηλών επιπέδων οιστραδιόλης που παράγονται από την υπόφυση. Η συχνότητα εμφάνισής τους είναι 2-40% των περιπτώσεων.

Για τον περιορισμό της πιθανότητας εμφάνισης κύστεων, προτείνεται ο GnRH αγωνιστής να χορηγείται όταν η υπόφυση εμφανίζει μικρότερη ευαισθησία στις γοναδοτροπίνες. Αυτό σημαίνει ότι πρέπει να χορηγείται παρουσία προγεστερόνης στον ορό των ασθενών, άρα είτε στη μέση της ωχρινικής φάσης είτε κατά τη διάρκεια λήψης εξωγενούς προγεστερόνης όπως είναι τα αντισυλληπτικά.

Τα βασικά πλεονεκτήματα της συγχορήγησης GnRH αγωνιστή και αντισυλληπτικών είναι: 1) Η αποφυγή λειτουργικών κύστεων και εγκυμοσύνης από φυσική σύλληψη, 2) Αποφυγή των αιχμών LH, 3) Βελτιωμένη απόκριση στις γοναδοτροπίνες, 4) Διευκόλυνση προγραμματισμού των κύκλων εξωσωματικής γονιμοποίησης.²⁵

2.4.4. Βραχύ πρωτόκολλο (*Short Protocol*)

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο διέγερσης εκμεταλλεύεται την αρχική αύξηση των γοναδοτροπινών κατά τη στρατολόγηση ωοθυλακίων. Ο GnRH αγωνιστής χορηγείται την 2η ημέρα του κύκλου και την αμέσως επόμενη ημέρα (3η) ξεκινά η θεραπεία με γοναδοτροπίνες. Κάποιες μέρες μετά επέρχεται η απευαισθητοποίηση της υπόφυσης.²⁵

2.4.5. Υπερβραχύ πρωτόκολλο (*Ultra-Short Protocol*)

Το πρωτόκολλο αυτό βασίζεται στην πολύ μικρή διάρκεια χορήγησης GnRH-a, η οποία επαρκεί για την καταστολή της αιχμής της LH. Απευθύνεται σε ασθενείς που είναι πτωχές απαντήτριες και η χορήγηση του αγωνιστή γίνεται τις πρώτες μέρες της

ωοθυλακικής φάσης για διάστημα 3 ημερών ενώ στη συνέχεια χορηγούνται εξωγενώς οι γοναδοτροπίνες.²⁵

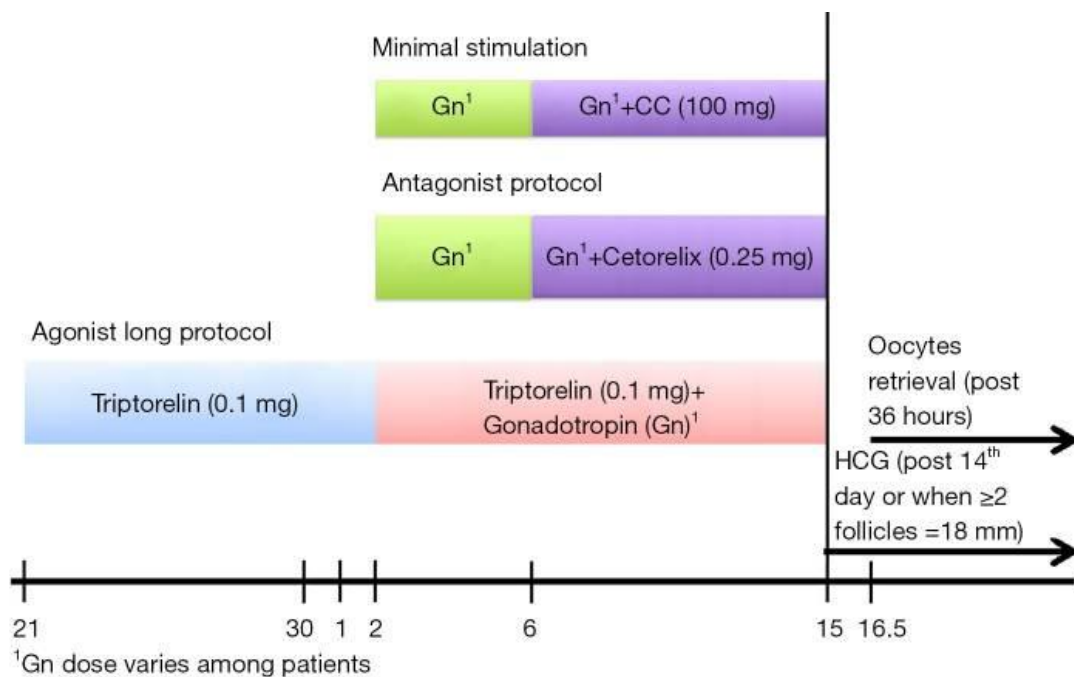
2.4.6. Πρωτόκολλα με GnRH ανταγωνιστή

Όσον αφορά στο πρωτόκολλο GnRH ανταγωνιστή, 150-225 IU γοναδοτροπίνης χορηγούνται καθημερινά από την 2η με 3^η ημέρα του κύκλου αφού πρώτα έχει γίνει εκτίμηση του μεγέθους των ωοθυλακίων της ασθενούς. Εδώ, η δόση καθορίζεται με βάση την απόκριση των ωοθυλακίων. Έξι ημέρες μετά την ένεση γοναδοτροπίνης ή όταν το μέγεθος των ωοθυλακίων γίνει μεγαλύτερο ή ίσο με 14 mm, γίνεται υποδόρια ένεση GnRH ανταγωνιστή (για παράδειγμα, cetrorelix). Τα πρωτόκολλα με GnRH ανταγωνιστές εμφανίζουν αρκετά πλεονεκτήματα. Αρχικά, λόγω της μικρότερης διάρκειάς του ως πρωτόκολλο και της περιορισμένης εμφάνισης παρενεργειών, οι ασθενείς «συμφιλιώνονται» πιο εύκολα με αυτό. Επιπλέον, απαιτείται χορήγηση μικρότερης ποσότητας γοναδοτροπινών και περιορίζεται η εμφάνιση του συνδρόμου υπερδιέγερσης ωοθηκών. Τέλος, το συνολικό κόστος της θεραπείας είναι πολύ χαμηλότερο σε σχέση με τα πρωτόκολλα GnRH αγωνιστών.²⁵

Και στα δύο πρωτόκολλα πραγματοποιείται στενή παρακολούθηση των ασθενών μέσω διακολπικού υπερηχογραφήματος και ορμονικές εξετάσεις για την ποσοτικοποίηση FSH, LH, οιστρογόνων και προγεστερόνης. Έπειτα από 34-36 ώρες από την ένεση hCG, γίνεται λήψη των ώριμων ωαρίων. Οι ασθενείς με αυξημένα επίπεδα LH και οιστρογόνων έχουν αυξημένο κίνδυνο για πρόωρη ωορρηξία για αυτό και χρήζουν έντονης παρακολούθησης. Επίσης, είναι σημαντικό να διακόπτονται τα πρωτόκολλα διέγερσης σε περίπτωση κινδύνου για σύνδρομο υπερδιέγερσης ωοθηκών.²⁴

2.4.7. Σύγκριση GnRH αγωνιστών και ανταγωνιστών

Σε σχέση με τους αγωνιστές, οι ανταγωνιστές χρειάζονται μικρότερη δόση FSH για την ωθηκική διέγερση. Ωστόσο, σύμφωνα με δημοσιευμένη βιβλιογραφία, με τη χρήση ανταγωνιστών λαμβάνεται ελαφρώς μικρότερος αριθμός ωαρίων κατά την ωληψία, λιγότερα έμβρυα είναι κατάλληλα για εμβρυομεταφορά και τα ποσοστά κυήσεων μειώνονται σε σχέση με τη χρήση αγωνιστών. Έχει επίσης αναφερθεί ότι οι πτωχές απαντήτριες σε πρωτόκολλα διέγερσης με GnRH αγωνιστή, ίσως ανταποκρίνονται καλύτερα με τη χρήση ανταγωνιστών ως εναλλακτική λύση. ²⁵



Εικόνα 11. Πρωτόκολλα διέγερσης με GnRH αγωνιστή και ανταγωνιστή. (Shrestha D, La X, Feng HL. Comparison of different stimulation protocols used in in vitro fertilization: a review. *Ann Transl Med.* 2015;3(10):137)

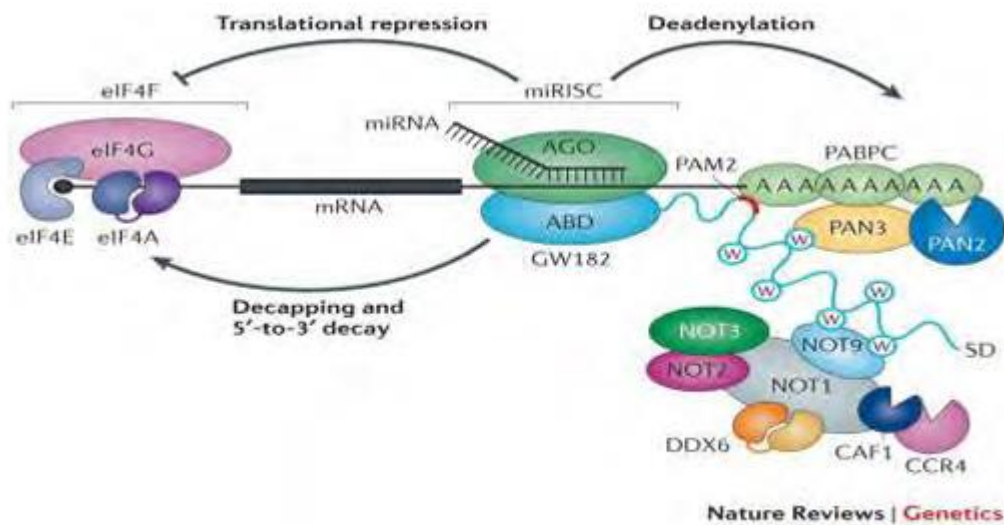
3. Μη κωδικοποιητικά μόρια RNA

3.1. Ορισμός

Ο όρος μη κωδικοποιητικά (non coding) RNAs, όπως υποδηλώνει και η ονομασία τους, αναφέρεται σε αυτά τα RNA που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν φέρουν άλλου είδους πληροφορίες και λειτουργίες.²⁶ Αυτά τα μόρια RNA έχουν κατηγοριοποιηθεί με βάση τις λειτουργίες, τη βιογένεση και το μέγεθός τους στα ακόλουθα είδη: τα ncRNAs σταθερής έκφρασης (**housekeeping ncRNAs**), όπως για παράδειγμα τα μικρά πυρηνικά RNA (snRNAs) αλλά και τα ρυθμιστικά ncRNAs (**regulatory ncRNAs**) όπως είναι τα microRNAs (miRNAs), τα PIWI-interacting RNAs (piRNAs) και τα ενδογενή small interfering RNAs (endo-siRNAs). Νεότερες κατηγορίες sncRNAs αποτελούν τα tRNA-derived small RNAs (tsRNAs) και τα rRNA-derived small RNAs (rsRNAs) τα οποία ανακαλύφθηκαν πρόσφατα και δεν έχουν ακόμα μελετηθεί εις βάθος.¹⁴ Τα ncRNAs “κρύβουν” σήματα που ελέγχουν ποικίλα στάδια της γονιδιακής έκφρασης ρυθμίζοντας, έτσι, μια πληθώρα διαδικασιών μερικές από τις οποίες είναι η αναδίπλωση της χρωματίνης, οι επιγενετικές τροποποιήσεις και το RNA splicing.²⁶

Αποσιώπηση γονιδίων- RNA silencing

Το RNA silencing ή παρεμβολή του RNA όπως αποκαλείται, είναι το φαινόμενο που προκαλεί τη μετα-μεταγραφική σίγαση ενός γονιδίου μετά από ενδογενή παραγωγή ή από εισαγωγή στο κύτταρο ενός μικρομοριακού παρεμβατικού RNA με αλληλουχία συμπληρωματική με αυτή του γονιδίου.¹³ Η διαδικασία αυτή ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά στο νηματοειδές *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) και χαρακτηρίστηκε ως σημαντικός ρυθμιστής διαφόρων βιολογικών διαδικασιών αλλά και ασθενειών στα ζώα.¹⁴

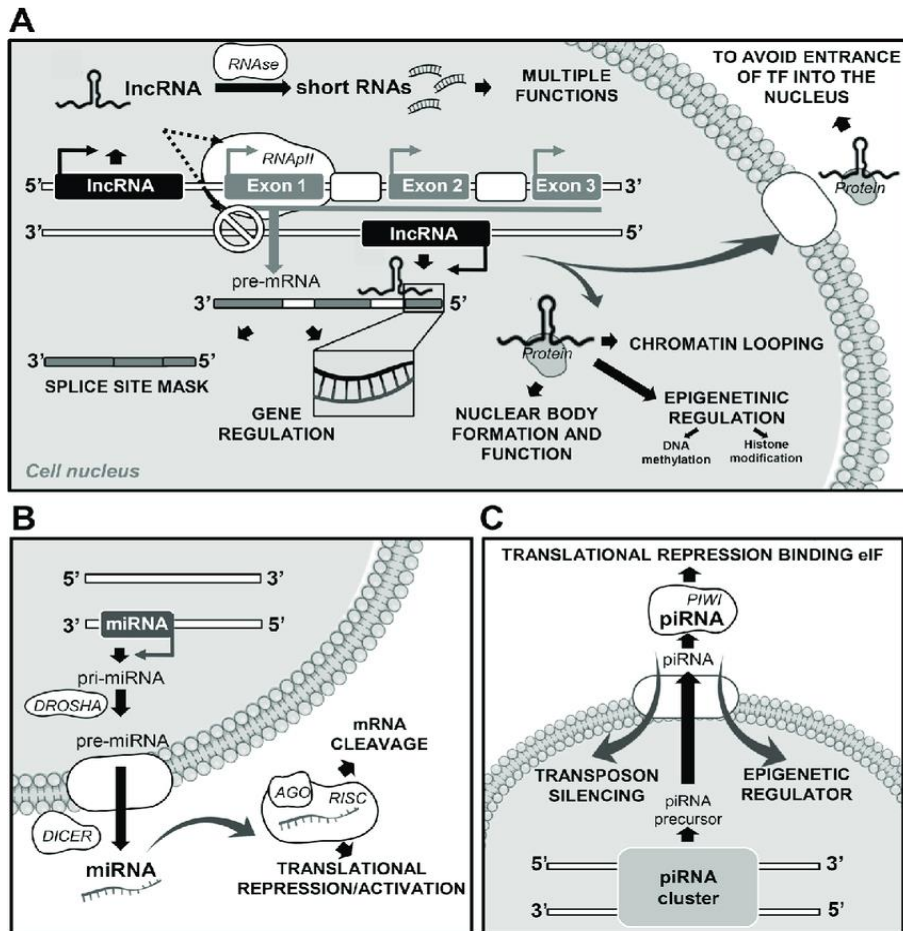


Εικόνα 12. Τρόπος δράσης μικρών μη κωδικών μορίων και συνεργαζόμενων πρωτεϊνών για την αποσιώπηση mRNA στόχων (Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of micro RNA-mediated gene silencing. Nature Reviews. Genetics; (2015): 421-433.)

Έρευνες έχουν δείξει ότι τα miRNAs, τα endo-siRNAs και τα piRNAs είναι οι κύριοι ρυθμιστές της ανάπτυξης των γαμετικών κυττάρων σε επιγενετικό, μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Μάλιστα έχει αποδειχθεί πως η έλλειψη των ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεσή τους οδηγεί σε υπογονιμότητα.¹⁷ Επιπλέον, τα εξωκυτταρικά sncRNAs χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτες για την ποιότητα του σπέρματος και των ωοκυττάρων. Όσον αφορά στη συνεισφορά τους στην εμβρυική ανάπτυξη, τα miRNAs και τα tsRNAs πιθανόν να εμπλέκονται στην μεταβίβαση πατρικώς κληρονομούμενων διαταραχών, αποκαλύπτοντας έτσι πιθανούς μηχανισμούς προδιάθεσης για μία πληθώρα ασθενειών.¹⁴

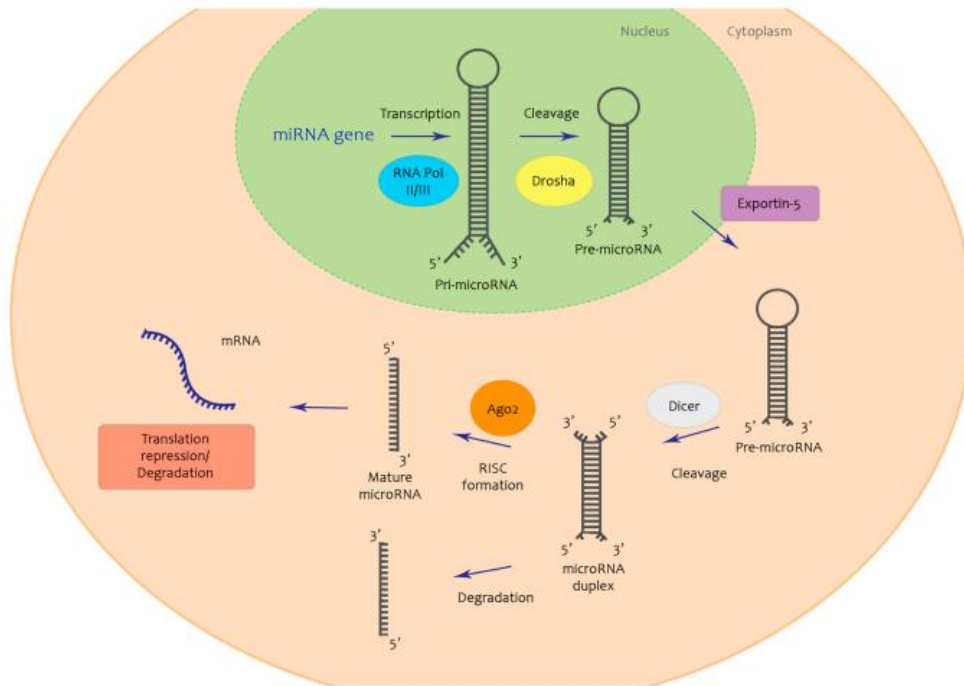
3.2. Βιογένεση των ncRNAs

Τα καλύτερα μελετημένα μη κωδικοποιητικά RNAs είναι τα miRNAs, τα endo-siRNAs, και τα piRNAs. Υπάρχουν επίσης και τα long non-coding RNAs (lncRNAs).



Εικόνα 13. Μη κωδικοποιητικά RNAs- Μηχανισμοί δράσης. A. Long non coding RNAs και short RNAs. B. miRNAs. C. piRNAs (Robles, Vanesa & Valcarce, David & Riesco, Marta. (2019). Non-coding RNA regulation in reproduction: Their potential use as biomarkers. Non-coding RNA Research. 4. 10.1016/j.ncrna.2019.04.001.)

Το μονοπάτι παραγωγής του miRNA ξεκινά με τη μεταγραφή του προ-πρόδρομου (primary) miRNA (pri-miRNA) από την RNA πολυμεράση II και III. Το pri-miRNA, το οποίο έχει τη δομή φουρκέτας, κόβεται από το σύμπλοκο Drosha-DGCR8 και ως αποτέλεσμα σχηματίζεται στον πυρήνα το πρόδρομο (precursor) miRNA (pre-miRNA) μήκους ~65 νουκλεοτιδίων.¹⁴



Εικόνα 14. Αναπαράσταση βιογένεσης miRNA (Barbu MG, Thompson DC, Suci N, Voinea SC, Cretoiou D, Predescu DV. The Roles of MicroRNAs in Male Infertility. *Int J Mol Sci.* 2021;22(6):291)

Έπειτα, αυτό μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα από την Exportin 5-Ran GTPάση όπου και κόβεται περαιτέρω από την DICER σε κομμάτια ~22 νουκλεοτιδίων, που ακολούθως φορτώνονται ξανά με τη βοήθεια των DICER, TRBP και PACT στις πρωτεΐνες της οικογένειας Argonaute (AGO). Το ώριμο miRNA παραμένει συνδεδεμένο στις πρωτεΐνες AGO, σχηματίζοντας το σύμπλοκο αποσιώπησης (miRNA-induced silencing complex), miRISC. Εντός του miRISC, το miRNA λειτουργεί ως μόριο-οδηγός στοχεύοντας τις 3' αμετάφραστες περιοχές των mRNA στόχων μέσω ατελούς ζευγαρώματος βάσεων. Το ζευγάρωμα αυτό αποσκοπεί στην καταστροφή του mRNA ή στην αναστολή της έκφρασής του. Ο άλλος κλώνος του miRNA αποικοδομείται.¹⁴

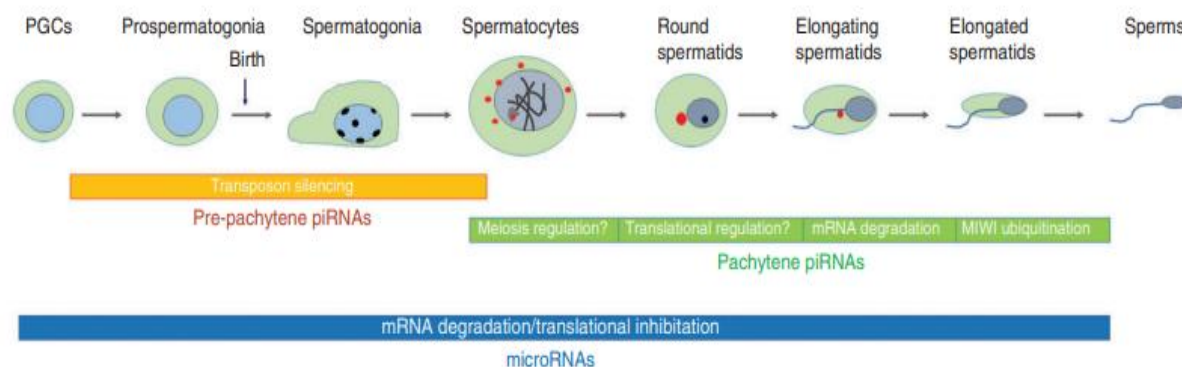
Όσον αφορά στα miRNAs, μόλις διαπιστωθεί η ύπαρξη ενός μη κωδικού μορίου RNA, καταχωρείται στη βάση δεδομένων miRBase Registry, με μια μοναδική ονομασία. Σύμφωνα με τους κανόνες ονοματολογίας, ένα ώριμο miRNA φέρει το πρόθεμα "miR" ακολουθούμενο από έναν μοναδικό αριθμό αναγνώρισης π.χ. miR-

1, miR-2 κ.λ.π. Ένα επιπλέον πρόθεμα τριών γραμμάτων καθορίζει την προέλευση του miRNA π.χ. το miR-1 του Homo sapiens αναφέρεται ως hsa-miR-1. Επιπλέον, χαρακτηρίζονται από την προσθήκη ενός γράμματος ή ενός αριθμού στο τέλος του ονόματος, για τη διάκριση ανάμεσα σε παρόμοιες ή ταυτόσημες αλληλουχίες, αντίστοιχα.¹⁵

Τα endo-siRNAs είναι ελάχιστα μικρότερα σε μήκος από τα miRNAs (~21 nt) ενώ η διαδικασία σχηματισμού τους δεν είναι συντηρημένη και διαφέρει αρκετά από οργανισμό σε οργανισμό. Εμπλέκονται στην προστασία του γονιδιώματος καταστέλλοντας την έκφραση των τρανσποζονίων και στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Οι πρόδρομες μορφές των endo-siRNA είναι ζεύγη μεταγράφων sense–antisense ή RNA αναδιπλωμένο σε δομή φουρκέτας. Μία διαφορά τους με τα miRNAs είναι ότι η επεξεργασία των πρόδρομων endo-siRNAs δεν εξαρτάται από τα ένζυμα Drosha και DGCR8. Ωστόσο, η τομή από την DICER στο κυτταρόπλασμα και η πρόσδεσή τους στις πρωτεΐνες AGO για το σχηματισμό του συμπλόκου RISC είναι ένα κοινό τους γνώρισμα.¹⁴

Τα piRNAs, όπως υποδηλώνει και το όνομά τους, συνδέονται με τις πρωτεΐνες PIWI, μία υποομάδα της οικογένειας των πρωτεϊνών AGO που συναντάται στη γαμετική σειρά. Το μήκος τους είναι γύρω στα 24-32 νουκλεοτίδια και συνήθως φέρουν ουριδίνη στο 5' άκρο τους. Η βιογένεση τους έχει μελετηθεί κυρίως σε μύγες και ποντίκια. Χωρίζονται σε 2 κατηγορίες, σύμφωνα με την έκφρασή τους στα διάφορα στάδια της σπερματογένεσης: τα piRNAs στο στάδιο της προ-παχυταινίας (που συναντώνται στα προσπερματογόνια) και τα piRNAs στο στάδιο της παχυταινίας (που συναντώνται στα σπερματοκύτταρα). Σε αντίθεση με τα miRNAs, ο σχηματισμός τους δεν εξαρτάται από τα ένζυμα DICER και Drosha. Τα μονόκλιωνα πρόδρομα μόρια παράγονται από την RNA πολυμεράση II από επαναλαμβανόμενα στοιχεία (piRNA clusters) που έπειτα εξέρχονται στο κυτταρόπλασμα. Πολλαπλές έρευνες αναφέρουν πως τα piRNAs συνδεόμενα με τις πρωτεΐνες PIWI, σχηματίζουν ένα σύμπλοκο αντίστοιχο του RISC, το piRNA-induced silencing complex (piRISC) με σκοπό την

αποικοδόμηση mRNA στόχων. Κύριος ρόλος τους είναι η σίγαση μεταθετών στοιχείων στους γαμέτες.¹⁴



Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση της έκφρασης και της λειτουργίας των miRNAs και των piRNAs προ-παχυταινίας και παχυταινίας, κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης στον ποντικό. (Gou LT, Dai P, Liu MF. Small noncoding RNAs and male infertility. Wiley Interdiscip Rev RNA. 2014 Nov-Dec;5(6):733-45)

3.3. ncRNAs και λειτουργίες στη σπερματογένεση

endo-siRNAs

Τα endo-siRNAs είναι χαρακτηριστικά της διαδικασίας της παρεμβολής RNA. Ανακαλύφθηκαν αρχικά στο μύκητα και έπειτα στα φυτά, τους σκώληκες και τις μύγες. Εκτός από τη συμβολή τους στην μετα-μεταγραφική σίγαση γονιδίων στο κυτταρόπλασμα, τα endo-siRNAs έχει βρεθεί ότι λειτουργούν και στον πυρήνα ως μόρια-οδηγοί για τις συνδεδεμένες σε αυτά πρωτεΐνες, για να τις καθοδηγήσουν σε καθορισμένες γενωμικές περιοχές και να επάγουν την μεθυλίωση του DNA και την διαμόρφωση της χρωματίνης. Στα θηλαστικά, τα endo-siRNAs πρωτοανακαλύφθηκαν στα ωκύτταρα ποντικού και τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα. Σύμφωνα με τους Song et al., υπάρχουν και στα σπερματογόνια ποντικών αλλά η ακριβής λειτουργία τους παραμένει άγνωστη.³²

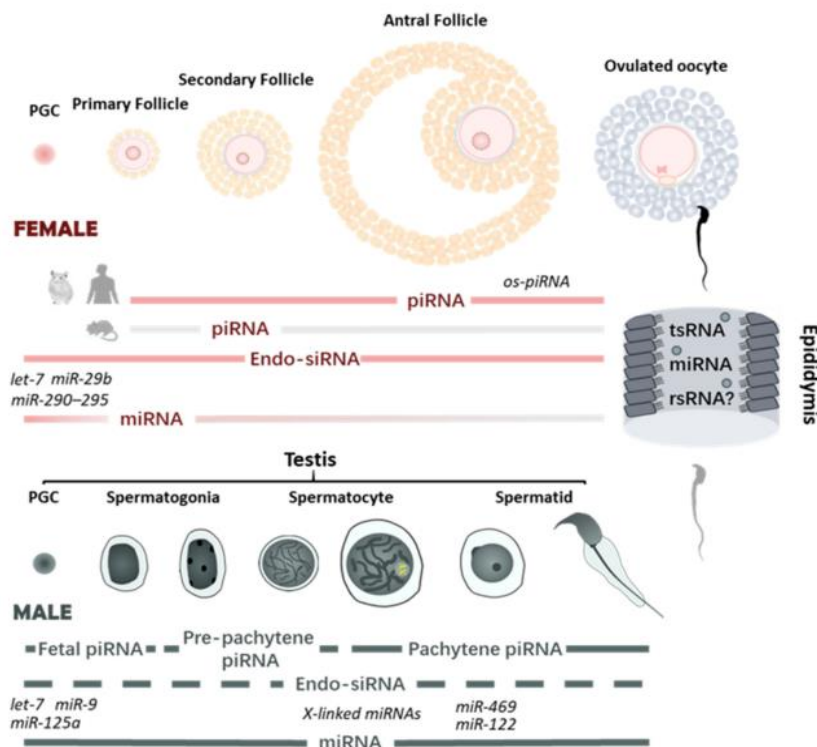
Η απουσία παραγόντων απαραίτητων για τη βιογένεση των miRNAs και των siRNAs, όπως τα ένζυμα Dicer και Drosha, παρεμποδίζει την ανάπτυξη των αρσενικών γαμετών. Πιο συγκεκριμένα, η απώλεια της Dicer στα κύτταρα Sertoli επηρεάζει σημαντικά τη λειτουργικότητά τους και σταδιακά οδηγεί σε εκφυλισμό των όρχεων, ανδρική υπογονιμότητα και πλήρη απουσία σπερματοζωαρίων. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η επιλεκτική απενεργοποίηση των ενζύμων Drosha ή Dicer στα σπερματογόνια έχει ως αποτέλεσμα την εξαφάνιση των σπερματοκυττάρων και των σπερματίδων από τους όρχεις, γεγονός που ευθύνεται για τις περιπτώσεις ολιγοτεροτοζωοσπερμίας ή αζωοσπερμίας.³²

piRNAs

Ο κύριος σκοπός των διαδικασιών στις οποίες συμμετέχει το piRNA είναι να αποτρέπουν την αποσταθεροποίηση του DNA από μεταθετά γενετικά στοιχεία (τρανσποζόνια και ρετροτρανσποζόνια) και να προστατεύουν την ακεραιότητα του γονιδιώματος στα γεννητικά κύτταρα, μιας και το ίδιο το piRNA δρα σαν ένα έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα. Γενετικές μελέτες στα ποντίκια, τη *Drosophila*, το zebrafish, και τον *C. elegans* αποδεικνύουν το παραπάνω συμπέρασμα. Σε περίπτωση ύπαρξης μεταλλάξεων που αφορούν το μονοπάτι του piRNA στα γεννητικά κύτταρα, τα τρανσποζόνια και ρετροτρανσποζόνια που αναφέρθηκαν παραπάνω παραμένουν ενεργά και αποσταθεροποιούν το DNA.³²

Κατά την σπερματογένεση στον όρχι ποντικού, το piRNA είναι αυτό που επικρατεί σε σχέση με τα υπόλοιπα μη κωδικοποιητικά RNA. Αξίζει να σημειωθεί ότι πολλές μελέτες αναφέρουν πως η μη φυσιολογική έκφραση των πρωτεϊνών Piwi οδηγεί σε ανδρική στειρότητα, αποδεικνύοντας έτσι τον καθοριστικό τους ρόλο στην σπερματογένεση. Ωστόσο, εκτός από την αποσιώπηση μεταθετών στοιχείων, το Piwi/piRNA μονοπάτι ενδέχεται να έχει και ρυθμιστικό ρόλο, όπως φαίνεται σε γονίδια στη *Drosophila*. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη traffic jam (tj-encoding protein) ελέγχει το σχηματισμό των γονάδων και σύμφωνα με τους Saito et al. τα tj-derived

piRNAs με τη σύνδεση τους στις PIWI πρωτεΐνες μπορούν να αποσιωπήσουν συγκεκριμένα γονίδια στόχους όπως το FasIII. Επιπλέον, δύο piRNAs προερχόμενα από τη *Drosophila*, τα 100 και 412 σε συνδυασμό με τις PIWI και άλλους παράγοντες αποσυναρμολογούν το μητρικό mRNA στα πρώιμα έμβρυα μέσω ατελούς ζευγαρώματος βάσεων. Έτσι, εξάγεται το συμπέρασμα ότι για να πάρει το εμβρυικό γενετικό υλικό την τελική του μορφή, τα piRNAs μεσολαβούν για την αποδόμηση των εναπομενόντων στοιχείων του μητρικού γονιδιώματος. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι στα όψιμα στάδια της σπερμιόγνεσης, τα piRNAs πυροδοτούν την αποδόμηση της πρωτεΐνης MIWI μέσω ουβικιτινίωσης από την υπομονάδα E3 του Anaphase Promoting Complex/Cyclosome (APC/C). Ωστόσο, αυτή η αποδόμηση μεσολαβούμενη από το piRNA οδηγεί και στον περιορισμό του ίδιου του piRNA, προτείνοντας έτσι έναν ρυθμιστικό μηχανισμό feedback για το σύστημα MIWI/piRNA αφού ολοκληρώσει το ρόλο του στη σπερματογένεση.³²



Εικόνα 18. Προφίλ έκφρασης μη κωδικοποιητικών RNAs κατά τη γαμετογένεση. Στα αρσενικά, τα piRNAs και miRNAs είναι βασικά για τη σπερματογένεση και τη σπερμιόγνεση. Τα σπερματοζώαρια εμπλουτίζονται περαιτέρω με μη κωδικοποιητικά RNAs κατά τη διέλευσή τους από την επιδιδυμίδα.

Στα θηλυκά, μόνο τα endo-siRNAs και πιθανώς κάποια από τα miRNAs παίζουν ρόλο στη διαδικασία της ωογένεσης. Όπως έχει φανεί σε knockout μοντέλα ποντικών που μελετήθηκαν παράγοντες-κλειδιά στην επεξεργασία του priRNA και miRNA, η γυναικεία γονιμότητα δεν επηρεάζεται από αυτά, καθώς οι δραστηριότητες τους καταστέλλονται κατά την ωογένεση. (Zhu, Q.; Kirby, J.A.; Chu, C.; Gou, L.-T. Small Noncoding RNAs in Reproduction and Infertility. *Biomedicines* 2021, 9, 1884)

3.4. ncRNAs και λειτουργίες στην ωογένεση

Παρόλο που τα miRNAs είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων και στα αρσενικά και στα θηλυκά, οι λειτουργίες τους στα αναπτυσσόμενα ωοκύτταρα είναι κατεσταλμένες. Η έλλειψη της DICER1 ή του AGO2 οδηγεί σε βλάβες της μειωτικής ατράκτου. Ωστόσο, θηλυκά ποντίκια που φέρουν μεταλλαγή στον παράγοντα Dgcr8, εμφανίζουν βλάβες στο μονοπάτι του miRNA αλλά διατηρούν πλήρως λειτουργικό το endo-siRNA μονοπάτι, δεν έχουν καμία επιπλοκή στη μείωση και είναι γόνιμα. Από την άλλη πλευρά, η μείωση των endo-siRNAs σε ωοκύτταρα, αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών που ρυθμίζονται από αυτά αλλά και τα επίπεδα των τρικοζονίων. Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα πως τα endo-siRNAs, παρά τα miRNAs, έχουν πιο κρίσιμο ρόλο στην ωογένεση. Ένας μεγάλος αριθμός endo-siRNAs εντοπίζονται και στα σπερματογονικά κύτταρα σύμφωνα με πειράματα σε ποντίκια. Συγκρίνοντας φαινότυπους αρσενικών ποντικών DICER1- ή DGCR8-, οι Zimmermann et al. υποστήριξαν ότι τα endo-siRNAs έχουν επίδραση στη σπερματογένεση. Ωστόσο από μόνα τους δεν επαρκούν για μια φυσιολογική μείωση, καθώς τα ποντίκια με βλάβες στο miRNA μονοπάτι και άθικτα endo-siRNAs είναι υπογόνιμα. ¹⁴

MiRNA	Function
miR-202	Oogenesis and fecundity in fish
let-7	Ovarian arrest and blocked oocyte maturation in adult insects
miR-278	Oogenesis in drosophila
miR-318	Porcine oocyte maturation
miR-224	Porcine oocyte maturation and mouse in vivo follicular development and oocyte in vitro maturation
miR-378	Oocyte maturation in pig
miR-274	Bovine oocyte maturation
miR-375	Mouse oocyte germinal vesicle breakdown
miR-125a-3p	Inhibits bovine granulosa cell autophagy
miR-21-3p	Cell proliferation in bovine granulosa in mice
miR-383	Promote bovine granulosa cells proliferation and cell cycle transition
miR-183-96-182 cluster	Bovine granulosa and cumulus cell proliferation and oocyte maturation
mir-130b	Bovine granulosa cell proliferation and differentiation
mir-17-92 cluster	Bovine granulosa cell proliferation and cell cycle progression
miR-424/503	Proliferation and apoptosis in bovine cumulus cells
miR-375	Regulate steroid hormone synthesis and inhibit bovine granulosa cells apoptosis by targeting follicle stimulating hormone receptor (<i>FSHR</i>) gene
miR-31	Regulates granulosa cells apoptosis in the yak ovary
miR-143	Prevented apoptosis via the <i>PI3K/Akt</i> signaling in bovine cumulus cells
miR-125b	Regulates and progesterone production and luteal development in human luteinized granulosa cells
miR-21	Regulates human granulosa cells proliferation by targeting serum/glucocorticoid regulated kinase family member 3 (<i>SGK3</i>) expression
miR-96	Regulation of granulosa cell proliferation and apoptosis in woman affected by polycystic ovary syndrome PCOS
miR-335-5p	Promotes follicle-stimulating hormone (FSH)-induced estradiol production and granulosa cell proliferation in humans
MiR-99a	Regulate oxidative stress-induced Forkhead box protein O1 (<i>FOXO1</i>) acetylation and granulosa cell apoptosis in mice
miR-143	
miR-181a	

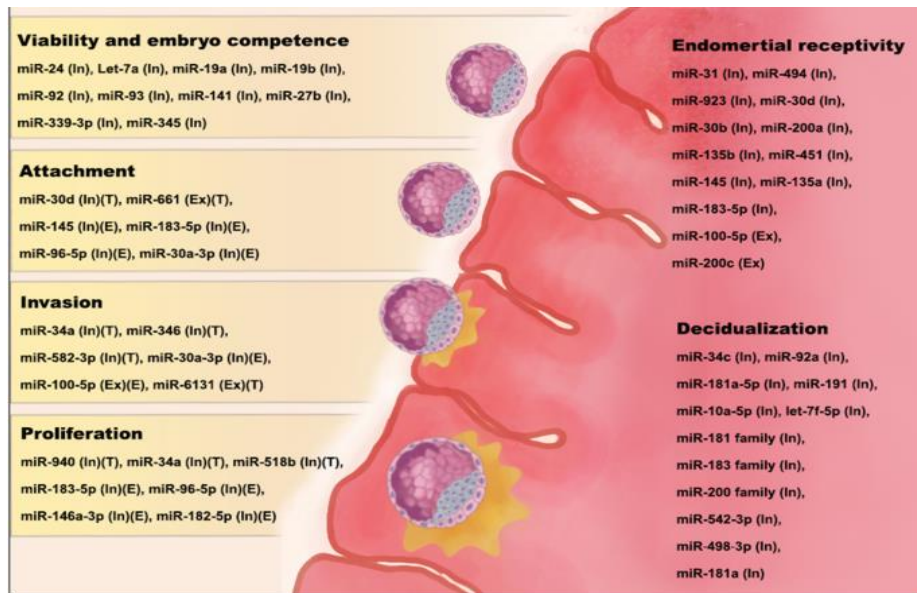
Εικόνα 19. miRNAs που σχετίζονται με την ανάπτυξη των κοκκωδών κυττάρων, του ωοφόρου δίσκου και των ωοκυττάρων (Salilew-Wondim D, Gebremedhn S, Hoelker M, Tholen E, Hailay T, Tesfaye D. The Role of MicroRNAs in Mammalian Fertility: From Gametogenesis to Embryo Implantation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(2):585. Published 2020 Jan 16.)

Σε αντίθεση με τα δεδομένα για τη *Drosophila* και το *Zebrafish*, όπου δείχνουν ότι το μονοπάτι του piRNA είναι καίριας σημασίας για την σπερματογένεση αλλά και την ωογένεση, στα θηλαστικά και συγκεκριμένα στα ποντίκια, η γονιμότητα των θηλυκών ατόμων δεν επηρεάζεται από μεταλλάξεις σε βασικούς συντελεστές του piRNA. Επιπλέον, μια άλλη πρωτεΐνη PIWI, η PIWIL4 (MIWI2 στον ποντικό και HIWI2 στον άνθρωπο), η οποία είναι σημαντική για την σπερματογένεση, εκφράζεται σε αμελητέες ποσότητες στα ωοκύτταρα των θηλαστικών. Τα παραπάνω δεδομένα

αποδεικνύουν ότι τα piRNAs δεν συμμετέχουν σε τόσο μεγάλο βαθμό στη ωογένεση όσο στη σπερματογένεση.

3.5. Ρόλος στην εμφύτευση

Τα miRNAs εμπλέκονται σε βασικές αναπτυξιακές διαδικασίες όπως στο διαχωρισμό των εμβρυικών κυττάρων, στο σχηματισμό του εμβρύου και των εξαρτημάτων του αλλά και στην εμφύτευση. Η απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs, λοιπόν, μπορεί να επηρεάσει όλους τους παραπάνω μηχανισμούς. Έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-106a στην εσωτερική μάζα κυττάρων (inner cell mass) και περιορισμένα επίπεδα έκφρασης του miR-93 στο τροφοεκτόδερμα και το πρώιμο ενδόδερμα, γεγονός που υποδηλώνει την πιθανή εμπλοκή του στην διαφοροποίηση του εμβρυικού ιστού. Επιπλέον, διαφορά στην έκφραση 526 miRNAs, συμπεριλαμβανομένων των let-7b, miR-23a, miR-27a, miR-291a, miR-425, miR-429, παρατηρείται μεταξύ τελικού σχηματισμένου εμβρύου και σταδίου βλαστοκύστης. Το ίδιο συμβαίνει και σε ορισμένα miRNAs μεταξύ εμβρύων στο στάδιο των 8 κυττάρων και εμβρύων στο στάδιο τροφοβλάστης. Έτσι, επιβεβαιώνεται η άποψη ότι τα miRNAs προσαρμόζουν την έκφρασή τους για να ενεργοποιήσουν επιλεκτικά γονίδια απαραίτητα για την εμφύτευση.²⁹



Εικόνα 21. Τα miRNAs κατά την εμφύτευση (Azizi, E., Mofarahe, Z.S. & Naji, M. MicroRNAs, small regulatory elements with significant effects on human implantation: a review. *J Assist Reprod Genet* **40**, 697–717 (2023))

Ωστόσο, υπάρχει περίπτωση και να παρεμποδίζουν την εμφύτευση με τη δράση τους. Υπό αυτό το πρίσμα, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει αλλοιωμένη έκφραση διαφόρων miRNAs όπως τα let-7a, -7d, -7e, -7f and -7g στις αδρανείς βλαστοκύστες σε σχέση με τις ενεργές. Μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε κυοφορούντα ποντίκια στην 5^η ημέρα της κυήσεως, με τη χρήση Exiqon miRCURY LNA Arrays, ταυτοποίησε αυξημένη έκφραση 13 miRNAs συμπεριλαμβανομένων των let-7a, let-7c, let-7d και let-7b και μειωμένη έκφραση των miR-290-5p και miR-292-5p στο σημείο της εμφύτευσης σε σύγκριση με τα σημεία γύρω από αυτό. Παρομοίως, μία άλλη μελέτη εντόπισε 72 miRNAs (miR-96, miR-30b, miR-290-3p and miR-762) με διαφορετική έκφραση μεταξύ σημείου εμφύτευσης και γύρω σημείων.²⁹

4. Σκοπός

Στην παρούσα βιβλιογραφική μελέτη, συγκεντρώθηκαν πληροφορίες για τα μη κωδικοποιητικά μόρια RNA, με κυριότερα τα miRNAs με σκοπό να δοθεί πιθανή εξήγηση για το πώς αυτά σχετίζονται με την αναπαραγωγή αλλά και την υπογονιμότητα.

5. Μέθοδοι

Πραγματοποιήθηκε ανασκόπηση, στην ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία, για τα miRNAs που εμπλέκονται στην αναπαραγωγική διαδικασία, με έμφαση στη μελέτη της μεταβολής του προφίλ έκφρασης τους σε περιπτώσεις υπογονιμότητας. Τα άρθρα που χρησιμοποιήθηκαν επιλέχθηκαν με βάση κάποιες λέξεις κλειδιά όπως miRNAs, miRNAs και ανδρική/γυναικεία υπογονιμότητα, miRNAs και σπερματογένεση/ωογένεση, ωκύτταρα, σπερματοκύτταρα κ.α. και κύριες πηγές αναζήτησης ήταν τα PubMed, NCBI και Google Scholar. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης και άρθρα σχετικά με το ρόλο των miRNAs ως διαγνωστικοί και θεραπευτικοί δείκτες στην ανθρώπινη υπογονιμότητα.

6. Μη κωδικοποιητικά μόρια RNA και υπογονιμότητα

Τα μη κωδικοποιητικά RNAs συμβάλλουν το καθένα με διαφορετικό τρόπο σε μία πληθώρα διαδικασιών ανάλογα με το φύλο και το είδος του οργανισμού. Τα piRNAs, τα miRNAs και, σε μια μικρότερη κλίμακα, τα endo-siRNAs συμβάλλουν στη σπερματογένεση και μόνο τα endo-siRNAs και κάποια συγκεκριμένα miRNAs είναι απαραίτητα για την ωογένεση όπως έχει αποδειχθεί στα ποντίκια.

6.1. Ανδρική υπογονιμότητα

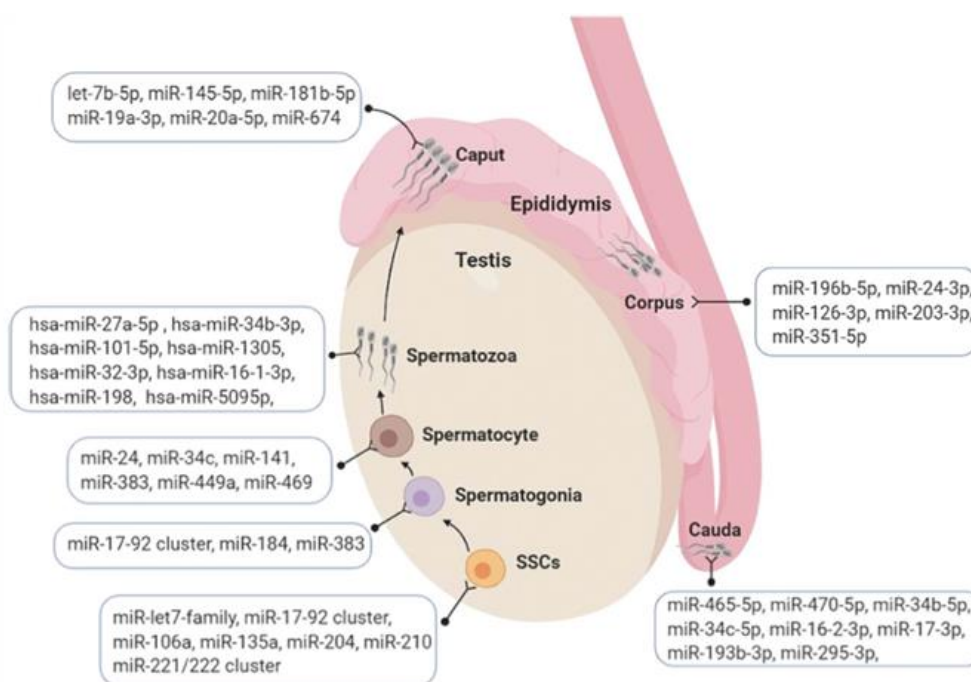
miRNAs

Η σπερματογένεση, όπως αναφέρθηκε, είναι η διαδικασία διαφοροποίησης των γεννητικών κυττάρων στους ώριμους αρσενικούς γαμέτες, δηλαδή τα σπερματοζωάρια. Λαμβάνει χώρα στα σπερματικά σωληνάκια και περιλαμβάνει τον πολλαπλασιασμό των σπερματογονίων, τη διαφοροποίησή τους σε σπερματοκύτταρα και τελικά τη δημιουργία των σπερματίδων μέσω μειωτικής διαίρεσης. Οι τελευταίες υπόκεινται σε ωρίμανση και προκύπτουν τα σπερματοζωάρια. Οποιαδήποτε διαταραχή της πορείας της σπερματογένεσης μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την ανδρική γονιμότητα.²⁸

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι τα miRNAs παίζουν καθοριστικό ρόλο στην σπερματογένεση. Παρόλο, ωστόσο, που η ύπαρξή τους είναι γνωστή εδώ και χρόνια, ο ρόλος τους στη σπερματογένεση και γενικά στην αναπαραγωγή άρχισε να ερευνάται αρκετά πρόσφατα. Καθορίζοντας τα μοτίβα έκφρασής τους στους όρχεις, θα δοθεί η δυνατότητα ανάπτυξης νέων διαγνωστικών ή θεραπευτικών εργαλείων που θα συμβάλλουν στη διάγνωση και αντιμετώπιση της υπογονιμότητας.²⁸

Εκτός από την παρουσία τους σε όλους σχεδόν τους ιστούς και τα σωματικά υγρά, ένας μεγάλος αριθμός microRNAs έχουν απομονωθεί και από δείγματα

σπέρματος, όπου τα τροποποιημένα επίπεδα έκφρασής τους συνδέονται ενίοτε με μειωμένο αριθμό σπερματοζωαρίων, χαμηλή κινητικότητα και ασυνήθιστη μορφολογία. Τα μόρια που μέχρι πρότινος θεωρούνταν “junk” RNA, έχουν πλέον αποδειχθεί χρήσιμα στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο.²⁸



Εικόνα 16. Σχηματική αναπαράσταση της έκφρασης miRNAs που εμπλέκονται στη σπερματογένεση και την ωρίμανση των σπερματοζωαρίων στην επιδιδυμίδα (Vashisht A, Gahlay GK. Using miRNAs as diagnostic biomarkers for male infertility: opportunities and challenges. Mol Hum Reprod. 2020 Apr 24;26(4):199-214)

Καθοριστικό ρόλο στη σπερματογένεση έχουν και τα κύτταρα Sertoli. Εκκρίνουν μια πληθώρα παραγόντων όπως τις πρωτεΐνες πρόσδεσης ανδρογόνων, τις τρανσφερρίνες, αυξητικούς παράγοντες και ιντερλευκίνες που εξασφαλίζουν ένα ευνοϊκό μικροπεριβάλλον για την ωρίμανση των γαμετών. Επιπλέον, μέσω της έκκρισης της ινχιπίνης-B, τα κύτταρα Sertoli ελέγχουν τη σύνθεση της FSH μέσω αρνητικής ρύθμισης. Έχει βρεθεί ότι τα miRNAs λειτουργούν συχνά ως ρυθμιστές της λειτουργίας των κυττάρων Sertoli. Για παράδειγμα, το miR-1285 και το miR-762

προάγουν το σχηματισμό των παραπάνω, μέσω ρύθμισης της έκφρασης της πρωτεΐνης RNF4. Παρομοίως, το miR-638 μεσολαβεί στη σπερματογένεση, σε μοντέλα χοίρων, ρυθμίζοντας την πρωτεΐνη SPAG1, υπεύθυνη για την ωρίμανση των κυττάρων Sertoli και την απόπτωσή τους. Έρευνες έχουν επίσης επιβεβαιώσει τη λειτουργία τους ως μακροφάγα με σκοπό την απομάκρυνση εκφυλισμένων γεννητικών κυττάρων. Εξίσου σημαντικά είναι και τα κύτταρα Leydig που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση τεστοστερόνης και οιστρογόνων, ενώ η λειτουργία αυτών ρυθμίζεται από την LH.²⁸

Σύμφωνα με μελέτες που διεξήχθησαν σε ποντίκια, το miR-146 παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε αδιαφοροποίητα σπερματογόνια. Το γεγονός αυτό συνδέεται με το μονοπάτι ρύθμισης του ρετινοϊκού οξέος καθώς παρατηρήθηκε ότι το miR-146 προσδένεται σε ένα μόριο-ρυθμιστή των υποδοχέων των ρετινοειδών, το mediator complex subunit 1 (Med1), και το αναστέλλει. Τα υψηλά επίπεδα ρετινοϊκού οξέος παρεμποδίζουν την έκφραση του συγκεκριμένου miRNA, κρατώντας το σε χαμηλά επίπεδα, και δίνουν το έναυσμα για την έναρξη της διαφοροποίησης.²⁸

Όσον αφορά στο ρόλο του miR-34b/c στη σπερματογένεση, οι απόψεις δίστανται. Φαίνεται ότι παρόλο που δεν παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανδρική γονιμότητα, η απουσία του οδηγεί σε μη φυσιολογική σπερματογένεση και συνεπώς υπογονιμότητα λόγω διαταραχών στην συμπύκνωση της χρωματίνης. Επιπλέον, το miR-34c επάγει την απόπτωση των γεννητικών κυττάρων στοχεύοντας το γονίδιο που κωδικοποιεί τον παράγοντα ATF1 (activating transcription factor 1). Υψηλά επίπεδα αυτού του miRNA έχουν βρεθεί σε σπερματοκύτταρα και κυκλικές σπερματίδες, ενώ η παρεμπόδιση του οδηγεί σε μείωση του ρυθμού απόπτωσης.²⁸

Έρευνες έχουν δείξει πως τα επίπεδα των miR-141, miR-200a, miR-200c και miR-323 μειώνονται όσο εξελίσσεται η ανάπτυξη των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων ενώ η οικογένεια των let-7 miRNAs σημειώνει αύξηση, γεγονός που αποδεικνύει την εμπλοκή των συγκεκριμένων miRNAs στην σπερματογένεση. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι ένα γκρουπ από miRNAs και συγκεκριμένα τα miR-21, miR-

34c, miR-182, miR-183 και miR-146a, απαιτούνται για τη διατήρηση και επιβίωση των αδιαφοροποίητων σπερματογονίων. Το miR-221/222 παίζει εξίσου σημαντικό ρόλο στη διατήρηση των αδιαφοροποίητων σπερματογονίων καθώς φαίνεται να ασκεί αρνητική ρύθμιση στο μεταγραφικό παράγοντα Kit, ο οποίος είναι άμεσα συνδεδεμένος με τη διαφοροποίηση των σπερματογονίων.³²

Αναλύοντας περαιτέρω την διαφοροποίηση των σπερματογονίων, αξίζει να σημειωθεί ότι δύο miRNA, τα miR-17-92 και miR-106b-25, σημειώνουν μια ρύθμιση προς τα κάτω κατά την διαφοροποίηση των σπερματογονίων που προκαλείται από το ρετινοϊκό οξύ (retinoic acid induced spermatogonial differentiation). Ως αποτέλεσμα, οι παράγοντες-στόχοι τους Bim, Kit, Socs3, και Stat3 σημειώνουν μια προς τα πάνω ρύθμιση, όπως έχει βρεθεί στη διαφοροποίηση σπερματογονίων σε ποντίκια.³²

Το miR-17-92 έχει αποδειχθεί ότι προστατεύει τα μειωτικά κύτταρα από την απόπτωση καταστέλλοντας τον μεταγραφικό παράγοντα E2F1. Επιπλέον, το miR-18 εμφανίζει υψηλά επίπεδα έκφρασης στα σπερματοκύτταρα και παίζει ρόλο στη σπερματογένεση καθώς ρυθμίζει τον μεταγραφικό παράγοντα heat shock factor 2 (HSF2), ο οποίος ελέγχει μεγάλο αριθμό γονιδίων απαραίτητων για την ανάπτυξη αρσενικών γεννητικών κυττάρων όπως έχει δειχθεί στους όρχεις ποντικών. Επιπρόσθετα, σε έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια, το miR-34c παίζει σημαντικό ρόλο στην πρώτη κυτταρική διαίρεση του ζυγωτού μέσω τροποποίησης της έκφρασης του Bcl-2.³²

Εν κατακλείδι, τα προαναφερθέντα ευρήματα υποδηλώνουν την καθοριστικής σημασίας ρύθμιση από τα miRNAs σε κάθε βήμα της σπερματογένεσης, από τη μιτωτική και τη μειωτική φάση μέχρι και την τελική απελευθέρωση των σπερματοζωαρίων στα σπερματικά σωληνάκια.

microRNA	Location	Action	Type of Sample	Study Population
miR-34c	SSCs, spermatocytes and round spermatids	<ul style="list-style-type: none"> Induce apoptosis Up-regulation of GC-specific genes Paternal microRNAs 	Epididymal sperm [36], primary spermatocytes [37], adult mouse testis [38]	Mice
miR-449		<ul style="list-style-type: none"> Induce apoptosis Up-regulation of GC-specific genes Paternal microRNAs 	Epididymal sperm [36], primary spermatocytes [37], adult mouse testis [38]	
miR-21	SSCs	<ul style="list-style-type: none"> When down-regulated—increased apoptosis and decreased potency of SSCs Seems to be involved in SSCs self-renewal 	Germ-cell cultures	Mice
miR-146a	SSCs	<ul style="list-style-type: none"> Regulates the differentiation process by binding to Med1; overexpression seems to block the retinoic acid-induced differentiation of SSCs 	Germ-cell cultures	Mice
miR-20	SSCs	<ul style="list-style-type: none"> Promotor of SSCs self-renewal, by targeting STAT3 and Ccnd1 	Germ-cell cultures	Mice
miR-106a	SSCs	<ul style="list-style-type: none"> Promotor of SSCs self-renewal, by targeting STAT3 and Ccnd1 	Germ-cell cultures	Mice
miR-202-3p	SSCs	<ul style="list-style-type: none"> Up-regulated in mice SSCs Up-regulated by GDNF and downregulated by RA Its absence leads to premature differentiation, decreased activity of stem cells, mitosis and apoptosis Testis-specific 	Germ-cell cultures	Mice

Εικόνα 17. Κάποια από τα πιο μελετημένα miRNAs που εμπλέκονται στη σπερματογένεση. (Salilew-Wondim D, Gebremedhn S, Hoelker M, Tholen E, Hailay T, Tesfaye D. The Role of MicroRNAs in Mammalian Fertility: From Gametogenesis to Embryo Implantation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(2):585)

Μια πληθώρα ερευνών έχουν δείξει πως η παρεκκλίνουσα από τα φυσιολογικά miRNA ρύθμιση συνδέεται στενά με την υπογονιμότητα. Για παράδειγμα, η σύγκριση του ορχικού miRNA μεταξύ υπογόνιμων και φυσιολογικών ανδρών έδειξε διαφορετική έκφραση, υποδηλώνοντας έτσι τη συσχέτισή τους με την υπογονιμότητα. Πιο συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί ορισμένοι μονο-νουκλεοτιδικοί

πολυμορφισμοί (SNPs) στις θέσεις πρόσδεσης των miRNA στα υποψήφια γονίδια που ευθύνονται για την υπογονιμότητα, γεγονός που μπορεί να επηρεάζει την έκφραση αυτών των γονιδίων. Επιπροσθέτως, μια πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι οι πολυμορφισμοί SNP στα ένζυμα Dicer και Drosha μπορούν να συσχετιστούν με την ποιότητα του σπέρματος και να δώσουν μια εξήγηση στην ανδρική υπογονιμότητα. Ακόμη, δεδομένου ότι τα εξωκυτταρικά miRNAs είναι παρόντα σε διάφορα βιολογικά υγρά, το προφίλ miRNA στο πλάσμα του σπέρματος ανδρών με μορφολογικά μη φυσιολογικό/χαμηλής κινητικότητας σπέρμα ή με μη αποφρακτική αζωοσπερμία φέρει αισθητές διαφορές σε σχέση με το πλάσμα υγιών ανδρών.³²

Είναι γνωστό πως τα miRNAs στοχεύουν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για τη γαμετογένεση. Ένα miRNA μπορεί να στοχεύει πολλαπλά mRNAs, και αντίστροφα, ένα μοναδικό mRNA μπορεί να είναι στόχος πολλών miRNAs. Η πολύπλοκη αυτή σχέση μεταξύ miRNA–mRNA εξαρτάται από το στάδιο του κυτταρικού κύκλου και από τον κυτταρικό τύπο. Για παράδειγμα, κατά την διαφοροποίηση των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων σε σπερματογόνια, συγκεκριμένα miRNAs στοχεύουν και ρυθμίζουν την έκφραση του Pten που είναι καταστολέας του πολλαπλασιασμού και της ανάπτυξης.¹⁴

Σύμφωνα με μια έρευνα των Gu et al, όπου αναλύθηκαν πολυμορφισμοί στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες piwi από 490 άνδρες με ιδιοπαθή αζωοσπερμία/ ολιγοζωοσπερμία και 468 γόνιμους άνδρες μάρτυρες, βρέθηκε ότι οι διάφοροι πολυμορφισμοί μπορεί να σχετίζονται με αδυναμία σπερματογένεσης ή με αυξημένο κίνδυνο ολιγοζωοσπερμίας στον κινέζικο πληθυσμό. Επιπλέον, οι διαφορές στη μεθυλίωση του DNA στις πρωτεΐνες PIWIL1 και PIWIL2 είναι πιθανόν να προκαλέσουν διαταραχές στη σπερματογένεση και υπογονιμότητα. Τα ευρήματα αυτά αποδεικνύουν ότι οι μεταβολές στα μονοπάτια του piRNA είναι εξίσου σημαντικές και εμπλέκονται εξίσου στην ανδρική υπογονιμότητα.³²

Ο μεταγραφικός παράγοντας A-MYB (γνωστός και ως MYBL1) φαίνεται να πυροδοτεί την μεταγραφή των τμημάτων piRNA παχυταινίας. Ο παράγοντας

επιμήκυνσης της μεταγραφής BTBD18 επίσης απαιτείται για την δημιουργία περίπου πενήντα από αυτά τα τμήματα. Οποιαδήποτε μετάλλαξη σε αυτούς τους δύο παράγοντες επηρεάζει την ανδρική γονιμότητα. Πρόσφατα, ερευνητές δημιούργησαν ποντίκια όπου έφεραν μια διακοπή στην περιοχή του ενισχυτή κάποιων τμημάτων piRNA παχυταινίας προκειμένου να μελετηθούν οι ρόλοι των piRNAs στη σπερμιόγνεση. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η έλλειψη του ενισχυτή για ένα συντηρημένο piRNA στο χρωμόσωμα 6, προκαλεί ελαττωματικό ακρόσωμα στα σπερματοζωάρια των ποντικών που εκδηλώνεται ως αδυναμία capacitation του σπέρματος και γονιμοποίησης του ωαρίου. Παρομοίως, αρσενικά ποντίκια που δεν διαθέτουν ένα τμήμα piRNA προερχόμενο από το χρωμόσωμα 18 είναι στείρα λόγω υπερανάπτυξης του ακροσώματος που πιθανόν να οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση του παράγοντα GOLGA2. Επίσης, αυτού του είδους τα ποντίκια γεννούν έμβρυα με χαμηλό ποσοστό επιβίωσης in utero.¹⁴

Από τα πιο καλά μελετημένα microRNAs, σχετιζόμενα με την ανδρική υπογονιμότητα, είναι το miR-34. Σε πρόσφατα δημοσιευμένη έρευνα, έγινε σύγκριση 106 δειγμάτων σπέρματος, εκ των οποίων 40 ήταν φυσιολογικά, 47 λήφθηκαν από ασθενείς με ασθενοζωοσπερμία και 19 από ασθενείς με ολιγοζωοσπερμία. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα miR-34b-5p, miR-34c-3p και miR-34b-3p εκφράζονταν σε σημαντικά μικρότερο ποσοστό στα δείγματα σπέρματος ασθενών με ολιγοζωοσπερμία σε σχέση με αυτά των φυσιολογικών. Επιπλέον, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα μειωμένα επίπεδα του miR-34b και του miR-34c συνδέονται με μειωμένη ανδρική γονιμότητα, μη αποφρακτική αζωοσπερμία, ελαττωματική μείωση και ωρίμανση σπερματοζωαρίων.²⁸

Περαιτέρω ευρήματα εξηγούν ότι η απορρύθμιση του miR-449 επίσης συνδέεται με την ανδρική υπογονιμότητα, λόγω διαταραχής στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Κατά τη σύγκριση σπέρματος γόνιμων και υπογόνιμων ανδρών της ίδιας ηλικίας, σε μία μελέτη με 457 ασθενείς, βρέθηκε ότι 7 microRNAs είχαν χαμηλή έκφραση σε δείγματα ασθενών με αζωοσπερμία και υψηλή έκφραση σε ασθενείς με ασθενοζωοσπερμία. Τα miRNAs αυτά είναι το miR-34c-5p, που

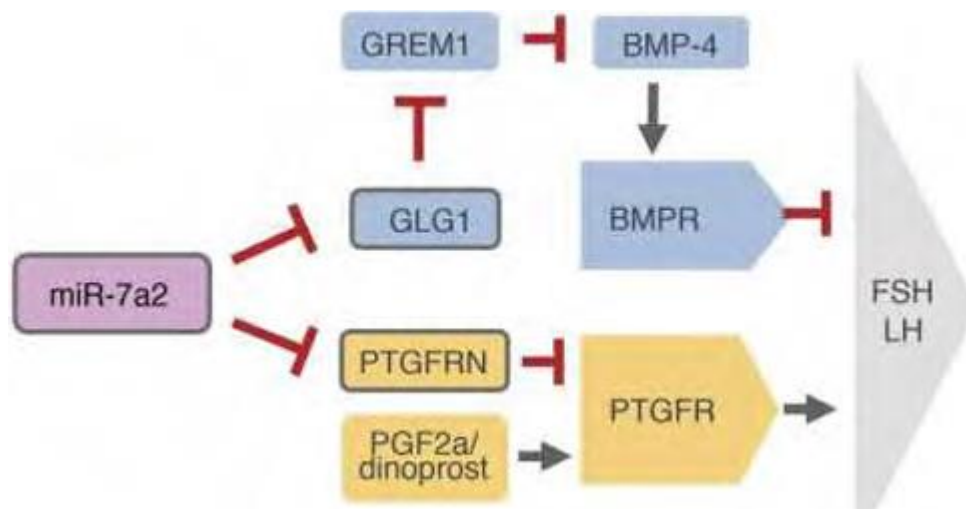
αναφέρθηκε και παραπάνω, και τα miR-122, miR-146b-5p, miR-181a, miR-374b, miR-509-5p και miR-513a-5p. Σε μια άλλη μελέτη με 192 ασθενείς με ιδιοπαθή υπογονιμότητα, τα miR-19b και let-7a ήταν εμφανώς αυξημένα στο πλάσμα του σπέρματος ανδρών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία, σε σχέση με τα δείγματα - μάρτυρες από γόνιμους άνδρες.²⁸

Σε μια μελέτη του Barad και των συνεργατών του το 2004, χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες ταυτοποιήθηκαν διάφορα miRNA σε 5 διαφορετικούς ιστούς όπως το συκώτι, τον εγκέφαλο, το θύμο, τον πλακούντα και τον όρχι. Βρέθηκε ότι στον όρχι εκφράζονται σε μεγάλο ποσοστό 5 διαφορετικά miRNAs (let-7a, miR-10b, miR-134, miR-187 and miR-212). Λίγα χρόνια αργότερα, μία άλλη μελέτη μικροσυστοιχιών σε βιοψίες από όρχι τριών ασθενών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία και δύο ασθενών με καρκίνο του προστάτη, έδειξε πως η έκφραση 154 miRNA είναι χαμηλή και η έκφραση 19 miRNAs είναι υψηλή συγκριτικά με τα υγιή δείγματα.²⁷

Οι οικογένειες miR-449 (miR-449a και miR-449b*) και miR-34 (miR34b*, miR-34b και miR-34c-5p) εμφανίζουν σημαντική πτώση της έκφρασής τους σε ασθενείς με προβλήματα στη σπερματογένεση σε σχέση με τους φυσιολογικούς, στους οποίους τα συγκεκριμένα miRNAs εκφράζονται σε μεγάλες ποσότητες καθώς είναι καίριας σημασίας για τη σπερματογένεση.²⁷

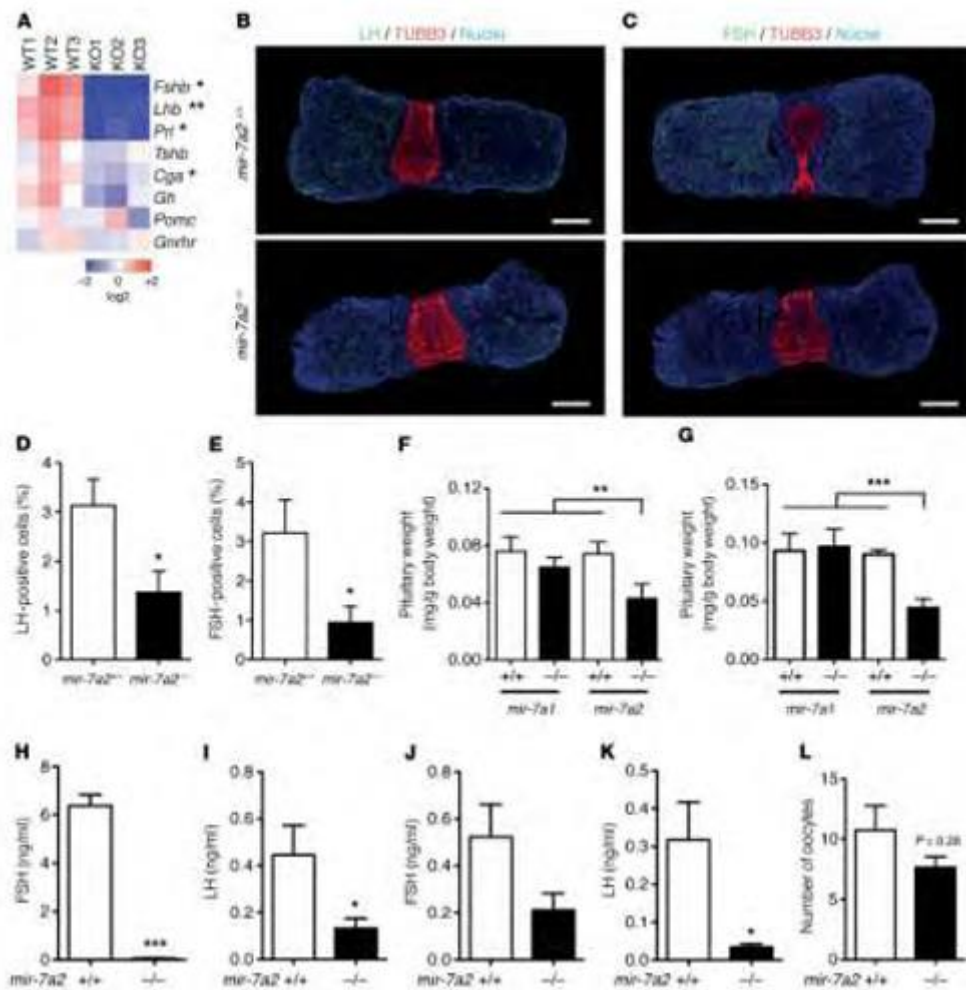
Σε περιπτώσεις υπογοναδοτροπικού υπογοναδισμού, βρέθηκε ότι το miR-7a2, μέλος μιας οικογένειας νευροενδοκρινών miRNAs (miR-7), είναι απαραίτητο για τη σωστή ανάπτυξη της υπόφυσης και τη σωστή λειτουργία του άξονα υποθαλάμου- υπόφυσης- γονάδων κατά την ενήλικη ζωή. Η έλλειψη του miR-7a2 συνεπάγεται χαμηλά επίπεδα γοναδοτροπινών και φυλετικών ορμονών, και μικρούς όρχεις ή ωοθήκες. Σύμφωνα με μια μελέτη του Ahmed και των συνεργατών του βρέθηκε ότι το miR-7a2 παρουσιάζει υψηλά επίπεδα έκφρασης στην υπόφυση, όπου και προκαλεί αναστολή έκφρασης της golgi glycoprotein 1 (GLG1) καθώς και αποσιώπηση του μονοπατιού της bone morphogenetic protein 4 (BMP4), η οποία αναστέλλει τη σύνθεση της FSH, ενώ επηρεάζει και τα επίπεδα έκφρασης του παράγοντα

prostaglandin F2a receptor regulator (PTGFRN). Φαίνεται λοιπόν ότι το miR-7a2 διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην ωρίμανση του γεννητικού συστήματος καθώς και στη ρύθμιση της σύνθεσης της FSH και LH. 37



Εικόνα 22. Τα μοριακά μονοπάτια ρύθμισης των LH και FSH στην υπόφυση. (Ahmed K. et al. Loss of microRNA-7a2 induces hypogonadotropic hypogonadism and infertility J Clin Invest. 2017;127(3):1061-1074)

Στην παρακάτω εικόνα, παρουσιάζονται αποτελέσματα από πειράματα απαλοιφής του miR-7a2 σε ποντίκια. Παρατηρείται ότι τα knockout ποντίκια παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα ορμονών της υπόφυσης σε σχέση με τα ποντίκια μάρτυρες (control), όπως προκύπτει από την heat map analysis ενώ και η ίδια η υπόφυση εμφανίζει μικρότερο μέγεθος.



Εικόνα 23. Μελέτες απαλοιφής του miR-7a2 που προκαλεί υπογοναδοτροπικό υπογοναδισμό. (Ahmed K... Latreille M., Stoffel M. Loss of microRNA-7a2 induces hypogonadotropic hypogonadism and infertility J Clin Invest. 2017;127(3):1061-1074)

Πρόσφατες μελέτες πάνω στην επίδραση του στρες στην ανδρική γονιμότητα και την κληρονομικότητα έχουν δείξει τον κρίσιμο ρόλο της επιδιδυμίδας στην τροποποίηση του RNA προφίλ των σπερματοζωαρίων. Το miR-31-5p έχει αναφερθεί ότι είναι ένα από τα miRNAs που τροποποιείται κατά κόρον μαζί με τα miR-155-5p, miR-878-5p, και miR-34c-5p στην επιδιδυμίδα ενηλίκων ανδρών που έχουν για κάποιο λόγο εκτεθεί σε μεταγεννητικό στρες. Κάποια ακόμη μικρά RNAs που εντοπίζονται στο σπέρμα έχει αποδειχθεί ότι τροποποιούνται μετά από έκθεση σε δίαιτα υψηλή σε λιπαρά, σε μη ανοχή στη γλυκόζη, σε στρες και παρουσία ενδοκρινικών διαταραχών.²⁷

Στο πλάσμα του σπέρματος υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία ελεύθερων, μικρών μη κωδικοποιητικών RNAs τα οποία προέρχονται από τους όρχεις, την επιδιδυμίδα ή τους επικουρικούς αδένες. Αυτά βρίσκονται συνήθως εντός εξωκυτταρικών κυστιδίων και δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί ακριβώς η σημασία τους. Αυτά τα εξωκυτταρικά RNAs έχουν εξεταστεί σε περιπτώσεις αζωοσπερμίας όπου δεν υπάρχουν σπερματοζώαρια στο εκσπερματικό υγρό. Οι Wu et al. ταυτοποίησαν, μέσω qRT-PCR, διαφορά στην έκφραση των miR-19b and let-7a μεταξύ του πλάσματος του σπέρματος 48 ασθενών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία και 48 φυσιολογικά γόνιμων ανδρών. Στους πρώτους η έκφραση των εν λόγω miRNAs ήταν αυξημένη.²⁷

Ο Zhang και οι συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν τη σύνδεση μεταξύ πολυμορφισμών SNPs στην περιοχή πρόσδεσης του miRNA στα γονίδια και την ανδρική υπογονιμότητα. Συγκεκριμένα, ασχολήθηκαν με 140 γονίδια σχετιζόμενα με τη σπερματογένεση των θηλαστικών και ανέλυσαν όλους τους πολυμορφισμούς που έφεραν στην 3' αμετάφραστη περιοχή τους, όπου βρίσκεται και η θέση πρόσδεσης διαφόρων miRNAs. Βρέθηκαν 6 πολυμορφισμοί στο 3'UTR των γονιδίων CYP19, SERPINA5, CGA, CPEB1 και CPEB2 μέσω γονοτύπησης σε ασθενείς με ιδιοπαθή αζωοσπερμία ή σοβαρή ολιγοζωοσπερμία και φυσιολογικούς ασθενείς. Τα ευρήματα της μελέτης αυτής έχουν ως εξής: Η υποκατάσταση A>T στην περιοχή πρόσδεσης του miR-1302 στο γονίδιο CGA συνδέεται στενά με την ιδιοπαθή ανδρική υπογονιμότητα. Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε μέσω δοκιμασίας λουσιφεράσης ότι η αλλαγή της αλληλουχίας του γονιδίου CGA (λόγω της υποκατάστασης) παρεμποδίζει την πρόσδεση του miR-1302.²⁷

Table II Studies showing change in expression levels of miRNAs in sub-fertile and infertile men.

Infertility complication	Tissue used	Upregulated	Downregulated	References
Asthenozoospermia	Spermatozoa	miR-141 and miR-200a	miR-122 and miR-34b	(Abu-Halima et al., 2013)
Oligozoospermia	Spermatozoa	—	miR-34b and miR-122	
Oligoasthenoteratozoospermia	Spermatozoa	miR-141 and miR-200a	miR-34c-5p, miR-34b, and miR-16	
Azoospermia (Sertoli cell only and mixed atrophy)	Testicular tissue	hsa-miR-135a, hsa-miR-10b, hsa-miR-371-5-p, hsa-miR-373, hsa-miR-3137, hsa-miR-99b, hsa-miR-3692	hsa-miR-34b, hsa-miR-34c-5p, and hsa-miR-449a, hsa-miR-19a, hsa-miR-92a,	(Abu-Halima et al., 2013)
Azoospermia (Germ cell arrest)	Testicular tissue	—	hsa-miR-449a, hsa-miR-34b, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-449b	
Non-obstructive azoospermia	Semen	hsa-miR-429	hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-122, hsa-miR-34b, hsa-miR-34b*	(Abu-Halima et al., 2014b)
Oligoasthenozoospermia	Semen	miR-15a	miR-765 and miR-1275	(Abu-Halima et al., 2016)
Azoospermia	Testicular tissue	hsa-mir-19b-1, hsa-mir-19b-2, hsa-mir-20a, hsa-mir-302a, hsa-mir-371a, hsa-mir-372, hsa-mir-373, hsa-mir-383, hsa-mir-491, hsa-mir-520d, hsa-mir-92a-1, hsa-mir-92a-2	—	(Lian et al., 2009, 2010)
Non-obstructive azoospermia	Testicular tissue	miR-302a, miR-491-3p	miR-520d-3p, miR-383	
Oligozoospermia	Testicular Tissue	miR-34c	—	(Li et al., 2016)
Teratozoospermia	Semen	miR-574-5p, miR-297, miR-122, miR-1275, miR-373, miR-185 and miR-193b	miR-100, miR-512-3p, miR-16, miR-19b, miR-23b and miR-26a	(Liu et al., 2012b)
Oligozoospermia	Sperm and Seminal plasma	miR-let-7a, miR-7-1-3p, miR-141, miR-200a, miR-429	—	(Mokánszki et al., 2019)
Asthenozoospermia	Sperm and Seminal plasma	—	miR-15b, miR-34b, miR-122	

Εικόνα 24. Μελέτες ανίχνευσης αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης miRNAs σε υπογόνιμους και στειρούς άνδρες (Διαθέσιμο στο: Vashisht A, Gahlay GK. Using miRNAs as diagnostic biomarkers for male infertility: opportunities and challenges. Mol Hum Reprod. 2020 Apr 24;26(4):199-214)

6.2. Γυναικεία υπογονιμότητα

Ο ρόλος των miRNAs στην ωογένεση, όπως και στη σπερματογένεση, έχει προσδιοριστεί μέσω μελετών μοντέλων knock-out του γονιδίου της DICER1 και της AGO2, που αποτελούν δύο βασικούς παράγοντες για τη φυσιολογική λειτουργία του συμπλόκου RISC (RNA-induced gene silencing complex) και της πρωτεΐνης Drosha.²⁹ Μελέτες έχουν διεξαχθεί σε πολλά είδη θηλαστικών όπως το ποντίκι, το γουρούνι, αλλά και σε διάφορα βοοειδή και πρόβατα. Σε έγκυες κατσίκες (*Capra hircus*), το miR-143 μπορεί να στοχεύει τα γονίδια των υποδοχέων των Frizzled-6 και Frizzled-3 στο

μονοπάτι Wnt/ β -κατενίνης. Στην *in vitro* ωρίμανση του συμπλέγματος ωοφόρου δίσκου-ωοκυττάρων στο γουρούνι, το miR-21 ρυθμίζει προς τα κάτω τον παράγοντα TIMP3 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3) ενώ ρυθμίζει προς τα πάνω τις disintegrin, ADAMTS1 (metalloproteinase with thrombospondin motifs-1) και VERSICAN, προάγοντας έτσι την ωρίμανση. Επιπλέον, κατά την *in vitro* ωρίμανση ωοκυττάρων βοοειδών, μία μείωση στην δραστηριότητα του miR-130b μπορεί να καταστείλει την εξώθηση του πρώτου πολικού σωματίου. Τα miRNAs bta-miR-143, bta-let-7f, bta-let-7a, bta-let-7c, bta-miR-10b, bta-let-7b και bta-miR-26a βρίσκονται σε αφθονία στο είδος βοοειδών Holstein, ενώ το miR-224 φάνηκε να εμπλέκεται στην ωοθυλακική ανάπτυξη στα ποντίκια. Επιπλέον, μελέτες *in vivo* έχουν αποδείξει ότι τα miRNAs παίζουν καθοριστικό ρόλο και στην ωογένεση στο zebrafish. ³⁰

Ωοθηκική λειτουργία

Πολλά miRNAs εκφράζονται εντός της ωοθήκης και εμπλέκονται στη ρύθμιση των αναπαραγωγικών διαδικασιών των θηλαστικών. Σύμφωνα με έρευνες που μελετούν το προφίλ έκφρασης miRNA σε ωοθήκες ενήλικων χοίρων, τα miR-21-5p, miR-143-3p και μέλη της οικογένειας let-7 είναι αυτά που επικρατούν στις ωοθήκες αλλά και στους όρχεις. Τα miR-378, miR-1, miR-206, miR-379, miR-127, και miR-411 εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης στην ωοθήκη σε σχέση με τον όρχι, ενώ το ακριβώς αντίθετο συμβαίνει για τα miR-10b, miR-26a, miR-21, miR-140, και miR-101. Επιπλέον, τα περισσότερα miRNA των οποίων τα γονίδια εδράζονται στο X χρωμόσωμα, εκφράζονται σε μεγαλύτερο βαθμό στις ωοθήκες παρά στους όρχεις. Γενικά, σε όλα τα είδη, τα miRNAs της οικογένειας let-7 αλλά και τα miR-21, miR-99a, miR-125b, miR-126, miR-143, miR-145, και miR-199b είναι οι επικρατέστεροι πληθυσμοί miRNA στις ωοθήκες. ³¹

Μια πληθώρα miRNAs συμμετέχουν στην ωρίμανση των ωοκυττάρων. Κάποια από αυτά είναι τα miR-2, miR-7, miR-184, miR-100, miR-9b, let-7, miR-79, miR-133, miR-275 και miR-252. Η έκφραση των miRNAs διαφέρει ανάλογα με το στάδιο στο οποίο βρίσκονται τα ωάρια. Τα miR-2 και miR-133 είναι αφθονότερα κατά τη μετάφαση I και παρεμποδίζουν την μετάφραση της κυκλίνης B, συνδεόμενα

στο 3' αμετάφραστο άκρο του γονιδίου που την κωδικοποιεί. Ωστόσο, υπάρχουν και miRNAs σταθερής έκφρασης στην ωοθήκη ανεξαρτήτως οργανισμού, όπως είναι αυτά της οικογένειας let-7. Το miR-503 παρουσιάζει προς τα κάτω ρύθμιση κατά την FSH- εξαρτώμενη ωοθυλακική ανάπτυξη και την ωχρινοποίηση αλλά εμφανίζει προς τα πάνω ρύθμιση πριν την ωορρηξία.³¹

Διάφορες μελέτες βιοπληροφορικής έχουν δείξει ότι τα γονίδια που στοχεύει η πλειοψηφία των miRNAs στις ωοθήκες συμμετέχουν στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την κυτταρική αύξηση, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση, σε διαταραχές του ενδοκρινικού συστήματος και σε ωοθηκικές λειτουργίες. Επιπλέον, το miR-143 βρέθηκε ότι παρεμποδίζει τον σχηματισμό των αρχέγονων ωοθυλακίων μειώνοντας την έκφραση των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs) 4 και 6 και των κυκλινών B1, D2, και E2 στα προκοκκώδη κύτταρα. Επιπλέον, το miR-181a ελέγχει την ομαλή λειτουργία των κοκκωδών κυττάρων στοχεύοντας τον υποδοχέα IIA της ακτιβίνης, ενώ τα miR-132 και miR-212 συνδέονται με τη ρύθμιση της έκκρισης ορμονών κατά την ωορρηξία και την ωχρινοποίηση.³¹

Όσον αφορά στην συμμετοχή των miRNAs στην ωοθυλακική ανάπτυξη, διαφορετικά προφίλ έκφρασης έχουν εντοπιστεί στα διάφορα στάδια των ωοθυλακίων. Αυτά που εκφράζονται σταθερά σε οποιοδήποτε αναπτυξιακό στάδιο είναι τα miR-21, miR-125b, let-7a και let-7b. Τα miR-199a-3p, miR-145 και miR-31 υπερεκφράζονται κατά την ωοθυλακική φάση ενώ μια αξιοσημείωτη μείωση της έκφρασης τους παρατηρείται στη μετάβαση από την ωοθυλακική στην ωχρινική φάση. Αντίθετη συμπεριφορά εμφανίζουν τα miR-503, miR-21 και miR-142-3p. Σύμφωνα με τον Zhang και τους συνεργάτες του, το miR-181a εκφράζεται σε μικρότερο βαθμό στα ωοθυλάκια με και χωρίς άντρο συγκριτικά με τα πρωτογενή ωοθυλάκια.

Κατά την ωοθυλακιογένεση, πάνω από το 99% των ωοθυλακίων υπόκεινται σε ατρησία, στην οποία παίζουν σημαντικό ρόλο τα miRNAs. Τα Hsa-miR-936, P-miR-1281, hsa-miR-26b, mmu-miR-1224, hsa-miR-10b, P-miR-466 g-b, P-miR-1275, hsa-miR-574-5p, R-miR-26b, hsa-miR-149, hsa-miR-1275, και hsa-miR-99a εμφανίζουν αυξημένη έκφραση κατά την ατρησία ενώ τα R-let-7a, hsa-let-7i, hsa-miR-92b, hsa-miR-92a, P-miR-923, hsa-miR-1979, R-miR-739, hsa-miR-1308, hsa-miR-1826, P-miR-

1826, και ssc-miR-184 εμφανίζουν μειωμένη έκφραση. Για παράδειγμα το miR-26b, που αυξάνεται κατά την ατρησία, αυξάνει τις θραύσεις του DNA και προάγει την απόπτωση των κοκκωδών κυττάρων.³¹

Πρόσφατη έρευνα αποκάλυψε το ρόλο της έκφρασης του miR-224 και του μονοπατιού TGF-β/Smad στην ωοθυλακική ανάπτυξη. Η υπερέκφραση του miR-224 ευοδώνει τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων, που διαμεσολαβείται από τον παράγοντα TGF-β1, στοχεύοντας τον Smad4. Ο τελευταίος είναι παράγοντας κλειδί στην ωοθυλακική ανάπτυξη και τη γυναικεία γονιμότητα. Η παρεμπόδιση του miR-224 καταστέλλει μερικώς τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων, επομένως, έτσι αποδεικνύεται ο βιολογικός του ρόλος στην ωοθυλακιογένεση.

Τα miRNAs, μεταξύ άλλων, ρυθμίζουν την σύνθεση και απελευθέρωση των στεροειδών ορμονών των ωοθηκών, στοχεύοντας τους υποδοχείς τους. Επί παραδείγματι, η παραγωγή της οιστραδιόλης (E2) ελέγχεται από το ένζυμο αρωματάση. Σύμφωνα με την ομάδα του Xu, η έκφραση της αρωματάσης και κατ' επέκταση η σύνθεση της οιστραδιόλης στα κοκκώδη κύτταρα μειώνονται μετα-μεταγραφικά από το miR-378, το οποίο συνδέεται με το 3' αμετάφραστο άκρο της κωδικοποιητικής αλληλουχίας της αρωματάσης. Αντιθέτως, το miR-133b διεγείρει τη σύνθεση της E2 στοχεύοντας τον παράγοντα Foxl2, ο οποίος με τη σειρά του προάγει την αναστολή της μεταγραφής του StAR και του CYP19A1. Τα miRNAs δεν σχετίζονται μόνο με τη ρύθμιση αλλά και με την απελευθέρωση της οιστραδιόλης.³¹

Αξίζει να σημειωθεί ότι το προφίλ έκφρασης των miRNAs επηρεάζεται ορατά από τις υπάρχουσες στο περιβάλλον τους ορμόνες. Το miR-132 και το miR-212 αυξάνονται ως απόκριση στην αύξηση της ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης hCG και η έκφραση 31 ακόμα microRNAs τροποποιείται μετά από την έκθεση σε ωοθυλακιοτρόπο ορμόνη (FSH). Συγκεκριμένα, τα miR-29a και miR-30d εμφανίζουν μια βραχυπρόθεσμη προς τα κάτω ρύθμιση αλλά μια μακροπρόθεσμη αύξηση μετά από επαγωγή με FSH.

Μία ακόμη ένδειξη της συμβολής των miRNAs στις αναπαραγωγικές λειτουργίες είναι ο ρόλος τους στην απελευθέρωση ωθητικών προγεσταγόνων και ανδρογόνων. Τριάντα έξι miRNAs, συμπεριλαμβανομένων των let-7b, let-7c, miR-15a, miR-17-3p, miR-96, miR-92, miR-108, miR-133b, miR-134, miR-135, και miR-146, παρεμποδίζουν την απελευθέρωση της προγεστερόνης, ενώ δεκαέξι miRNAs (miR-16, miR-24, miR-25, miR-122, miR-145, miR-182, miR-18, miR-125a, miR-147, miR-32, miR-103, miR-143, miR-150, miR-152, miR-153 και miR-191) προάγουν την απελευθέρωση της στα κοκκώδη κύτταρα. ³¹

miRNAs	Spec	Regulation	Target genes	Functions
Granulosa cells				
miR-503	Mouse	Stimulation by gonadotrophins; Down-regulated during FSH-responsive follicular development stage and luteinization; Up-regulated during later stage before ovulation	<i>ACTRIIa;ACTRIIb</i> <i>FSHR;BCL2;</i> <i>CCND2</i>	GC proliferation and luteinization
miR-21; miR-132 miR-212; miR-224	Equine	Up-regulated by hCG	<i>PTEN;RASA1</i> <i>SMAD4</i>	Regulation of steroidogenesis and ovulation
miR-10a;miR-105 miR-182;miR-15a	Human Rat	miR-182: Up-regulated by cAMP agonist	<i>CyclinB1;TdT</i> <i>Caspase-3;PCNA</i>	Involve in GC proliferation and apoptosis
miR-224	Mouse	Up-regulated by TGF-β1/SMAD pathway	<i>SMAD4</i>	TGF-β1-mediated GC growth and E2 production
miR-23a	Human	Caspase-3 dependent apoptosis pathway	<i>XIAP;Caspase-3</i>	Pro-apoptotic role
miR-383	Mouse	Down-regulated by TGF-β1 and transcription factor steroidogenic factor-1 (SF-1)	<i>RBMS1</i>	Promote steroidogenesis in GC

miR-320	Mouse	Down-regulated by TGF- β 1, FSH, and pregnant mare serum gonadotropin (PMSG)	<i>E2F1</i> <i>SF-1</i>	Inhibit E2 synthesis and GC proliferation; Promotion of T and P synthesis
miR-29a miR-30d	Rat	Down-regulation after FSH treatment for 12 hours and up-regulation after FSH treatment for 48 hours	<i>COL4A1;BMF</i> <i>RNF2;EED</i>	Involvement in FSH-induced progesterone production
miR-145	Mouse	-	<i>ACVR1B</i>	Suppress GC proliferation
miR-21	Mouse Human	Up-regulated by hCG/LH	<i>COL4A1</i>	Anti-apoptosis role in GC; Regulate COL4A1 synthesis
miR-132 miR-214	Rat	down-regulated by cAMP agonist(miR-132); up-regulated by cAMP agonist(miR-214)	<i>SREBP-1c</i> <i>LDLR</i>	Lipid metabolism /steroidogenesis in rat GC
miR-181a	Mouse	-	<i>ACVR1A</i>	Supress GC proliferation
miR-125b	Human Mouse	induced by dihydrotestoster-1 and testosterone	<i>BAK;BAX</i> <i>BMF;TP53</i>	Suppression of proapoptotic protein expression in GCs
let-7 family; miR-21;miR-143; miR-125b;	Mouse	Housekeeping Regulated by FSH treatment;	-	Follicle development

Oocytes

miR-184;miR-10a miR-100	Human	-	<i>SMARCA5</i> <i>NCOR2;HOXA1</i>	Oocyte reprogramming; Repression nuclear receptors; Regulation of oocyte-specific gene expression
miR-224	Mouse	Up-regulated by TGF- β 1 and EGF	<i>PTX3</i>	Cumulus expansion in EGF-stimulated COCs
miR-205 miR-150 miR-122;miR-96, miR-146a; iR-146b-5p	Bovine	Dynamic degradation during oocyte maturation	-	Oocyte maturation
miR-335-5p	Mouse	At high level mainly during the meiotic Maturation period; Decreased significantly shortly after fertilization	<i>Daam1;ERK1/2</i> <i>Mitogen-activated protein kinase pathway</i>	Oocyte meiosis; Cytoskeleton dynamics; Spindle formation
miR-20a;miR-15a miR-602	Human	miR-20a, miR-15a: dynamic changes during meiosis	miR-15a: <i>BCL-2</i> <i>family;CDC25A</i>	Regulation of cell division and cell growth
let-7b;let-7c miR-27a;miR-322	Mouse	-	<i>IGFBP-2</i>	Regulation of oocyte meiotic competence

Εικόνα 20. Τα μικρά μη κωδικά RNAs που εκφράζονται στα κοκκίωδη κύτταρα (granulosa cells) και τα ωκύτταρα (Ying Li και συν.. MicroRNAs in ovarian function and disorders. Journal of Ovarian Research (2015) 8:51)

Η μελέτη της υπογονιμότητας μπορεί να βασιστεί στον ρόλο της Dicer με τη χρήση μοντέλων ποντικών knockout. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η Dicer είναι βασική για τη σύνθεση των miRNAs. Σε μια ενδιαφέρουσα μελέτη, διασταυρώθηκαν ποντίκια με ενθέσεις loxP στο γονίδιο της Dicer (*Dicer1^{fl/fl}*) με ποντίκια που εκφράζουν την Cre-ρεκομπινάση με τη βοήθεια του ενισχυτή του υποδοχέα της Αντι-Μυλλέριας ορμόνης (*Amhr2^{Cre/+}*). Τα ενήλικα θηλυκά ποντίκια με γονότυπο *Dicer1^{fl/fl};Amhr2^{Cre/+}* μπορούσαν να ζευγαρώσουν φυσιολογικά αλλά το ζευγάρι δεν απέδιδε απογόνους. Μορφολογικές και ιστολογικές αξιολογήσεις της αναπαραγωγικής οδού των ποντικών αυτών έδειξαν ότι η μήτρα και οι ωαγωγοί

τους ήταν υποτροφικά και σημαντικά αποδιοργανωμένα. Τα δεδομένα αυτά απέδειξαν ότι η μετα-μεταγραφική γονιδιακή ρύθμιση από τα miRNAs είναι καίριας σημασίας για την γυναικεία γονιμότητα και η απώλεια της Dicer στα ωοκύτταρα, τα κοκκώδη κύτταρα, τους ωαγωγούς και τη μήτρα μπορεί να προκαλέσει υπογονιμότητα.³⁵

Υπάρχουν διάφοροι παθολογικοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση των miRNA στις ωοθήκες των θηλαστικών και κατ' επέκταση να οδηγήσουν σε υπογονιμότητα. Ένας από αυτούς είναι η δισφαινόλη-A (BPA) που αποτελεί μια χημική ουσία ευρισκόμενη σε αφθονία στο περιβάλλον και που μπορεί να απορρυθμίσει το ενδοκρινικό σύστημα. Σε μελέτη του Veiga-Lopez και συνεργατών του, εξετάστηκε το αντίκτυπο του BPA στην έκφραση mRNA και miRNA και βρέθηκε ότι αυτό αυξάνει την έκφραση των ενζύμων CYP19 και 5α- ρεδουκτάσης (που εμπλέκονται στη στεροειδογένεση), αναταράσσει το μεταγράφημα των ωοθηκών σε πρόβατα και τροποποιεί το προφίλ έκφρασης miRNA στις ωοθήκες εμβρύων.

Τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs και των mRNAs-στόχων τους διαφοροποιούνται στις παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με την υπογονιμότητα στις γυναίκες όπως είναι η ενδομητρίωση, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών και η πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια. Το γεγονός αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα miRNAs ενδέχεται να έχουν κομβικό ρόλο στην παθογένεση αυτών των διαταραχών.

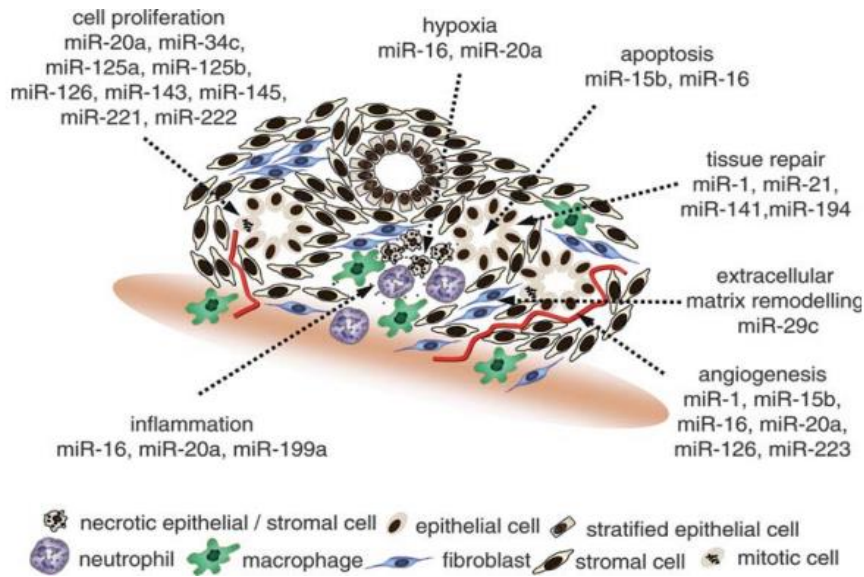
Ενδομητρίωση

Η ενδομητρίωση είναι μια από τις πιο κοινές καλοήθειες, γυναικολογικές παθήσεις και χαρακτηρίζεται από ανάπτυξη ιστού παρόμοιου με το ενδομήτριο, έξω από τη μήτρα. Παρά την υψηλή συχνότητα εμφάνισης της στον πληθυσμό (6-10% των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας), ο ακριβής μηχανισμός παθογένεσης της ενδομητρίωσης δεν έχει ανακαλυφθεί. Ωστόσο, το 1927, ο Sampson διαμόρφωσε μια

θεωρία, στην οποία υποστήριξε ότι ενδομητρικός ιστός μπορεί να περνάει μέσα από τις σάλπιγγες και να εμφυτεύεται σε άλλα όργανα στην πυελική κοιλότητα κατά την έμμηνο ρύση. Δεδομένα από συνεχείς μελέτες έχουν αποδείξει ότι στην εμφάνιση της ενδομητρίωσης μπορεί να εμπλέκεται η απορρύθμιση της έκφρασης των miRNA. ³³

Το προφίλ έκφρασης miRNA σε ένα ευτοπικό και ένα εκτοπικό ενδομήτριο από γυναίκες με ενδομητρίωση διαφέρει σημαντικά. Δύο ανεξάρτητες μελέτες ανέφεραν πως τα miR-17-5p και miR-20a, που εμπλέκονται στη ρύθμιση της αγγειογένεσης, έχουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης σε ασθενείς με ωθητικό ενδομητρίωμα. Επιπλέον, μια σημαντική αύξηση των επιπέδων miR-125a και miR-222 και μια μείωση στην πρωτεΐνη VEGF-A παρατηρούνται σε περιπτώσεις ενδομητρίωσης σε σχέση με το ευτοπικό ενδομήτριο. Σύμφωνα με τους Burney et al, δύο οικογένειες miRNAs, οι miR-9 και miR-34, εμφανίζουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης σε φυσιολογικές γυναίκες και σε γυναίκες με ενδομητρίωση. Το mRNA που κωδικοποιεί το Bcl2 είναι στόχος του miR-9 και φαίνεται να υπερεκφράζεται στο ενδομήτριο γυναικών με ενδομητρίωση. Όσον αφορά την οικογένεια miR-34, μελέτες έχουν δείξει ότι τα miR-34b και miR-34c δρουν σαν διαμεσολαβητές της p53 εξαρτώμενης καταστολής του πολλαπλασιασμού. ³⁴

Κάποιοι τρόποι με τους οποίους τα miRNA συμμετέχουν στην παθολογία της ενδομητρίωσης φαίνονται στην παρακάτω εικόνα και αφορούν σε διαδικασίες που περιλαμβάνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την φλεγμονή, την υποξία, την απόπτωση, την επιδιόρθωση και την αναδιαμόρφωση ιστών.



Εικόνα 25. Οι ρυθμιστικές λειτουργίες των μικρών μη κωδικών μορίων RNA κατά την ανάπτυξη των εκτοπικών αλλοιώσεων στην ενδομητρίωση (E.M. C. Ohlsson Teague και συν.. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. Human Reproduction Update, Vol.16, No.2 pp. 142–165, 2010)

Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών

Σε μελέτες ωοθυλακικού υγρού φυσιολογικών γυναικών και γυναικών με πολυκυστικές ωοθήκες, βρέθηκε διαφορά στην έκφραση 29 εκ των 235 miRNAs που εκφράζονται γενικά στο ωοθυλακικό υγρό. Μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), επαληθεύτηκε ότι 5 miRNAs παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση στην ομάδα γυναικών με πολυκυστικές ωοθήκες σε σχέση με τις φυσιολογικές. Τα γονίδια στόχοι αυτών των miRNAs πιθανόν να σχετίζονται με την ρύθμιση της ινσουλίνης και τη φλεγμονή.³⁵

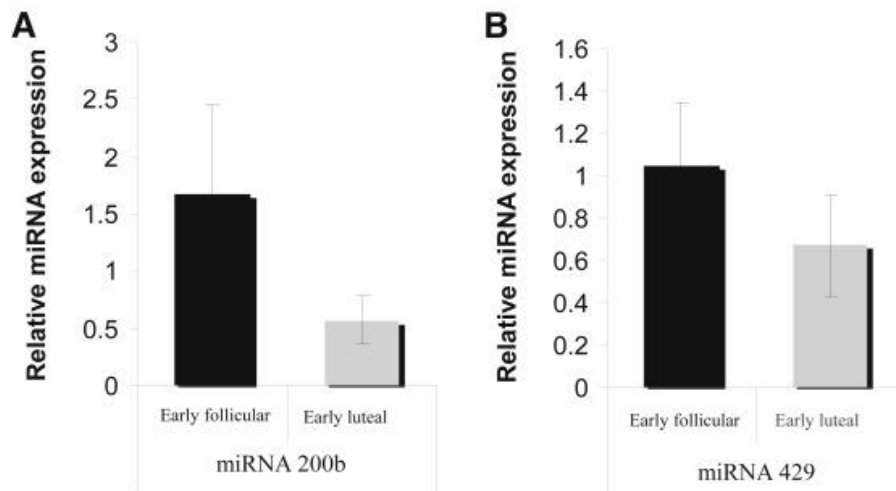
Τα miR-132, miR-320, miR-520c-3p, miR-24 και miR-222 που είναι παρόντα στο ωοθυλακικό υγρό, ρυθμίζουν τη συγκέντρωση της οιστραδιόλης και τα miR-24, miR-193b και miR-483-5p τη συγκέντρωση της προγεστερόνης. Συγκεκριμένα, το miR-320 ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και την παραγωγή στεροειδών ορμονών στοχεύοντας τους παράγοντες E2F1 και SF-1 στα κοκκώδη κύτταρα και έτσι

εμπλέκεται στην ωοθυλακική ανάπτυξη. Έχει βρεθεί ότι στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών με PCOS, η έκφραση των miR-132 και miR-320 είναι χαμηλότερη συγκριτικά με τις φυσιολογικές γυναίκες.

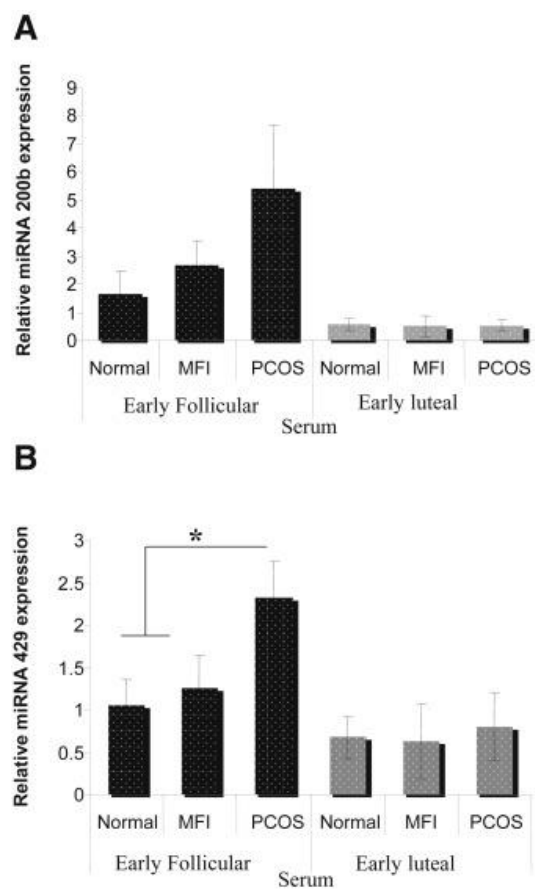
Σε μια πρόσφατη μελέτη σε ποντίκια παρατηρήθηκε ότι το miRNA-200b και το miRNA-429, μέλη της οικογένειας miRNA 200, επηρεάζουν ισχυρά την ωορρηξία στα θηλυκά. Σε πειράματα απαλοιφής των δύο προηγούμενων RNA, τα ποντίκια εμφάνισαν δυσλειτουργία του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση- ωθήκης και αδυναμία ωορρηξίας. Η οικογένεια των miRNA 200 έχει συσχετιστεί στους ανθρώπους με την ογκογένεση, και πιο συγκεκριμένα με την μεσεγχυματική μετάβαση. Η διαδικασία αυτή είναι καθοριστική για τον σχηματισμό του ωχρού σωματίου, ειδικά κατά την έντονη αγγειογένεση που προκύπτει μετά την ωορρηξία.³⁹

Ένας από τους κορυφαίους στόχους των προαναφερθέντων miRNAs σε ποντίκια αλλά και ανθρώπους, είναι οι παράγοντες *ZEB1* και *ZEB2*. Σε ποντίκια με έλλειψη αυτών των miRNAs, η έκφραση του *ZEB1* ήταν αυξημένη. Η πρωτεΐνη *ZEB1* αποτελεί πυρηνικό αναστολέα του γονιδίου της LH, που παρεμποδίζει την μεταγραφή του και συνάμα την αιχμή της LH, που είναι απαραίτητη για την ωορρηξία.³⁹

Για να προσδιοριστεί ο ρόλος των δύο miRNAs στην ανθρώπινη ωορρηξία, η Eisenberg και η ομάδα της ανέλυσαν το μοτίβο έκφρασής τους κατά την ωοθηκική διέγερση σε γυναίκες με και χωρίς ωορρηξία (που υποβλήθηκαν σε εξωσωματική γονιμοποίηση) και σε γυναίκες κατά την φυσιολογική ωορρηξία τους.³⁹



Εικόνα 26. Επίπεδα έκφρασης των miR-429 και miR-200b στον φυσιολογικό κύκλο. (Eisenberg I et al. Elevated circulating micro-ribonucleic acid (miRNA)-200b and miRNA-429 levels in anovulatory women,2017)



Εικόνα 27. Τα επίπεδα έκφρασης των miR-429 και miR-200b σε γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS), σε γυναίκες με ωορρηξία σε πρόγραμμα IVF και σε φυσιολογικές γυναίκες.

Όπως προέκυψε, κατά τον φυσιολογικό κύκλο τα επίπεδα των παραπάνω micro RNAs παρουσίαζαν διαφορετικό προφίλ έκφρασης κατά την μετάβαση από την ωοθυλακική στην ωχρινική φάση. Αντίθετα, σε γυναίκες με PCOS, πριν την ορμονοθεραπεία, τα επίπεδα των miR-429 και miR-200b ήταν εμφανώς αυξημένα. Τα επίπεδα των micro RNAs παρουσίασαν πτώση σε όλες τις κατηγορίες 36 ώρες μετά την πρόκληση ωορρηξίας είτε φυσιολογικά είτε κατόπιν ορμονικής διέγερσης.³⁹

Όπως φαίνεται, μια πληθώρα miRNAs βρίσκονται στο ωοθυλακικό υγρό και διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στην στεροειδογένεση και το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών. Κάποιες από τις διαδικασίες στις οποίες συμμετέχουν είναι η σηματοδότηση Notch, η ορμονική ρύθμιση και ο μεταβολισμός της ενέργειας. Οι παράγοντες Notch3 και MAPK3, βασικά μέλη του μονοπατιού Notch και ERK-MAPK, εξαρτώνται άμεσα και ρυθμίζονται από το miR-483-5p.³⁵

Πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια

Η πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια (ΠΩΑ) είναι μια διαταραχή της ωοθηκικής λειτουργίας που προκαλεί αμηνόρροια, υπεργοναδοτροπικό υπογοναδισμό και απουσία ωοθυλακίων/ωαρίων διαθέσιμα για γονιμοποίηση πριν από την ηλικία των 40 ετών στις γυναίκες. Σύμφωνα με μελέτες, με τη χρήση μικροσυστοιχιών βρέθηκε ότι 10 miRNAs εμφανίζουν σημαντικά αυξημένη έκφραση και 2 miRNAs σημαντικά μειωμένη έκφραση στο πλάσμα γυναικών με ΠΩΑ σε σχέση με το πλάσμα φυσιολογικών γυναικών. Μεταξύ των miRNAs με αυξημένη έκφραση ήταν το miR23a, το οποίο έχει επιβεβαιωθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων, μειώνοντας την έκφραση της XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein).³⁵

Ένα miRNA με χαμηλά επίπεδα έκφρασης στο πλάσμα γυναικών με ΠΩΑ είναι το miR-22-3p το οποίο τις διακρίνει από τις φυσιολογικές και έχει συσχετιστεί αρνητικά με τα επίπεδα FSH του ορού. Οι λειτουργίες στόχοι του miR-22-3p είναι η

απόπτωση, η ενδοκυττάρωση και η ογκογένεση. Σύμφωνα με μελέτες, η χαμηλή έκφρασή του στις περιπτώσεις ΠΩΑ αντικατοπτρίζει το μειωμένο ωθητικό απόθεμα που προκύπτει σαν συνέπεια της παθογένεσης της ΠΩΑ. ³⁵

Εμφύτευση

Έχει αποδειχθεί ότι τα ανθρώπινα έμβρυα εκφράζουν miRNAs στο καλλιεργητικό υλικό στο οποίο βρίσκονται, τα οποία μπορεί να αποτελούν βιοδείκτες ενδεικτικούς της εμβρυϊκής ανάπτυξης και της εμφύτευσης. Σε μελέτες στον άνθρωπο και τα βοοειδή, διαφορετική έκφραση miRNAs παρατηρήθηκε μεταξύ καλλιεργείων εμβρύων που κατάφεραν να αναπτυχθούν μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης και εμβρύων που παρέμειναν στο στάδιο του μοριδίου λόγω αδυναμίας περαιτέρω ανάπτυξης σε βλαστοκύστη. Συγκεκριμένα, στο καλλιεργητικό υλικό, τα miR-25, miR-302c, miR-196a2, και miR-181a εκφράζονταν σε υψηλότερα επίπεδα στα σταματημένα έμβρυα στο στάδιο της morula παρά στις βλαστοκύστες.

Το καλλιεργητικό υλικό από 55 κύκλους μεταφοράς ενός εμβρύου (single-embryo transfer cycles) εξετάστηκε για την έκφραση miRNA, χρησιμοποιώντας ποσοτική RT-PCR, έτσι ώστε να γίνει συσχέτιση της έκφρασης με την επίτευξη ή όχι εγκυμοσύνης. Ένα ενδιαφέρον εύρημα ήταν ότι κάποια miRNAs συσχετίστηκαν με κάποια κακή απόβαση: το miR-191 υπήρχε σε υψηλή συγκέντρωση στο καλλιεργητικό υλικό ανευπλοειδικών εμβρύων ενώ τα miR-191, miR-372, και miR-645 βρίσκονταν σε υψηλή συγκέντρωση στο καλλιεργητικό μέσο αποτυχημένων κύκλων εξωσωματικής γονιμοποίησης, χωρίς επίτευξη εγκυμοσύνης. Επιπλέον, η συγκέντρωση των miRNAs ήταν υψηλότερη στο καλλιεργητικό μέσο εμβρύων που προέκυψαν από την τεχνική ICSI σε σχέση με αυτά που προέκυψαν από κλασική εξωσωματική γονιμοποίηση. ³⁵

Η εμφύτευση του εμβρύου εξαρτάται επίσης από την υποδεκτικότητα του ενδομητρίου ενώ η επαναλαμβανόμενη αποτυχία εμφύτευσης είναι ένα από τα μεγαλύτερα εμπόδια που συναντάει κανείς στα προγράμματα γονιμοποίησης in vitro.

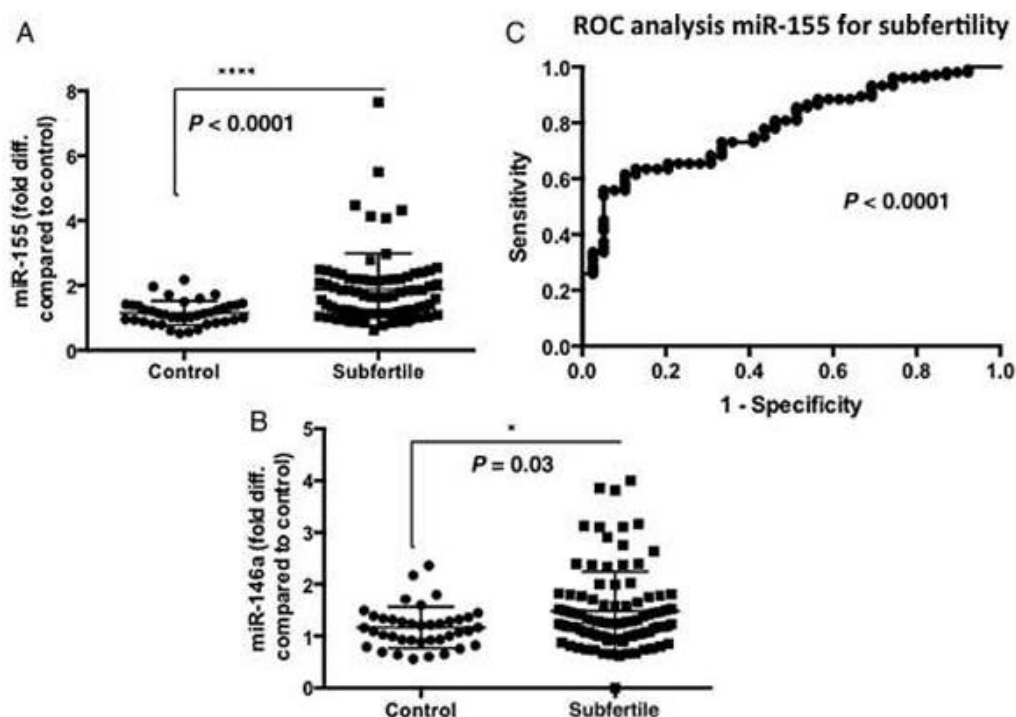
Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι 13 miRNAs, τα οποία υποθετικά ρυθμίζουν 3800 διαφορετικά γονίδια, εμφανίζουν διαφορετικό μοτίβο έκφρασης στις περιπτώσεις επαναλαμβανόμενων αποτυχιών εμφύτευσης (repeated implantation failure-RIF) σε σχέση με τις φυσιολογικές περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι 10 εξ αυτών υπερεκφράζονταν σε σχέση με το φυσιολογικό, συμπεριλαμβανομένων των miR-23b, miR-99a, και miR-145, ενώ τα 3 εκφράζονταν σε χαμηλότερα επίπεδα από το φυσιολογικό.

Τα επίπεδα mRNA που συνδέονται με μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, το μονοπάτι Wnt και άλλα μονοπάτια του κυτταρικού κύκλου είναι χαμηλότερα σε ασθενείς με επανειλημμένες αποτυχίες εμφύτευσης (RIF). Σε μοντέλα ποντικών, έχει αποδειχθεί πως η έκφραση του miR-181 είναι κρίσιμης σημασίας για την εμφύτευση του εμβρύου και ρυθμίζεται από τον LIF (leukemia inhibitory factor).³⁵

6.3. Τα miRNAs ως διαγνωστικοί δείκτες

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα miRNAs επηρεάζουν την έκφραση των mRNA και συνεπώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση ασθενειών και την πρόγνωση της εξέλιξής τους. Η μεταβολή στο προφίλ έκφρασης τους χρησιμοποιείται σαν κριτήριο σε διάφορες μελέτες. Για παράδειγμα, 5 miRNAs (hsa-miR-34b, hsa-miR-34b, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-429 και hsa-miR-122) φαίνεται να διαγιγνώσκουν πιο εύκολα ασθενείς με μη αποφρακτική αζωοσπερμία (NOA) σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους. Επίσης, στους εν λόγω ασθενείς παρατηρείται και μειωμένη έκφραση των miR-10b και miR-135b. Τα επίπεδα των miR-122, -181a και -34c5 στο πλάσμα του σπέρματος ανδρών με κισσοκήλη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν καλοί δείκτες διάγνωσης της oligo-ασθενοτεροζωοσπερμίας. Σε μια μελέτη ανεξήγητης ασθενοζωοσπερμίας, η έκφραση 5 miRNAs (miR-891b, -892b, 892a, -888 και -890) βρέθηκε να είναι διαφορετική σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες, γεγονός που μπορεί επίσης να βοηθήσει στη διάγνωση της.³⁶

Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι τα επίπεδα του hsa-miR-34c στα σπερματοζωάρια σχετίζονται με την επιτυχή έκβαση της μεθόδου intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) κατά τη διαδικασία εξωσωματικής γονιμοποίησης. Ειδικότερα, τα ποσοστά των καλής ποιότητας εμβρύων τρίτης ημέρας είναι υψηλότερα σε άτομα με υψηλά επίπεδα του hsa-miR-34c, επομένως το συγκεκριμένο miRNA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός βιοδείκτης αναγνώρισης κατάλληλων σπερματοζωαρίων.⁷ Σε μια μελέτη του Τσατσάνη και των συνεργατών του, φάνηκε ότι τα επίπεδα του miR-155, το οποίο σχετίζεται με τη φλεγμονή, σε συνδυασμό με τα επίπεδα της FSH στον ορό αίματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτης για την ανίχνευση της ανδρικής υπογονιμότητας με 80% ευαισθησία και 100% ειδικότητα.³⁸ Τα αυξημένα επίπεδα του miR-155 στο αίμα ανδρών με υπογονιμότητα ενδεχομένως να σχετίζονται με βλάβες στον αιματο-ορχικό φραγμό είτε να διαδραματίζουν λειτουργικό ρόλο στη σπερματογένεση, αλλά ο ακριβής του ρόλος στην ανδρική υπογονιμότητα δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί.³⁸



Εικόνα 28. Τα επίπεδα του miR-155 μπορούν να συσχετιστούν με την ανδρική υπογονιμότητα. (Tsatsanis C. et al.. Serum miR-155 as a potential biomarker of male fertility, Human Reproduction, Volume 30, Issue 4, 1 April 2015, Pages 853–860)

Έχει βρεθεί πως οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί SNP στο σημείο πρόσδεσης του miRNA δύνανται να σχετίζονται με περιπτώσεις υπογονιμότητας. Ένα παράδειγμα ήταν η μελέτη των Zhang et al. (2011) που ανέφερε για πρώτη φορά ότι ένας πολυμορφισμός στην περιοχή πρόσδεσης του miR-1302 συνδέθηκε με ιδιοπαθή ανδρική υπογονιμότητα. SNPs στην αλληλουχία της Dicer μπορούν επίσης να προκαλέσουν υπογονιμότητα. Ωστόσο, χρειάζονται περισσότερες έρευνες προκειμένου να αναλυθεί η σημασία των πολυμορφισμών και η σχέση τους με τα miRNAs.

Παρόλο που οι περισσότερες μελέτες είναι υπέρ της χρήσης των miRNA ως διαγνωστικούς δείκτες, με την ανάπτυξη καλύτερων τεχνικών με μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα για την ανίχνευση πρωτεϊνών, οι πρωτεΐνες ίσως να αποτελούν την πρώτη γραμμή επιλογής για βιοδείκτες. Μπορεί τα miRNAs να μην ανταγωνίζονται ισάξια τις πρωτεΐνες ως βιοδείκτες αλλά μπορούν κάλλιστα να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με αυτές για μια πιο γρήγορη και έγκυρη διάγνωση.³⁶

7. Συμπεράσματα

Στη σύγχρονη εποχή, η υπογονιμότητα αποτελεί ένα μείζον πρόβλημα της ανθρώπινης αναπαραγωγής, επηρεάζοντας ένα στα έξι ζευγάρια παγκοσμίως. Ένα μεγάλο ποσοστό περιπτώσεων υπογονιμότητας είναι ιδιοπαθείς, δηλαδή ανεξήγητης αιτιολογίας, γεγονός που απασχολεί εκατοντάδες ζευγάρια που επιθυμούν να τεκνοποιήσουν. Εδώ και χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες επιστημονικές μελέτες, με σκοπό να αποσαφηνιστούν οι μηχανισμοί που οδηγούν στη σύλληψη και στην επιτυχή έκβαση μιας εγκυμοσύνης αλλά και να διαλευκανθούν οι αιτίες που οδηγούν σε μειωμένη γονιμότητα. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, η αιτιολογία της υπογονιμότητας είναι γενετικής φύσεως και αποδίδεται σε γενετικές ασθένειες. Ωστόσο, μεγάλο ρόλο διαδραματίζουν και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις με κύριους υπεύθυνους τα μικρά μη κωδικοποιητικά μόρια RNA που επηρεάζουν τον σχηματισμό και τη λειτουργία των αρσενικών και θηλυκών γαμετών.

Τα μη κωδικοποιητικά μόρια RNA έχουν κατηγοριοποιηθεί με βάση τις λειτουργίες, τη βιογένεση και το μέγεθός τους σε διάφορες κατηγορίες και δρουν μέσω του μηχανισμού αποσιώπησης γονιδίων, γνωστού και ως RNA silencing. Έχουν ενεργό ρόλο στην σπερματογένεση και την ωογένεση, διαδικασίες εξαιρετικά πολύπλοκες που εξασφαλίζουν τη δημιουργία φυσιολογικών και λειτουργικών γαμετών. Όπως συζητήθηκε εκτενώς στην παρούσα διπλωματική εργασία, η μεταβολή της έκφρασης των μη κωδικοποιητικών μορίων RNA αλλά και των ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεσή τους έχουν συσχετιστεί με παθολογικές καταστάσεις που οδηγούν σε υπογονιμότητα.

Τα πιο σημαντικά και καλά μελετημένα μη κωδικά RNA που εμπλέκονται στη γονιμότητα είναι τα micro RNAs. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι το χαμηλό ποσοστό έκφρασης των μορίων της οικογένειας miR-34 σχετίζεται με περιπτώσεις ολιγοζωοσπερμίας και μη αποφρακτικής αζωοσπερμίας. Ένα ακόμη σημαντικό μόριο είναι το miR-7a2, που σύμφωνα με μελέτες, η χαμηλή έκφραση του συνεπάγεται χαμηλά επίπεδα γοναδοτροπινών και φυλετικών ορμονών, αλλά και μικρούς όρχεις ή ωοθήκες. Επιπλέον, άφθονα miRNAs της οικογένειας hsa-let-7, φαίνεται να

εμπλέκονται στην ρύθμιση της κυήσεως, στην ανάπτυξη ωοθυλακίων, στην στεροειδογένεση κυττάρων ωοθηκών, καθώς και στην απόκριση ορμονών.

Όσον αφορά τη γυναικεία υπογονιμότητα και συγκεκριμένα τις περιπτώσεις ενδομητρίωσης, το miR-20a, που εμπλέκεται στη ρύθμιση της αγγειογένεσης, παρουσιάζει μειωμένα επίπεδα έκφρασης σε ασθενείς με ωοθηκικό ενδομητρίωμα. Αξιοσημείωτος είναι επίσης και ο ρόλος του miRNA-200b και του miRNA-429, μέλη της οικογένειας miRNA 200 που επηρεάζουν ισχυρά την ωορρηξία στα θηλυκά. Σε πειράματα απαλοιφής των δύο προηγούμενων RNA, τα ποντίκια εμφάνισαν δυσλειτουργία του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση- ωοθήκες και αδυναμία ωορρηξίας. Επιπροσθέτως, ένα miRNA με χαμηλά επίπεδα έκφρασης στο πλάσμα γυναικών με ΠΩΑ είναι το miR-22-3p το οποίο τις διακρίνει από τις φυσιολογικές και έχει συσχετιστεί αρνητικά με τα επίπεδα FSH του ορού.

Τα μη κωδικοποιητικά RNAs στα βιολογικά υγρά φέρουν το πλεονέκτημα της χρήσης ως διαγνωστικοί δείκτες γονιμότητας ενώ αποτελούν και μέσο για τη βελτίωση των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Η ιδέα αυτή φαίνεται πολλά υποσχόμενη, όμως είναι αναγκαίο τα μόρια αυτά να μελετηθούν εις βάθος για να αποτελέσουν έγκυρες και αποτελεσματικές διαγνωστικές μεθόδους. Ενδεικτικά, τα επίπεδα του hsa-miR-34c στα σπερματοζωάρια σχετίζονται με την επιτυχή έκβαση της μεθόδου *intra-cytoplasmic sperm injection* (ICSI) κατά τη διαδικασία εξωσωματικής γονιμοποίησης. Ειδικότερα, τα ποσοστά των καλής ποιότητας εμβρύων τρίτης ημέρας είναι υψηλότερα σε άτομα με υψηλά επίπεδα του hsa-miR-34c, επομένως το συγκεκριμένο miRNA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός βιοδείκτης αναγνώρισης κατάλληλων σπερματοζωαρίων. Επίσης, 5 miRNAs (hsa-miR-34b, hsa-miR-34b, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-429 και hsa-miR-122) φαίνεται να διαγιγνώσκουν πιο εύκολα ασθενείς με μη αποφρακτική αζωοσπερμία (NOA) σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους. Ένας καλός δείκτης διάγνωσης της της ολιγο-ασθενο-τερατοζωοσπερμίας είναι τα επίπεδα των miR-122, -181a και -34c5 στο πλάσμα του σπέρματος ανδρών με κισσοκήλη. Αντίστοιχα στις γυναίκες, τα miR-222, miR-146a, miR-30c θα μπορούσαν να αποτελέσουν βιοδείκτες σε ασθενείς με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, ενώ τα miR-429 και miR-200b ενέχονται στη

λειτουργία της ωοθήκης και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες στον ορό του αίματος για την ανίχνευση της διαδικασίας της ωορρηξίας.

Για να εξακριβωθεί η αξία όλων των παραπάνω δεικτών, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν πολλές μελέτες και ακόμα περισσότερες για να μπορέσουν να βρεθούν θεραπευτικά σχήματα με πρωταγωνιστές αυτά τα miRNAs. Σκοπός των θεραπειών θα είναι η τροποποίηση της έκφρασης γονιδίων που ευθύνονται για παθολογικές διαταραχές, μέσω της μίμησης ή της παρεμπόδισης της λειτουργίας των ενδογενών miRNAs.

8. Βιβλιογραφία

1. National Cancer Institute, Cancer Registration & Surveillance Modules, Anatomy & Physiology, Reproductive System διαθέσιμο στο <https://training.seer.cancer.gov/anatomy/reproductive/>
2. James S. Lowe, Peter G. Anderson, Stevens & Lowe's Human Histology (Fourth Edition), 2015
3. Developmental Biology. 6th edition, Gilbert SF., Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000
4. Embryology, Ovarian Follicle Development, Emily Cox; Veronica Takov, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan
5. Ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα διαθέσιμο στο International Society of Andrology
6. Animal Reproduction and Development, Human Reproductive anatomy and Gametogenesis, Gametogenesis (Spermatogenesis and Oogenesis) διαθέσιμο στο LibreTexts Biology
7. «Ο ρόλος των μικρών μη κωδικών μορίων RNA (microRNA) στην υπογονιμότητα», Μαργαρίτα Καρκαλέτση, Διπλωματική εργασία
8. Formation of Ova, The Histology Guide, Faculty of Biological Sciences, University of Leeds
9. Physiology, Ovulation , Julie E. Holesh; Autumn N. Bass; Megan Lord, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan
10. Orisaka M, Miyazaki Y, Shirafuji A, et al. The role of pituitary gonadotropins and intraovarian regulators in follicle development: A mini-review. *Reprod Med Biol.* 2021;20(2):169-175. Published 2021 Feb 13. doi:10.1002/rmb2.12371
11. Gurunath S, Pandian Z, Anderson RA, Bhattacharya S. Defining infertility--a systematic review of prevalence studies. *Hum Reprod Update.* 2011 Sep-Oct;17(5):575-88. doi: 10.1093/humupd/dmr015
12. Infertility, 3 April 2023, διαθέσιμο στο www.who.int

13. Η Μέθοδος της Παρεμβολής του RNA (RNA Interference) στη Βιολογία και την Ιατρική, Δ. Μανδήλης, Σ. Βλαχόπουλος, Δ. Μήκας και Β. Ζουμπουρλής, Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών, Εργαστήριο Μονάδας Βιοϊατρικών Εφαρμογών, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα
14. Zhu Q, Kirby JA, Chu C, Gou LT. Small Noncoding RNAs in Reproduction and Infertility. *Biomedicines*. 2021;9(12):1884. Published 2021 Dec 12. doi:10.3390
15. Brugo-Olmedo S, Chillik C, Kopelman S. Definition and causes of infertility. *Reprod Biomed Online*. 2001;2(1):41-53. doi: 10.1016/s1472-6483(10)62187-6. PMID: 12537824.
16. Infertility, Symptoms & Causes, διαθέσιμο στο <https://www.mayoclinic.org/>
17. Joshi S, Savani BN, Chow EJ, et al. Clinical guide to fertility preservation in hematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* . 2014;49(4):477–484.
18. Meistrich ML. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in humans. *Fertil Steril*. 2013;100(5):1180–1186.
19. Choe J, Shanks AL. In Vitro Fertilization. 2023 Sep 4. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
20. Jain M, Singh M. Assisted Reproductive Technology (ART) Techniques. [Updated 2023 Jun 7]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan
21. Assisted Reproductive Technology (ART), Key Findings, διαθέσιμο στο <https://www.cdc.gov>
22. Pacchiarotti A, Selman H, Valeri C, Napoletano S, Sbracia M, Antonini G, Biagiotti G, Pacchiarotti A. Ovarian Stimulation Protocol in IVF: An Up-to-Date Review of the Literature. *Curr Pharm Biotechnol*. 2016;17(4):303-15.
23. Klaus Fiedler, Michael Ludwig, Use of clomiphene citrate in in vitro fertilization (IVF) and IVF/intracytoplasmic sperm injection cycles, *Fertility and Sterility*, Elsevier, December 2003
24. Shrestha D, La X, Feng HL. Comparison of different stimulation protocols used in in vitro fertilization: a review. *Ann Transl Med*. 2015;3(10):137.

25. IVF Worldwide, Stimulation Protocols, διαθέσιμο στο <https://ivf-worldwide.com/>
26. John S. Mattick, Igor V. Makunin, Non-coding RNA, Human Molecular Genetics, Volume 15, Issue suppl_1, 15 April 2006, Pages R17–R29
27. Joshi, M., Sethi, S., Mehta, P. et al. Small RNAs, spermatogenesis, and male infertility: a decade of retrospect. *Reprod Biol Endocrinol* 21, 106 (2023)
28. Barbu MG, Thompson DC, Suciu N, Voinea SC, Cretoiu D, Predescu DV. The Roles of MicroRNAs in Male Infertility. *Int J Mol Sci.* 2021;22(6):2910
29. Salilew-Wondim D, Gebremedhn S, Hoelker M, Tholen E, Hailay T, Tesfaye D. The Role of MicroRNAs in Mammalian Fertility: From Gametogenesis to Embryo Implantation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(2):585. Published 2020 Jan 16.
30. Daiqiang Zhang, Bao Shi, Peng Shao , Changwei Shao, Chongnv Wang, Jing Li, Xuezhou Liu, Xiaodong Ma, Xinyu Zhao, The identification of miRNAs that regulate ovarian maturation in *Cynoglossus semilaevis*, *Aquaculture*, Volume 555, 30 June 2022
31. Li Y, Fang Y, Liu Y, Yang X. MicroRNAs in ovarian function and disorders. *J Ovarian Res.* 2015;8:51. Published 2015 Aug 1
32. Gou LT, Dai P, Liu MF. Small noncoding RNAs and male infertility. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2014 Nov-Dec;5(6):733-45
33. Teague EM, Print CG, Hull ML. The role of microRNAs in endometriosis and associated reproductive conditions. *Hum Reprod Update.* 2010 Mar-Apr;16(2):142-65
34. Gilabert-Estelles J, Braza-Boils A, Ramon LA, Zorio E, Medina P, Espana F, Estelles A. Role of microRNAs in gynecological pathology. *Curr Med Chem.* 2012;19(15):2406-13
35. Irma Virant-Klun, Anders Ståhlberg, Mikael Kubista, Thomas Skutella, "MicroRNAs: From Female Fertility, Germ Cells, and Stem Cells to Cancer in Humans", *Stem Cells International*, vol. 2016, Article ID 3984937, 17 pages, 2016.
36. Vashisht A, Gahlay GK. Using miRNAs as diagnostic biomarkers for male infertility: opportunities and challenges. *Mol Hum Reprod.* 2020 Apr 24;26(4):199-214

37. Ahmed K, LaPierre MP, Gasser E, Denzler R, Yang Y, Rüllicke T, Kero J, Latreille M, Stoffel M. Loss of microRNA-7a2 induces hypogonadotropic hypogonadism and infertility. *J Clin Invest*. 2017 Mar 1;127(3):1061-1074.
38. Tsatsanis C, Bobjer J, Rastkhani H, Dermitzaki E, Katrinaki M, Margioris AN, Giwercman YL, Giwercman A. Serum miR-155 as a potential biomarker of male fertility. *Hum Reprod*. 2015 Apr;30(4):853-60.
39. Eisenberg I, Nahmias N, Novoselsky Persky M, Greenfield C, Goldman-Wohl D, Hurwitz A, Haimov-Kochman R, Yagel S, Imbar T. Elevated circulating micro-ribonucleic acid (miRNA)-200b and miRNA-429 levels in anovulatory women. *Fertil Steril*. 2017 Jan;107(1):269-275. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.10.003.

Μελέτη	Έτος	Είδος μελέτης	Συμπέρασμα
Orisaka M. et al	2021	Review	Η διαδικασία της ωοθυλακιογένεσης ρυθμίζεται από τις υποφυσιακές γοναδοτροπίνες (FSH, LH) και άλλους ρυθμιστικούς παράγοντες όπως στεροειδή και κυτοκίνες)
Gurunath S. et al	2011	Review	Είναι απαραίτητο να βρεθεί ένας ευρέως αποδεκτός ορισμός για την υπογονιμότητα. Οι επιστήμονες της παρούσας μελέτης προτείνουν να ορίζεται με βάση τη διάρκεια των προσπαθειών για εγκυμοσύνη σε συνδυασμό με την ηλικία της γυναίκας.
Zhu Q. et al	2021	Review	Τα μη κωδικοποιητικά RNAs σχετίζονται στενά με την παθολογία της υπογονιμότητας. Επίσης, μπορούν να

			χρησιμοποιηθούν σαν βιοδείκτες για την αξιολόγηση της γονιμότητας και τη βελτίωση των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.
Brugo-Olmedo S. et al	2001	Άρθρο	Η εμφάνιση των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής έχει βοηθήσει στη μελέτη βασικών αναπαραγωγικών διαδικασιών. Στη σημερινή εποχή, έχει αυξηθεί ο αριθμός γυναικών άνω των 35 ετών που επιδιώκουν να τεκνοποιήσουν.
Joshi S. et al	2014	Review	Η υπογονιμότητα είναι ένα θέμα που αντιμετωπίζουν αυτοί που υποβάλλονται σε μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων. Προτείνεται η κρυοσυντήρηση ωαρίων/εμβρύων για τη διατήρηση της γονιμότητας γυναικών και η αποθήκευση σπέρματος σε τράπεζα για τη διατήρηση της γονιμότητας ανδρών αντίστοιχα.
Meistrich ML	2013	Άρθρο	Η αντιμετώπιση του καρκίνου με χημειο- ή ραδιο-θεραπεία προκαλεί μείωση στον αριθμό σπερματοζωαρίων, οδηγώντας συχνά και σε παροδική ή μόνιμη αζωοσπερμία.
Choe J, Shanks AL	2023	Άρθρο	Η εξωσωματική γονιμοποίηση είναι η πιο κοινή μορφή ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις

			<p>δυσκολίας στην επίτευξη εγκυμοσύνης. Η διαδικασία αυτή απαιτεί την εύρεση της αιτίας της υπογονιμότητας, την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου και την ύπαρξη μιας ικανής επιστημονικής ομάδας.</p>
Jain M et al	2024	Άρθρο	<p>Για ποιους ενδείκνυται και για ποιους όχι οι τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής; Ποιες είναι κατάλληλες evidence-based τεχνικές; Ποιες είναι οι πιθανές επιπλοκές της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και ποια η διαχείρισή τους;</p>
Pacchiarotti A et al	2016	Review	<p>Η ωοθυλακιορρηξία μπορεί να προκληθεί μέσω χορήγησης γοναδοτροπινών, με σκοπό την λήψη μεγαλύτερου αριθμού ωαρίων. Υπάρχει πληθώρα πρωτοκόλλων διέγερσης μέσω της χορήγησης FSH σε συνδυασμό με GnRH αγωνιστή ή ανταγωνιστή είτε μέσω λήψης σκευασμάτων από το στόμα.</p>
Klaus Fiedler, Michael Ludwig	2003	Άρθρο	<p>Η κιτρική κλομφαίνη χρησιμοποιείται για την πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας και προτιμάται λόγω του χαμηλού κόστους και του αμελητέου κινδύνου για σύνδρομο υπερδιέγερσης ωοθηκών.</p>
Shrestha D et al	2015	Review	<p>Το πρωτόκολλο GnRH ανταγωνιστή και ελάχιστης διέγερσης (minimal</p>

			stimulation) περιλαμβάνει μικρότερη διάρκεια θεραπείας και λιγότερη χρήση γοναδοτροπινών. Το μακρύ πρωτόκολλο με GnRH αγωνιστή υπερσχύει στην ωοθυλακιογένεση και τα ποσοστά εγκυμοσύνης, που είναι ο πρωταρχικός στόχος της ελεγχόμενης διέγερσης ωοθηκών.
John S. Mattick, Igor V. Makunin	2006	Άρθρο	Τα μη κωδικοποιητικά RNA καθορίζουν σύνθετα χαρακτηριστικά και παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση ασθενειών.
Joshi M et al	2023	Άρθρο	Τα καλύτερα μελετημένα miRNAs στη σπερματογένεση είναι τα microRNAs (miRNAs), τα PIWI-interacting RNA (piRNA), τα small interfering RNA (siRNA), και τα transfer RNA-derived small RNAs (ts-RNAs). Αυτά σχετίζονται άμεσα με την υπογονιμότητα και μπορούν να αποτελέσουν βιοδείκτες ενδεικτικούς της ποιότητας του σπέρματος.
Barbu MG et al	2021	Άρθρο	Το 50% της υπογονιμότητας σε ζευγάρια οφείλεται στον ανδρικό παράγοντα. Η μείωση ή αύξηση της συγκέντρωσης των miRNAs στο σπέρμα παίζει ρόλο στην υπογονιμότητα και συχνά συνδέεται με περιπτώσεις ασθenoζωοσπερμίας ή αζωοσπερμίας.

Salilew-Wondim D et al	2020	Άρθρο	Τα miRNAs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην γαμετογένεση και την εμβρυογένεση των θηλαστικών και καθοδηγούν μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις κατά την πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη.
Ying Li et al	2015	Άρθρο	Μια πληθώρα miRNAs που εκφράζονται στην ωοθήκη ρυθμίζουν την ανάπτυξη των ωοθυλακίων, την ατρησία, την ωοθυλακιορρηξία και τη στεροειδογένεση, Επίσης, συμμετέχουν στην εκδήλωση ωοθηκικών διαταραχών όπως ο καρκίνος των ωοθηκών, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών και την πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια.
Lan Tao Gou et al	2014	Review	Κάποια είδη μικρών μη κωδικοποιητικών RNA , συμπεριλαμβανομένων των microRNAs (miRNAs), endo-small interference RNAs (endo-siRNAs), και Piwi-interacting RNAs (piRNAs), εκφράζονται στα αρσενικά γαμετικά κύτταρα και απαιτούνται για τη σπερματογένεση στα ζώα.
Teague EM et al	2010	Review	Τα miRNAs είναι πιθανοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης στην ενδομητρίωση και στις σχετικές αναπαραγωγικές διαταραχές, γεγονός που τα καθιστά κατάλληλους βιοδείκτες και θεραπευτικά εργαλεία για την ασθένεια αυτή.

A Vashisht et al	2020	Review	Προβλήματα στη σπερματογένεση και την ωρίμανση στην επιδιδυμίδα, στην ανάπτυξη των όρχεων ή στην μετανάστευση οδηγούν σε ανδρική υπογονιμότητα και πολλές περιπτώσεις συνδέονται με τα miRNAs που ρυθμίζουν τις παραπάνω διαδικασίες.
------------------	------	--------	---